

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E**  
**BIOTECNOLOGIA – PPGQB**  
**Instituto de Química e Biotecnologia**

**“DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA, COM MICROELETRODOS,  
DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO EM  
CÉLULAS ISOLADAS ESTIMULADAS POR SUBSTÂNCIAS  
BIOLOGICAMENTE ATIVAS”**

**Danielle Cristhina Melo Ferreira**

**Tese apresentada ao curso de Pós-  
Graduação em Química e Biotecnologia da  
Universidade Federal de Alagoas, como  
requisito para a obtenção do grau de Doutor  
em Ciências.**

**Orientadora: Profa Dra. Marília O. F. Goulart**

**Orientador: Prof. Dr. Christian Amatore**

Maceió/AL

2008

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

**Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale**

F383d

Ferreira, Danielle Cristhina Melo.

Detecção amperométrica, com microeletrodos, de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células isoladas estimuladas por substâncias biologicamente ativas / Danielle Cristhina Melo Ferreira, 2008.

xxii, 127 f. : il. tabs., graf.

Orientadores: Marília Oliveira Fonseca Goulart.

Co-Orientador: Christian Amatore.

Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió ; Université Pierre et Marie Curie. Paris 6, 2008.

Bibliografia: f. 111-127.

1. Microeletrodo. 2. Estresse oxidativo. 3. Espécies reativas – Detecção.  
4. Eletroquímica. 5. Beta-lapachona. 6. Vitamina C. I. Título.

CDU: 543.061:544.07



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

Instituto de Química e Biotecnologia  
Universidade Federal de Alagoas  
Tel. 55 82 3214-1384 Fax. 55 82 3214-1389  
www.qui.ufal.br

Campus A. C. Simões  
Tabuleiro dos Martins  
57072-970  
Maceió-AL  
Brasil

Membros da Comissão Julgadora da Tese de Doutorado de Danielle Cristhina Melo Ferreira intitulada: **“Detecção Amperométrica de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio em Células Isoladas, Estimuladas por Compostos Biologicamente Ativos”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 02 de maio de 2008, às 9hs na sala de Reuniões do IQB da UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marília Oliveira Fonseca Goulart  
Orientadora – PGOB/IQB/UFAL

Prof. Dr. Christian Amatore  
Orientador – École Normale Supérieure (Paris – França)

Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota  
UNICAMP

Prof. Dr. Jader Cruz  
UFMG

Prof. Dr. Josealdo Tonholo  
PPGQB/IQB/UFAL

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabiane Caxico de Abreu Galdino  
PPGQB/IQB/UFAL

**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE  
ET L'UNIVERSITE FEDERALE DE ALAGOAS**

Spécialité

.....  
(Ecole doctorale)

Présentée par

**Mlle Danielle Cristhina MELO FERREIRA**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE  
ET L'UNIVERSITE FEDERALE DE ALAGOAS**

Sujet de la thèse:

DETECTION AMPEROMETRIQUE, PAR MICROELECTRODE,  
D'ESPÈCES RÉACTIVES DE L'OXYGÈNE ET DE L'AZOTE EN CELLULE  
ISOLE ET STIMULE PAR SUBSTANCES BIOLOGIQUEMENT ACTIVES.

Soutenue le 2 mai 2008 Devant le jury composé de:

M. C. AMATORE..... Directeur de thèse

Mme. M. O. F. GOULART.....Directrice de thèse

M. P. de OLIVEIRA..... Rapporteur

M. L. T. KUBOTA..... Rapporteur

M. J. CRUZ..... President

Mme. F. C. de A. GALDINO... Examineur

M. J. TONHOLO ..... Examineur

---

Université Pierre & Marie Curie - Paris 6  
Bureau d'accueil, inscription des doctorants et base de données  
Esc G, 2<sup>ème</sup> étage  
15 rue de l'école de médecine  
75270-PARIS CEDEX 06

Tél. Secrétariat : 01 42 34 68 35  
Fax : 01 42 34 68 40  
Tél. pour les étudiants de A à EM : 01 42 34 69 54  
Tél. pour les étudiants de EN à ME : 01 42 34 68 41  
Tél. pour les étudiants de MF à Z : 01 42 34 68 51  
E-mail : [scolarite.doctorat@upmc.fr](mailto:scolarite.doctorat@upmc.fr)

*Você não sabe.*

*O quanto eu caminhei.*

*Prá chegar até aqui.*

*Percorri milhas e milhas.*

*Antes de dormir.*

*Eu nem cochilei.*

*Os mais belos montes.*

*Escalei.*

*Nas noites escuras.*

*De frio chorei, ei , ei*

.....

*(Toni Garrido / Lazão / Da Gama / Bino)*

## AGRADECIMENTOS

Eu gostaria, primeiramente, de agradecer a professora Marília Goulart por ter me acolhido no seu grupo desde o mestrado. Agradeço por ter me guiado ao longo desse trabalho, pelos conselhos e por me fazer compreender inúmeras noções complexas da ciência e da vida, pelo incentivo e por estar sempre pronta para esclarecer as dúvidas.

J'aimerais remercier Christian Amatore de m'avoir accueilli au sein de son équipe, où j'ai effectué mon stage de doctorat cotutelle en France (École Normale Supérieure) et où j'avais l'opportunité d'apprendre l'art de «maltraiter» les pauvres cellules vivantes.

Obrigada aos professores do grupo de Eletroquímica da UFAL: Carmem Zanta, Fabiane Caxico, Josealdo Tonholo e Nivaldo Soares.

Merci à Stéphane Arbault, Frédéric Lemaître, Manon Guille, Olivier Buriez et Yann Bouret – l'équipe française.

Obrigada aos amigos do grupo de pesquisa da UFAL pela amizade, pela ajuda na busca dos dados e informações ao longo dessa tese – Antônio (presença constante em vários momentos nesses últimos meses), Iara (pelos conselhos e amizade), Augusto (com suas benditas massagens), Aline, Cícero e Paulo (os inseparáveis), Francine, Janesmar, Phabyanno, Rui, Alane e todos os outros que não foram citados.

Merci a Issa Tapsoba de m'avoir initié à la mesure électrochimique sur cellule vivante. Merci à Sabrina Consola pour sa présence chaleureuse, pour l'accueil dans sa maison et son aide avec la langue française (et ses expressions populaires...). Merci a Paul (Shenghua Hu) pour sa patience, son incassable travail et amitié. Merci a Yann Verchier (mon grand gourou) de m'avait aidé aussi dans les mesures électrochimiques, pour sa «grand» présence au cours de ma passage au labo et pour les repas, les bons vins,...

Obrigada ao grupo do Professor Antônio Ventura pelas amostras de alfa e beta-lapachonas cedidas.

Obrigada às professoras Eulália Ximenes e Silene do Nascimento da UFPE pelo “estágio” no mundo biológico.

Aos funcionários do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL – entre eles: Rejane, Aldy e outros.

Merci aussi à Denise, Marie, Yvon et tous les autres.

Em especial, às minhas amigas-irmãs Carolina Feitoza e Denise Amorim, cuja presença ao meu lado foi primordial e necessária.

Obrigada a todos os meus amigos de Maceió, da França e de tantos outros lugares pelo incentivo e apoio em vários momentos.

Enfim, apresento a todos, que, de uma forma direta ou indireta colaboraram com este projeto, o meu mais sincero agradecimento.

A elaboração desta tese contou com o importante apoio do CNPq e da CAPES/COFECUB. Registro aqui a minha gratidão a essas agências que tanto favorecem e estimulam a pesquisa científica no Brasil.

## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO</b>	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	x
<b>LISTA DE TABELAS</b>	xvii
<b>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS</b>	xviii
<b>RESUMO</b>	xxi
<b>ABSTRACT</b>	xxii
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
1.1 Introdução geral	1
1.2 Espécies Reativas e Antioxidantes	3
1.2.1 Ácido Ascórbico	7
1.2.2 Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio. Detalhamento	9
1.3 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio	17
1.4 Detecção Eletroquímica Direta de Espécies Reativas Liberadas em Células Individuais	21
1.5 Determinação Individual das Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio	23
1.6 Microeletrodos	26
1.7 Considerações gerais sobre quinonas	30
1.7.1 Quinonas como cicladores redox	34
1.7.2 Quinonas como aceptores de Michael	35
1.7.3 Quinonas como venenos de topoisomerases	36
1.7.4 Quinonas como antimetabólitos	36
1.8 Beta-lapachona	43
<b>2. OBJETIVO</b>	47
<b>3. EXPERIMENTAL</b>	48
3.1 Material e soluções	48
3.2 Fabricação de Microeletrodo	48
3.3 Cultura Celular	51
3.4 Tratamento Celular	52



3.5 Condicionamento do eletrodo (corrente de base)	53
3.6 Medidas em uma única célula	53
3.7 Detecção das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio	57
3.8 Estudo da formação do complexo de inclusão entre a beta-lapachona e beta-ciclodextrina	58
3.9 Estudo do ácido ascórbico	59
3.10 Análise Estatística	59
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	60
4.1 Alfa e beta-lapachonas	60
4.1.1 O Efeito da concentração da alfa- e beta-lapachonas em macrófagos (RAW-264.7)	61
4.1.2 Estudo cinético dos efeitos de alfa e beta-lapachona em macrófagos (RAW-264.7)	65
4.1.3 Determinação da natureza das diferentes espécies liberadas por macrófagos RAW 264.7 durante a manifestação do estresse oxidativo após incubação com beta-lapachona	71
4.1.4 Sumário de resultados	82
4.1.5 Discussão dos resultados da alfa e beta-lapachona	84
4.2 Formação de complexo de inclusão da beta-lapachona e beta-ciclodextrina	90
4.3 Ácido Ascórbico (AA)	94
4.3.1 Ácido ascórbico e seu efeito no fenômeno do estresse oxidativo	94
4.3.2 Efeito da concentração do Ácido Ascórbico no surto oxidativo	98
4.3.3 A natureza das diferentes espécies liberadas por RAW 264.7 e pelas células PLB-985 pré-tratadas com PMA	100
4.3.4 Estudos de Espectrofotometria no UV de ERN consumidas pelo AA	103
4.3.5 Discussão dos resultados do AA	106
<b>5. CONCLUSÕES</b>	109
<b>6. PERSPECTIVAS</b>	110
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	111
<b>8. ANEXOS (Produção Acadêmica)</b>	124

<b>9. GLOSSÁRIO</b>	127
---------------------	-----

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Geração e Destino de ERO e ERN.	4
<b>Figura 2:</b> Características do ambiente celular quando é submetido à exposição crescente de ERO.	5
<b>Figura 3:</b> Ação antioxidante das vitaminas E e C na peroxidação lipídica das membranas celulares: (a) Abstração de H <sup>•</sup> do lipídio da membrana celular devido ao ataque do radical livre X <sup>•</sup> ; (b) Em presença de O <sub>2</sub> , ocorre formação do radical peroxila R-OO <sup>•</sup> ; (c e d) A vitamina E remove o radical peroxila; (d e e) O ascorbato (AscH <sup>-</sup> ) pode reciclar vitamina E; (e) Enzimas PLA2 (Fosfolipase A2) GSH-Px (Glutathione Peroxidase) PhGSH-Px (Fosfolipase A2) GSH-Px (Glutathione Peroxidase) em presença de FA-CoA (Fatty Acyl-CoA) podem reparar o dano do ácido graxo.	8
<b>Figura 4:</b> Principais produtos da oxidação do DNA por ERO e ERN.	12
<b>Figura 5:</b> Principais produtos da oxidação dos aminoácidos e proteínas por ERO e ERN.	13
<b>Figura 6:</b> Reação bioquímica da formação de NO em células.	16
<b>Figura 7:</b> Caminho quimioluminescente da lucigenina.	18
<b>Figura 8:</b> Oxidação da 2',7'-diclorodidrodifluorescina.	18
<b>Figura 9:</b> Oxidação da Diidrorodamina-123.	19
<b>Figura 10:</b> Caminho quimioluminescente do luminol.	19
<b>Figura 11:</b> Espécies oxigenadas e nitrogenadas reativas formadas no metabolismo celular e seus respectivos potenciais de detecção.	23
<b>Figure 12:</b> Voltamogramas relativos à oxidação das espécies H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , ONOO <sup>-</sup> , NO <sup>•</sup> e NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , obtidas em eletrodo de carbono platinizado.	24
<b>Figura 13:</b> Diagrama da instrumentação eletroquímica desenvolvida para a utilização de UME (ultramicroeletrodos).	29
<b>Figura 14:</b> Redução de quinonas (Q) via 1 e 2 elétrons, gerando semiquinonas (Q <sup>•-</sup> ) e hidroquinonas (QH <sub>2</sub> ).	32
<b>Figura 15:</b> Esquema quadrado representativo da oxirredução de quinonas em vários meios.	32

<b>Figura 16:</b> Mecanismos gerais de ações biológicas de quinonas.	33
<b>Figura 17:</b> Sumário dos potenciais mecanismos citotóxicos para quinonas.	34
<b>Figura 18:</b> Atuação de quinonas na geração de espécies oxigenadas reativas e destoxificação por catalase e superóxido dismutase (SOD).	35
<b>Figura 19:</b> Esquema de reação de naftoquinona com GSH via adição de Michael (arilação) e sua subsequente oxidação.	36
<b>Figura 20:</b> Interrupção da Cadeia Respiratória Mitocôndrica. Fp: flavoproteína; Cit: citocromo.	37
<b>Figura 21:</b> Redução mono- e bi-eletrônica de quinonas.	44
<b>Figura 22:</b> (A) Fibras de carbono de 10 $\mu$ M e capilar; (B) Aspiração das fibras separadas individualmente dentro de um capilar de vidro de 1 mm de diâmetro.	49
<b>Figura 23:</b> "Puxador" de eletrodos e esquema dos eletrodos formados.	49
<b>Figura 24:</b> (A) Eletrodeposição do polímero nos microeletrodos de carbono, eletrodo de platina como contra eletrodo, potencial de + 4 V; (B) Desenho do microeletrodo de carbono após a eletrodeposição do polímero.	50
<b>Figura 25:</b> (A) Polimento do microeletrodo de carbono platinizado com ângulo de 45°; (B) Desenho e foto da forma da extremidade do eletrodo após o polimento.	50
<b>Figura 26:</b> Eletrodo platinizado.	51
<b>Figura 27:</b> (A) Microscópio invertido com os micromanipuladores (direita e esquerda), (B): Posicionamento do microeletrodo de carbono platinizado, eletrodo de referência (Calomelano) e da micropipeta (utilizada para provocar a despolarização mecânica da membrana) sobre a placa de Petri, contendo macrófagos.	55
<b>Figura 28:</b> Esquema relacionado à despolarização mecânica da membrana e leitura dos sinais emitidos pela célula viva pelo microeletrodo.	56
<b>Figura 29:</b> Resposta amperométrica obtida da despolarização mecânica membrana que foi detectada por um microeletrodo de fibra de carbono platinizada, em macrófagos, em PBS (pH 7,4), em situação controle.	57

<b>Figura 30:</b> (A) Detector amperométrico, conversor do sinal amperométrico (Powerlab) e (B) sua resposta no software.	58
<b>Figura 31:</b> Representação da beta-ciclodextrina.	59
<b>Figura 32:</b> Corrente amperométrica média do surto oxidativo em macrófagos em condição controle (CTR) e após incubação com lapachonas ( $c = 1 \mu\text{M}$ ), durante 1 hora com alfa- (A) e beta-lapachona (B). Microeletrodo de fibra de carbono platinizada como eletrodo de trabalho e ECSS como referência. Tampão fosfato PBS ( $\text{pH} = 7,4$ ). $E = +850 \text{ mV}$ . Cada curva representa a leitura de, no mínimo, 20 células.	63
<b>Figura 33:</b> Liberação de ERON: gráfico comparativo do efeito da concentração de beta-lapachona, após incubação de 1 hora. Microeletrodo de fibra de carbono platinizada como eletrodo de trabalho e ECSS como referência em tampão fosfato PBS ( $\text{pH} = 7,4$ ). $E = 850 \text{ mV}$ . Cada curva representa a leitura mínima de 20 células. Os valores significativos em relação ao controle (CTR) são representados por (*) para $p < 0,05$ e (***) para $p < 0,001$ .	64
<b>Figura 34:</b> Liberação de ERON: gráfico comparativo do efeito da concentração da alfa e beta-lapachona, após incubação de 1 hora. Eletrodo de trabalho: microeletrodo de fibra de carbono platinizada; Eletrodo de referência: ECSS. Tampão PBS ( $\text{pH} = 7,4$ ). $E = +850 \text{ mV}$ . Cada curva representa a leitura mínima de 20 células. Os valores significativos em relação ao controle (CTR) são representados por (*) para $p < 0,05$ , (**) para $p < 0,01$ e (***) para $p < 0,001$ . Alfa 1 e beta 1: $c = 1 \mu\text{M}$ ; alfa 10 e beta 10: $c = 10 \mu\text{M}$ ; alfa 100 e beta 100: $c = 100 \mu\text{M}$ .	65
<b>Figura 35:</b> Liberação de ERON: gráfico comparativo do efeito do intervalo de incubação de macrófagos com beta-lapachona ( $c = 1 \mu\text{M}$ ). Microeletrodo de fibra de carbono platinizada como eletrodo de trabalho e ECSS como referência. Tampão fosfato ( $\text{pH} = 7,4$ ). $E = 850 \text{ mV}$ . Cada curva representa a leitura de, no mínimo, 20 células. Os valores significativos em relação ao controle (CTR) são representados por (*) para $p < 0,05$ , (**) para $p < 0,01$ e (***) para $p < 0,001$ . CTR1, CTR2, CTR3 e CTR4 representam os controles, com tempos de incubação de 1 h, 4 h, 6 h e 24 h, respectivamente.	66
<b>Figura 36:</b> Liberação de ERON: gráfico comparativo do efeito do intervalo de incubação de macrófagos com beta-lapachona ( $c = 0,1 \mu\text{M}$ ). Microeletrodo de fibra de carbono platinizada como eletrodo de trabalho e ECSS como referência. Tampão fosfato ( $\text{pH} = 7,4$ ). $E = 850 \text{ mV}$ . Cada curva representa a leitura no mínimo 20 células. Os valores significativos em relação ao controle (CTR) são representados por (*) para $p < 0,05$ , (**) para $p < 0,01$ e (***) para $p < 0,001$ . CTR1, CTR2, CTR3 e CTR4 representam os controles, com	67

tempos de incubação de 1 h, 4 h, 6 h e 24 h, respectivamente.	
<b>Figura 37:</b> Micrografias dos macrófagos controle (CTR – 0 $\mu\text{M}$ ) e dos macrófagos incubados com beta-lapachona ( $c = 1$ e $10 \mu\text{M}$ ), nos intervalos de tempo de 1, 4, 6 e 24 horas. Microscópio óptico invertido com objetiva de 40 X – contraste de fase.	68
<b>Figura 38:</b> Liberação de ERON: gráfico comparativo do efeito da concentração de alfa-lapachona ( <b>A</b> ) $c = 1 \mu\text{M}$ e ( <b>B</b> ) $c = 10 \mu\text{M}$ , nos intervalos de 1, 4 e 24 horas. Eletrodo de trabalho: Microeletrodo de fibra de carbono platinizada; Eletrodo de referência: ECSS. Tampão fosfato PBS ( $\text{pH} = 7,4$ ). $E = 850 \text{ mV}$ . Os valores significativos em relação ao controle (CTR) são representados por (*) para $p < 0,05$ .	69-70
<b>Figura 39:</b> Micrografias dos macrófagos controle (CTR – 0 $\mu\text{M}$ ) e dos macrófagos incubados com alfa-lapachona ( $c = 10$ e $100 \mu\text{M}$ ), nos intervalos de tempo de 1, 4, 6 e 24 horas. Microscópio óptico invertido com objetiva de 40 X.	71
<b>Figura 40:</b> Picos amperométricos, em diferentes potenciais aplicados, relativos aos surtos oxidativos de macrófagos em condição controle ( <b>A</b> ) e após 4 horas de incubação com beta-lapachona ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) ( <b>B</b> ). Eletrodo de trabalho: Microeletrodo de fibra de carbono platinizada e Eletrodo de referência: ECSS. Tampão fosfato PBS ( $\text{pH} = 7,4$ ). $E = 850, 650, 450$ e $300 \text{ mV}$ . Cada curva representa a leitura de, no mínimo, 20 células.	72-73
<b>Figura 41:</b> Resposta amperométrica em $+450 \text{ mV}$ versus ECSS e as curvas representativas da contribuição de $\text{NO}_2^-$ ( $I^{850 \text{ mV}} - I^{650 \text{ mV}}$ ) e $\text{NO}^\bullet$ ( $I^{650 \text{ mV}} - I^{450 \text{ mV}}$ ), a partir dos picos amperométricos relativos ao surto oxidativo detectado em macrófagos, em condição controle ( <b>A</b> ) e após incubação com beta-lapachona ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) por 4 horas ( <b>B</b> ).	74
<b>Figura 42:</b> Variações temporais dos fluxos individuais para as diferentes espécies emitidas pelos macrófagos em controle ( <b>A</b> ) e após incubação, por 4 horas, com beta-lapachona ( $c = 1 \mu\text{M}$ ). Os fluxos foram determinados de acordo com a lei de Faraday por subtração de curvas para $\text{NO}_2^-$ e $\text{NO}^\bullet$ e da corrente em $+450 \text{ mV}$ para $\text{ONOO}^-$ com $\text{H}_2\text{O}_2$ .	75
<b>Figura 43:</b> Reconstrução dos fluxos das espécies primárias $\text{O}_2^\bullet$ e $\text{NO}^\bullet$ que são responsáveis pelo coquetel final de espécies no surto oxidativo dos macrófagos. ( <b>A</b> ) controle e ( <b>B</b> ) incubação por 4 horas com beta-lapachona ( $c = 1 \mu\text{M}$ ).	76
<b>Figura 44:</b> Quantidade total de ERON liberadas por macrófagos RAW 264.7 em situação controle e após incubação, durante 4 horas, com beta-lapachona ( $c = 1 \mu\text{M}$ ).	77

<b>Figura 45:</b> Picos amperométricos, em diferentes potenciais, relativos ao surto oxidativo dos macrófagos em condições controle <b>(A)</b> e após incubação com beta-lapachona ( $c = 10 \mu\text{M}$ ), por 1 hora <b>(B)</b> . Eletrodo de trabalho: Microeletrodo de fibra de carbono platinizada e Eletrodo de referência: ECSS. Tampão fosfato PBS ( $\text{pH} = 7,4$ ). $E = 850, 650, 450$ e $300$ mV. Cada curva representa a leitura de, no mínimo, 20 células.	78
<b>Figura 46:</b> Resposta amperométrica em $+450$ mV <i>versus</i> ECSS e as curvas representativas da contribuição de $\text{NO}_2^-$ ( $I^{850 \text{ mV}} - I^{650 \text{ mV}}$ ) e $\text{NO}^\bullet$ ( $I^{650 \text{ mV}} - I^{450 \text{ mV}}$ ) no surto oxidativo detectado em macrófagos, em condições-controle <b>(A)</b> e após incubação com beta-lapachona ( $c = 10 \mu\text{M}$ ), durante 1 hora <b>(B)</b> .	79
<b>Figura 47:</b> Variações temporais dos fluxos individuais para as diferentes espécies emitidas pelos macrófagos em controle <b>(A)</b> e com beta-lapachona ( $c = 10 \mu\text{M}$ ), após incubação por 1 hora <b>(B)</b> . Os fluxos foram determinados de acordo com a lei de Faraday das curvas subtraídas para $\text{NO}_2^-$ e $\text{NO}^\bullet$ e da corrente em $+450$ mV para $\text{ONOO}^-$ com $\text{H}_2\text{O}_2$ .	80
<b>Figura 48:</b> Reconstrução dos fluxos das espécies primárias $\text{O}_2^\bullet$ e $\text{NO}^\bullet$ , responsáveis pelo coquetel final de espécies no surto oxidativo dos macrófagos. <b>(A)</b> controle e <b>(B)</b> após incubação com beta-lapachona ( $c = 10 \mu\text{M}$ ), por 1 hora.	81
<b>Figura 49:</b> Quantidade total de ERON liberadas por macrófagos RAW 264.7 em situação controle e após incubação, durante 1 hora, com beta-lapachona ( $c = 10 \mu\text{M}$ ).	82
<b>Figura 50:</b> Possível mecanismo do efeito citotóxico de quinonas em células (Segura-Aguilar e cols., 1992).	88
<b>Figura 51:</b> Esquema representativo da inclusão da beta-lapachona em solução aquosa contendo beta-ciclodextrina (beta-CD) (Nasongkla e cols., 2003).	90
<b>Figura 52:</b> <b>A)</b> Espectros de absorção para a b-lapachona ( $1 \text{ mM}$ ), em ausência e presença de beta-ciclodextrina (CD), em tampão fosfato (PBS, $\text{pH} = 7,4$ ) + EtOH (5%); caminho óptico ( $l$ ) = $1 \text{ cm}$ ; $[\text{CD}] = 0$ (a), $10$ (b), $20$ (c), $30$ (d), and $50 \text{ mM}$ (e).	91
<b>Figura 53:</b> Gráfico para a determinação da constante de equilíbrio do complexo da beta-lapachona - beta-ciclodextrina de acordo com a equação de Benesi-Hildebrand à $258 \text{ nm}$ (PBS + $5 \%$ EtOH), a partir de dados na Figura 50.	92
<b>Figura 54:</b> Espectro de absorção da beta-lapachona ( $0,046 \text{ mM}$ ) na presença de beta-ciclodextrina ( $0,46 \text{ mM}$ ) em várias misturas de PBS ( $\text{pH} = 7,4$ ) + EtOH; EtOH = $0$ (a), $5$ (b), $10$ (c), e $100\%$ (d).	93

Caminho óptico ( $l$ ) = 1 cm.	
<b>Figura 55:</b> Corrente amperométrica média do surto oxidativo de macrófagos (RAW 264.7), em condição controle e, após incubação com AA ( $c = 1$ mM), durante 1 hora. Microeletrodo de fibra de carbono platinizada como eletrodo de trabalho e ECSS como referência. Tampão fosfato, PBS, (pH = 7,4). $E = 850$ mV.	96
<b>Figura 56:</b> Corrente amperométrica média do surto oxidativo das células mielóides PLB-985, pré-tratadas com PMA, em condição controle e, após incubação com AA ( $c=1$ mM), durante 1 hora. Microeletrodo de fibra de carbono platinizada como eletrodo de trabalho e ECSS como referência. Tampão fosfato, PBS, (pH = 7,4). $E = 850$ mV.	96
<b>Figura 57:</b> Comparação entre as quantidades totais de ERO e/ou ERN liberadas por RAW 264.7 (esquerda) e PLB-985 pré-tratado com PMA (direita) com e sem incubação com AA, após 1 hora, ( $c = 1$ mM).	97
<b>Figure 58:</b> Cargas totais detectadas em potencial de +850 mV vs. ESC durante a oxidação amperométrica de ERO e ERN liberadas por RAW 264.7 (esquerda) e por PLB-985, pré-tratados com PMA (direita), em solução de PBS (pH 7,4), (controle, branco) ou após incubação, por 1 hora, com AA, $c = 1$ mM (cinza) ou $c = 5$ mM (preto). Cada curva representa a média dos sinais de, no mínimo, 20 diferentes respostas individuais celulares.	99
<b>Figura 59:</b> Quantidade média de ERO e/ou ENR liberadas pelos macrófagos RAW 264.7 detectada por microeletrodo de fibra de carbono platinizada em 850 mV ou 450 mV vs. ECSS em PBS (pH = 7,4). $c = 1$ mM.	101
<b>Figura 60:</b> Quantidade média de ERO e/ou ENS liberadas por PLB-985 em presença de 1 mM de AA detectada por microeletrodo de fibra de carbono platinizada em +850 mV, +450 mV e +300 mV vs. ECSS, em PBS (pH = 7,4).	102
<b>Figura 61:</b> Espectros no UV de soluções puras de 1 mM de AA (linha grossa), 1 mM de íons nitrito (linha fina) e 1 mM do desidroascorbato (linha fina tracejada).	103
<b>Figura 62:</b> Evolução com o tempo da absorvância de UV de uma solução de AA, 1 mM, em uma cubeta saturada inicialmente com ar (cada curva representa o tempo de 3 minutos).	104
<b>Figura 63:</b> Espectro no UV de uma solução pura de AA (1 mM; $\lambda_{\max} = 245$ nm; curva pontilhada) e íons nitrito (1 mM; $\lambda_{\max} = 210$ nm; curva com linha fina cheia). A formação do desidroascorbato é vista na evolução após a mistura das soluções, em $\lambda_{\max} = 265$ nm (linha	105



<p>mais grossa). As varreduras foram executadas em intervalo de 3 minutos.</p>	
<p><b>Figura 64:</b> Estrutura Química do AA sob a forma de ascorbato (<math>\text{AscH}^-</math>). Formas encontradas do AA em pH fisiológico (7,4): 99,95% na forma <math>\text{AscH}^-</math>, 0,05% na forma protonada de AA (<math>\text{AscH}_2</math>) e 0,004% como diânion desidroascorbato (<math>\text{Asc}^{2-}</math>). O ascorbato atua como anti-oxidante ao doar um átomo de hidrogênio (<math>\text{H}^\bullet</math> ou <math>\text{H}^+ + \text{e}^-</math>), formando o ânion-radical ascorbila (<math>\text{Asc}^\bullet</math>).</p>	<p>106</p>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Atividades biológicas para a beta-lapachona.	38
<b>Tabela 2:</b> Efeito da concentração de ácido ascórbico na média da produção total de ERO e/ou ERN produzidas pelo surto oxidativo de células RAW 264.7 e mielóides pré-tratadas com PMA em função da incubação por 1 hora. Cerca de 30 células em cada caso.	98

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

$\mu\text{m}$	micrômetro
$\mu\text{M}$	micromolar
AA	ácido ascórbico
AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
$\text{Asc}^\bullet$	ânion radical semidesidroascorbato
$\text{AscH}^-$	ascorbato
$\text{AscH}_2$	ácido ascórbico (vitamina C)
Beta-lap	beta-lapachona
C ou c	concentração
cm	centímetro
CTR	controle
CoQ	coenzima Q
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DCFH	2',7'-diclorodihidrofluoresceína
D-MEM	meio de cultura ("Dulbecco's Modified Eagle Medium")
DMSO	dimetilsulfóxido
DHR	diidrorodamina
DNA	ácido desoxirribonucléico
$D_0$	coeficiente de difusão
$E$ e $E_i$	potencial aplicado
ECSS	eletrodo de calomelano saturado de sódio
EO	estresse oxidativo
Eq	equação
ER	espécies reativas
ERN	espécies reativas de nitrogênio
ERO	espécies reativas de oxigênio
ERON	espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
ESR	espectroscopia de ressonância de spin do elétron
EtOH	etanol
F	constante de Faraday

GSH	glutationa
HO•	radical hidroxila
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
iNOS	óxido nítrico sintase induzida
K	constante de equilíbrio
K <sub>d</sub>	constante de dissociação
K <sub>f</sub>	constante de formação
LPS	lipopolissacarídeo
mg	miligrama
M <sup>n+</sup>	metal
NaNO <sub>2</sub>	nitrito de sódio
ENH	eletrodo padrão de hidrogênio
NO	óxido de nitrogênio
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	íon nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	íon nitrato
NQO1	NAD(P)H:quinona oxidoreductase
n <sub>e</sub> <sup>t</sup> ou n	número total de elétrons
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	ânion radical superóxido
ONOO <sup>-</sup>	peroxinitrito
pA	picoampere (10 <sup>-12</sup> A), onde ampère é uma unidade de medida usada para medir a intensidade de uma corrente elétrica
pC	picocoulomb (10 <sup>-12</sup> C), onde coulomb é o a unidade do sistema internacional para carga elétrica.
PBS	tampão fosfato (“phosphate buffer solution”)
PMA	1-forbol 12-miristato-13-acetato
PLB-985	linhagem de células mielóides
pH	potencial hidrogeniônico
Q	quinona
Q•	semiquinona
QH <sub>2</sub>	hidroquinona
r	raio
RAW 264.7	linhagem de macrófagos
RO•	radical alcóxila

RPM	rotação por minuto
SOD	superóxido dismutase
T	temperatura
TNF- $\alpha$	fator- $\alpha$ de necrose tumoral
UV	ultravioleta
V	volt
$\lambda_{\max}$	comprimento de onda máximo
$\gamma$	gama
$\varphi$	fluxo

## RESUMO

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas, é parte integrante do metabolismo e é observada em diversas condições fisiológicas. Quando sua produção é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, com predomínio dos oxidantes. A liberação de ERO e ERN em macrófagos individuais da linhagem RAW 264.7 foi estudada em tempo real, em ausência e presença de quinonas (alfa- e beta-lapachonas) e de ácido ascórbico. A detecção eletroquímica seletiva de ERO e ERN, em conjunto e individualmente foi conduzida, utilizando-se microeletrodos de fibra de carbono platinizada, posicionados a distâncias micrométricas de uma célula, sempre em relação a controles. Os resultados do tratamento com beta-lapachona (0,1 a 100  $\mu\text{M}$ ), com 1 hora de incubação, mostram que ocorre a diminuição de ERON liberados pelos macrófagos. Contrariamente, quando o tempo de tratamento aumenta (4 e 6 horas) para a concentração de 1  $\mu\text{M}$ , ocorre o aumento da quantidade de espécies reativas liberadas. Em concentração de 10  $\mu\text{M}$  e com tempo de tratamento acima de 4 horas ocorre morte celular. A natureza exata das espécies eletroativas liberadas foi caracterizada e o fluxo original foi determinado em termo de  $\text{O}_2^\bullet$  e  $\text{NO}^\bullet$ . No tratamento de 1 hora com 10  $\mu\text{M}$  de beta-lapachona, houve diminuição do surto oxidativo relacionado principalmente às ERNs. A quantidade de ERO, em termos de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi muito maior do que o controle. Em diferentes condições, com 1  $\mu\text{M}$  com 4 horas de tratamento, a quantidade de ERO, em termos de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^\bullet$  e  $\text{NO}_2^-$ , foi maior que o controle. Nas duas condições, obteve-se a diminuição acentuada de  $\text{ONOO}^-$ . Por outro lado, a incubação com alfa-lapachona não foi capaz de alterar significativamente a liberação de ERON pelos macrófagos, mesmo após 24 horas de tratamento. A concentração citotóxica observada para a alfa-lapachona foi dez vezes maior quando comparada com a beta-lapachona. Para contornar problemas relacionados à solubilidade e biodisponibilidade da beta-lapachona, fez-se uso da ciclodextrina. A espectroscopia no UV/Vis foi utilizada para monitorar o fenômeno de inclusão de beta-lapachona na cavidade da beta-ciclodextrina, com análise do efeito competitivo do etanol. O valor da constante de associação entre a beta-lapachona e a beta-ciclodextrina, em tampão fosfato, foi de  $15 \pm 5 \text{ M}^{-1}$ , mostrando que a presença de etanol afeta a formação do complexo. A amperometria utilizando ultramicroeletrodos de fibra de carbono platinizada permitiu investigar quantitativa e cineticamente o efeito total do ácido ascórbico no surto oxidativo produzido por células individuais pertencentes a duas diferentes linhagens derivadas de células imunes: macrófagos (RAW 264.7) e fagócitos PLB-985. Medidas amperométricas finas realizadas em células individuais confirmaram que o ácido ascórbico pode estimular ou atenuar o surto oxidativo produzido por cada linhagem celular, afetando a produção primária de  $\text{NO}^\bullet$  das células. Assim, a vitamina C reduz o fluxo primário de  $\text{NO}^\bullet$  nas células PLB-985 pré-tratadas com PMA, enquanto aumenta o fluxo primário de  $\text{NO}^\bullet$  em macrófagos RAW 264.7. Esses estudos demonstram a vantagem dos métodos eletroquímicos para analisar em tempo real e quantitativamente o efeito farmacológico de compostos ativos em células, no caso de surto oxidativo.

## ABSTRACT

The production of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) is a metabolic situation, observed in different physiological conditions. When their production is exacerbated, there is an efficient antioxidant system able to control and re-install the homeostasis. Oxidative stress results from an acute and chronic imbalance between the production of ROS and antioxidant capacities of living cells and organisms. In the present case, the release of bursts of ROS and RNS by individual macrophages RAW 264.7 was investigated, in real time, in absence and presence of quinones (alpha- and beta-lapachones) and ascorbic acid. A selective electrochemical detection of each ROS or RNS was conducted at platinized carbon fiber microelectrodes positioned at micrometric distances from single cells, always compared to controls. The results show that the presence of beta-lapachone with 0.1 to 100  $\mu\text{M}$ , within one hour of incubation, leads to a decrease of RONS release by macrophages. Conversely, when the incubation time increases (4 hours and more), for concentrations of 1  $\mu\text{M}$  of *ortho*-quinone, the quantity of the released species increases. Finally, the increasing of the concentration up to 10  $\mu\text{M}$  with four hours of incubation and more is associated to cell death. The exact nature of the released electroactive species was characterized and the original flux could be reconstructed in terms of  $\text{O}_2^\bullet$  and  $\text{NO}^\bullet$ . In the first hour, with 10  $\mu\text{M}$ , the decrease of the oxidative burst concerns mainly the RNS species. The amount of ROS, quantified in terms of  $\text{H}_2\text{O}_2$  was shown to be higher than in control. At concentration of 1  $\mu\text{M}$  and after longer time incubation, i. e., 4 hours, the amount of ROS, quantified in terms of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{O}_2^\bullet$  and  $\text{NO}_2^-$  was shown to be higher than in control. It was observed which  $\text{ONOO}^-$  was decreased in both situations. On the other hand, alpha-lapachone was unable to significantly increase ROS and RNS production in macrophage cells, even after 24 hours of incubation. The cytotoxic concentration observed for alpha-lapachone was ten times higher when compared with beta-lapachone. To overcome solubility and bioavailability problems with beta-lapachone, beta-cyclodextrin was used. UV/vis spectroscopy has been used to monitor the inclusion phenomena of beta-lapachone within the cavity of beta-cyclodextrin, together with studies concerning the competitive effects of ethanol concentration on this behavior. A value of  $15 \pm 5 \text{ M}^{-1}$  was found for the association constant between beta-lapachone and beta-cyclodextrin in phosphate buffer. This clearly indicates that the equilibrium between the free and the complexed substrate is decreased in the presence of EtOH. Amperometry at platinized carbon fiber ultramicroelectrodes allowed quantitative and kinetic investigations of the overall effect of ascorbic acid on oxidative stress responses produced by single cells pertaining to two different cell lines derived from immune cells: macrophages RAW 264.7 and phagocytes PLB-985. These fine and minute amperometric measurements performed on single cells confirmed that in contradiction with its alleged universal anti-oxidant properties, ascorbic acid may affect positively or negatively the RNS content of oxidative bursts produced by each cell type, through affecting the primary production of  $\text{NO}^\bullet$  by the cells. So, vitamin C acts exclusively as an anti-oxidant (viz., reduced the primary  $\text{NO}^\bullet$  flux) onto PMA-treated PLB 985 cells, thus decreasing the quantity of RNS released by these granulocyte-type cells. Conversely, it gives rise to a prooxidant activity (viz., increased the primary  $\text{NO}^\bullet$  flux) onto RAW267.4 macrophage cells, increasing their production of RNS species. These studies demonstrate the advantage of electrochemical methods for analyzing in real-time and quantitatively the effect of pharmacologically active compounds in cells, in case of oxidative burst.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Introdução geral

O balanço redox em líquidos biológicos, organelas, células ou tecidos é determinado pela presença de pares redox responsáveis pelo fluxo de elétrons. Esses sofrem freqüentes interconversões entre o estado reduzido e o oxidado. Alguns dos pares redox são interligados (“redox cycling”), outros constituem sistemas redox independentes. O balanço redox na célula relaciona-se à soma dos produtos do potencial de redução e da capacidade redutora de uma série de pares redox acoplados, presentes. A capacidade redutora pode ser estimada pela determinação da concentração de espécies reduzidas em um par redox e o potencial de redução pelo emprego da equação de Nernst (Schafer & Buettner, 2001).

Em termos matemáticos, isto pode ser representado pela equação abaixo:

$$\text{Balanço redox} = \sum_{i=t}^{n(\text{acoplados})} E_i \times [\text{espécies reduzidas}]_i$$

Onde  $E_i$  é o potencial de redução da semi-célula para um dado par redox e  $[\text{espécie reduzida}]_i$  é a concentração das espécies reduzidas em um par redox.

Mudanças do balanço redox de sistemas biológicos podem causar o estresse oxidativo, que é o resultado do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante. A intensidade e patogenicidade destes desequilíbrios vão depender, naturalmente, das concentrações locais de espécies pró e antioxidantes, das constantes de velocidade de reação com moléculas-alvo e da compartimentalização celular destes processos, em que fatores de solubilidade e difusibilidade são determinantes (Grow & Ischiropoulos, 2001). O desbalanço redox resultante do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, com predomínio dos oxidantes, pode causar conseqüente dano aos constituintes micro-, macromoleculares e organelas (Pryor e cols., 2006)

O estresse oxidativo (EO), ou desbalanço redox, está relacionado a várias doenças incluindo câncer, arterosclerose, doenças de Parkinson, Alzheimer e cardiovasculares, em processos inflamatórios e em envelhecimento, entre outros (Vasconcelos e cols., 2007). Para entender o mecanismo dessas doenças que envolvem o desbalanço redox, um método analítico para detectar e mensurar as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, presentes ou liberadas, em modelos de célula viva, é muito importante (Olson e cols., 2005). Embora existam vários métodos para avaliar o dano oxidativo à célula, por meio de quantificação de



produtos da peroxidação de lipídeos, de aminoácidos e proteínas e de adutos oxidados de DNA, eles não avaliam diretamente o desbalanço redox (Wang e Joseph, 1999; Arbault e cols., 1995).

Desde que o mecanismo de ação de inúmeros fármacos está relacionado à geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON), a investigação direta dessas espécies ligadas ao desbalanço redox representa um desafio, já que a quantidade liberada das mesmas é infinitamente pequena (na faixa de atomóis a femtomóis) e o tempo do evento é muito curto. Esses eventos apresentam grande dificuldade para a detecção analítica em termos da razão sinal/ruído, assim como pela necessidade de que algumas medidas sejam executadas com células vivas isoladas (Shao e Mirkin, 1997).

A solução deste problema pode estar relacionada, entre outras, à utilização de dispositivos eletroanalíticos, desde que os mensageiros químicos sejam eletroativos e eletroquimicamente identificáveis. Por exemplo, o posicionamento de um eletrodo com dimensões pequenas (na faixa de micrometros) a uma distância micrométrica de uma célula viva deverá assegurar uma relação sinal/ruído satisfatória na captação das espécies químicas liberadas pela célula. Assim, a junção do ultramicroeletrodo/célula viva constitui uma sinapse artificial com as vantagens a ela inerentes (Amatore e cols., 2000).

Em vista disto, a presente introdução abordará aspectos relevantes ligados a Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio (ERON) e sobre o Ácido Ascórbico que é um dos principais representantes do sistema antioxidante não-enzimático. Serão também feitas considerações a respeito das Quinonas, com ênfase especial em alfa e beta-lapachonas. A beta-lapachona apresenta inúmeras ações farmacológicas e entre os vários mecanismos de ação biológica propostos, promove a geração de ERON. Serão também abordadas algumas técnicas utilizadas para detecção de ERON, dando enfoque às análises via eletroquímica e principalmente em determinações de algumas espécies reativas ( $H_2O_2$ ,  $NO^*$ ,  $ONOO^-$ ,  $NO_2^-$ ), em célula viva e única.

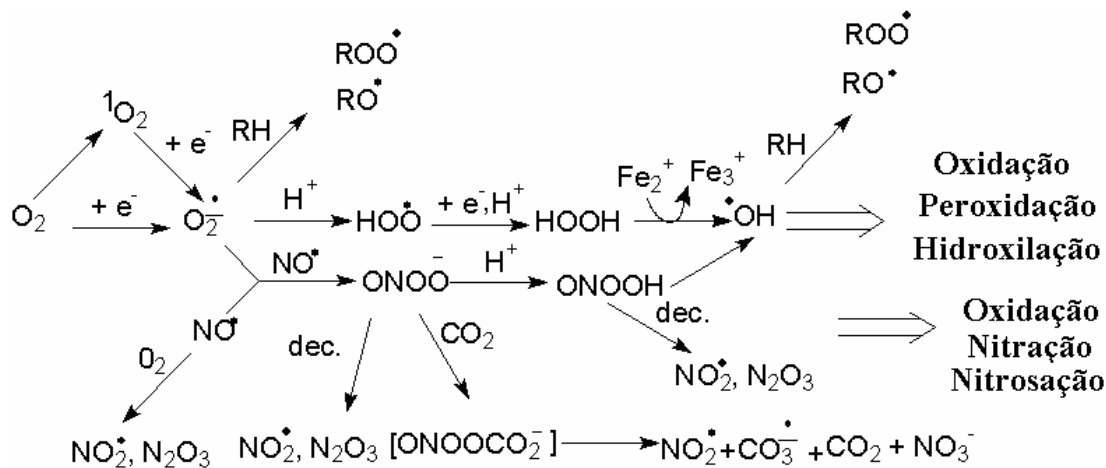
## 1.2 Espécies Reativas e Antioxidantes

Os radicais livres são definidos como moléculas contendo um ou mais elétrons desemparelhados. A presença de elétrons desemparelhados geralmente lhes confere considerável grau de reatividade. Os radicais derivados de oxigênio e nitrogênio representam a mais importante classe de tais espécies geradas no sistema vivo (Schulz e cols., 2000; Valko e cols., 2004). São comumente conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN).

Células vivas, incluindo aquelas de humanos, animais e plantas, são expostas a inúmeros fatores que podem provocar a liberação de ERON, entre eles, fatores provenientes de fontes endógenas, como a respiração mitocondrial, o metabolismo da citocromo P450, a ativação do mecanismo inflamatório celular e/ou de fontes exógenas. Como exemplos de fontes exógenas, são relatadas a exposição a poluentes, a radiação ionizantes, aos raios X e gama (Halliwell, 2007; Valko e cols., 2004; Barzilai e cols., 2004; Benhar e cols., 2002; Thorpe e cols., 2004; Arbault e col., 2004).

O uso do termo espécie reativa de oxigênio não é sempre um termo apropriado, já que  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NO}^\bullet$  e  $\text{O}_2^\bullet$  reagem rapidamente com poucas moléculas, enquanto  $\text{NO}^\bullet$  e  $\text{HO}^\bullet$  reagem rapidamente com quase todas, como visto na Figura 1 (Halliwell & Gutteridge, 2007).

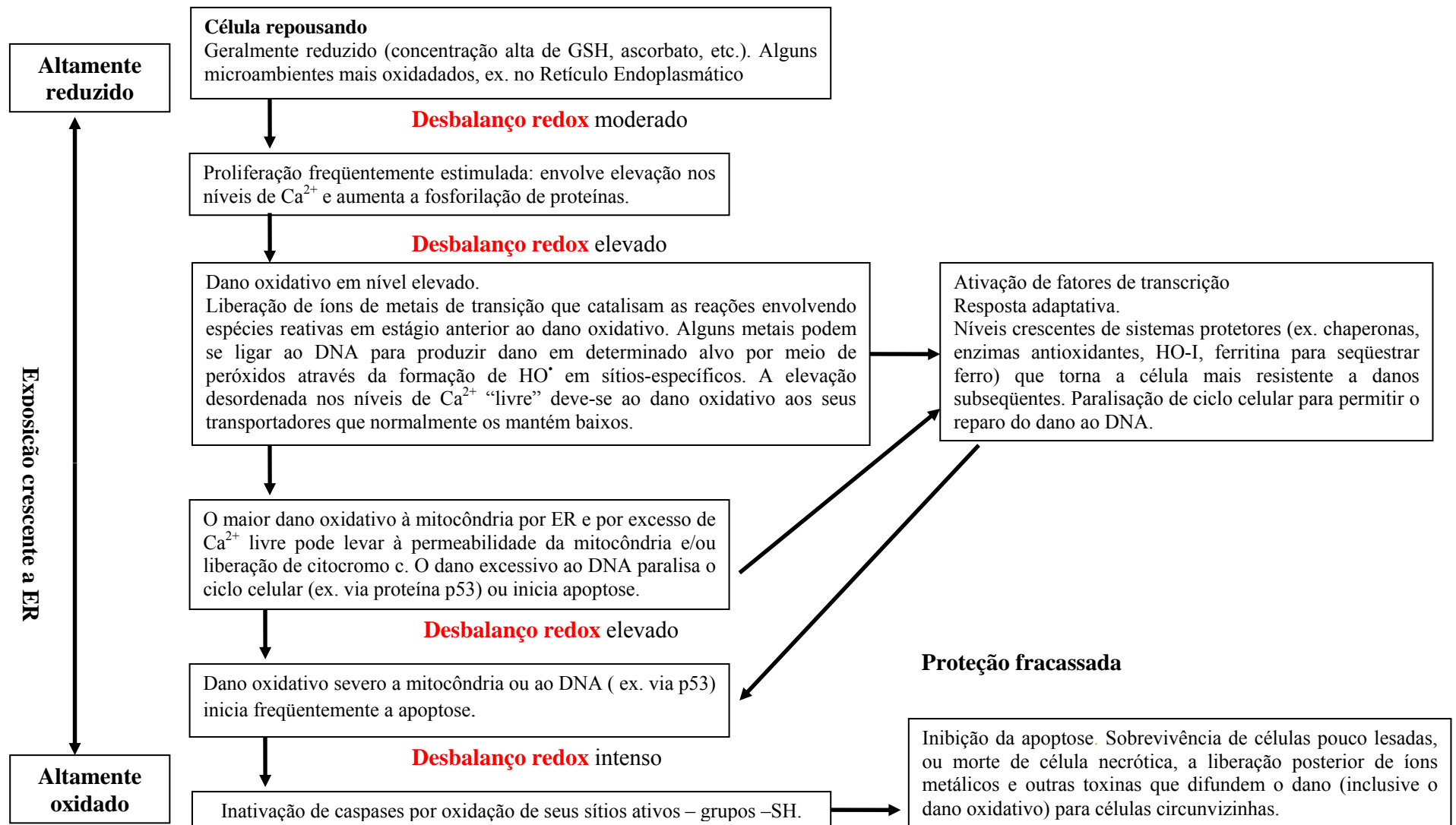
ERO ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HO}^\bullet$ ,  $^1\text{O}_2$ ) e ERN ( $\text{NO}^\bullet$ ,  $\text{ONOO}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ) (Figura 1) têm importante função biológica, em sinalização celular e na fagocitose, quando essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor. Por outro lado, quando sua produção é danosa, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante, que consegue controlar e re-estabelecer o equilíbrio. Daí, ERON têm papel duplo no sistema biológico, com comportamento benéfico ou maléfico para os seres vivos, dependendo da concentração e do local onde sejam geradas (Fialkow e Cols., 2007; Arbault e Cols, 1997; Thorpe e Cols., 2004; Halliwell, 2007).



**Figura 1:** Geração e Destino de ERO e ERN.

Então, o estresse oxidativo será manifestado num sistema biológico se acontecer um aumento à exposição dos oxidantes ou diminuição na capacidade antioxidante do sistema, ou ambos. O sistema de proteção a esses danos pode ser classificado em proteção via participação enzimática e não-enzimática. A família dos antioxidantes não enzimáticos consiste de muitos compostos que podem atuar diretamente como capturadores de ERO, ou indiretamente, através da quelação de metais de transição (Halliwell e Gutteridge, 2007). Esses mecanismos incluem prevenção de danos, indução de mecanismo de reparação e atuam diretamente contra metabólitos nocivos.

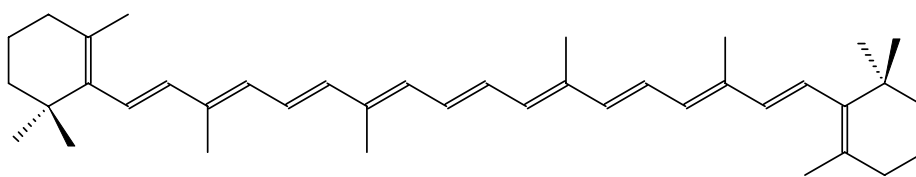
A figura 2 esquematiza fatos decorrentes da exposição crescente do ambiente biológico celular a espécies reativas de oxigênio e suas consequências (Halliwell, 2007).



**Figura 2:** Características do ambiente celular quando é submetido à exposição crescente de ERO (Halliwell, 2007).



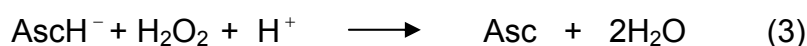
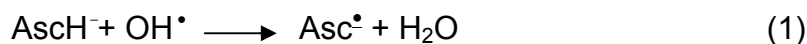
## Ácido Ascórbico (vitamina C)

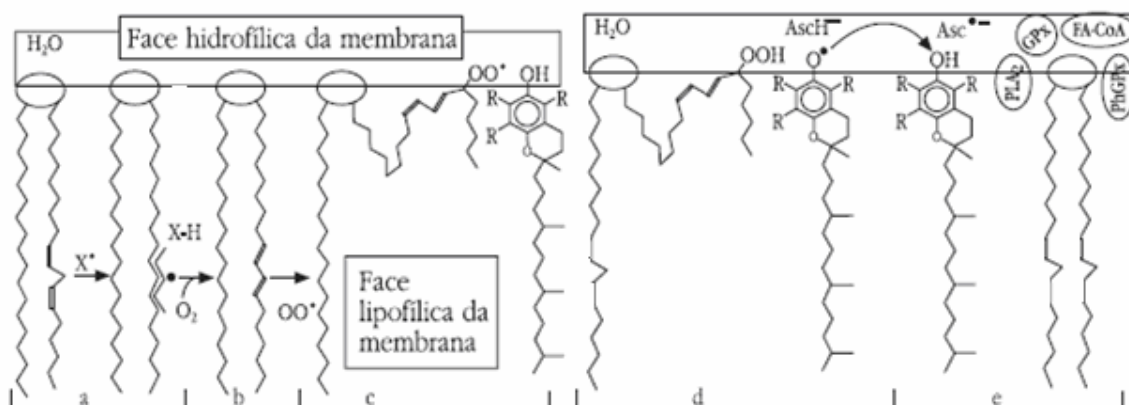


Beta-caroteno

### 1.2.1 Ácido Ascórbico

O ácido ascórbico é considerado o mais importante antioxidante em fluidos extracelulares. Em pH fisiológico (7,4), 99,95% da vitamina C ( $\text{AscH}_2$ ) encontra-se na forma de ascorbato ( $\text{AscH}^-$ ), que é a forma que atua como antioxidante, ao doar um  $\text{H}^\bullet$  ou  $\text{H}^+ + \text{e}^-$  para um radical livre. O ascorbato ( $\text{AscH}^-$ ) atua como antioxidante sobre EROs, em ambiente biológico aquoso, resultando na formação do ânion radical semidesidroascorbato ( $\text{Asc}^\bullet$ ), ou ascorbila, que é pouco reativo (1). Assim também, o ascorbato atua eficientemente sobre o  $\text{O}_2^\bullet$  (eq. 2) (constante de velocidade ( $k$ )  $> 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , em pH 7,4), sobre o  $\text{H}_2\text{O}_2$  (eq. 3), sobre o  $\text{HO}^\bullet$  (eq. 1) ( $k > 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , em pH 7,4) e o  $\text{ROO}^\bullet$  (eq. 4) e ainda sobre o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2^\bullet$ ). É também capturador de  $\text{HOCl}$ ,  $\text{ONOOH}$ , de agentes de nitrosação, de  $\text{O}_3$  e  $\text{NO}_2^\bullet$  em fluidos corporais humanos (Halliwell & Gutteridge, 2007, pg 160-166). O ascorbato pode atuar diretamente nas membranas celulares, por impedir o início da peroxidação lipídica ou indiretamente por regenerar a vitamina E, que atua como antioxidante na fase lipofílica da membrana (Figura 3) (Hamre e cols., 1997).





**Figura 3:** Ação antioxidante das vitaminas E e C na peroxidação lipídica das membranas celulares: (a) Abstração de H• do lipídio da membrana celular devido ao ataque do radical livre X•; (b) Em presença de O<sub>2</sub>, ocorre formação do radical peroxila R–OO•; (c e d) A vitamina E remove o radical peroxila; (d e e) O ascorbato (AscH<sup>-</sup>) pode reciclar vitamina E; (e) Enzimas PLA<sub>2</sub> (Fosfolipase A<sub>2</sub>) GSH-Px (Glutathiona Peroxidase) PhGSH-Px (Fosfolipídio glutathiona peroxidase) em presença de FA-CoA (Fatty Acyl-Acilgraxo – Coenzima A) podem reparar o dano do ácido graxo. Adaptado de Buettner (1993).

A vitamina C pertence à família de antioxidantes com características especiais, possuem baixo potencial de oxidação e/ou são propensas a diminuir a concentração de radicais orgânicos reativos, por formarem radicais mais estáveis, portanto, menos reativos, evitando, assim, peroxidação significativa, devido à rápida propagação de cadeias de radicais oxidativos. Por exemplo, a concentração de ácido ascórbico no cérebro é mantida em concentrações extremamente altas para proteger neurotransmissores catecolamínicos de sua oxidação espontânea (Terpstra e cols., 2006). Entre os papéis benéficos, vários parecem estar obviamente relacionados à sua atuação na prevenção ou auxiliar na cura de condições inflamatórias provocadas por uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO e ERN). O ácido ascórbico ajuda a controlar os níveis de estresse oxidativo celular pela reação com ERO e ERN, prevenindo, assim, sua acumulação em células e tecidos (Lenton e cols., 1999). Assim, o ácido ascórbico estabiliza e ajuda a recuperar de respostas alérgicas, a diminuir várias inflamações gerais (feridas, artrite, reumatismo, diabetes, úlceras, glaucoma, etc) ou específicas, como aquelas sofridas por pacientes de câncer ou AIDS. Muitas outras propriedades foram a ele associadas e essas não estão diretamente relacionadas a estados

inflamatórios, como a ajuda no controle de colesterol, a prevenção de fragilização dos ossos, entre outros processos (Frank e cols., 2006).

Os efeitos benéficos do ácido ascórbico foram recentemente questionados. A vitamina C e seu derivado ascorbato, *in vitro*, sob circunstâncias especiais, comportaram-se de maneira pró-oxidante (Rice, 2000). Pesquisas (Rose e Bode, 1993; Otero e cols., 1997; Bode e cols., 1993) descreveram que derivados de ascorbato promovem a geração de radicais prejudiciais e levam à peroxidação lipídica. Os efeitos adversos relatados são: acidose metabólica, distúrbios gastrointestinais, destruição da vitamina B12, fadiga e esterilidade e que estão relacionados a altas doses (Griffiths e Lunec, 2001; Rivière e cols., 2006).

Esses resultados evidenciam que derivados de ascorbato podem atuar de maneira oposta dependendo das células, sua natureza e condições. Essa controvérsia merece atenção, visto que a vitamina C é um importante nutriente na dieta humana (Poulsen e cols., 1998).

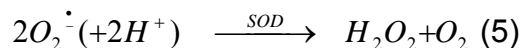
### 1.2.2 Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio. Detalhamento

As principais ERO distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila ( $\text{HO}^\bullet$ ), superóxido ( $\text{O}_2^\bullet$ ), peroxila ( $\text{ROO}^\bullet$ ) e alcoxila ( $\text{RO}^\bullet$ ); e os não-radicalares: oxigênio ( $\text{O}_2$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ). Dentre as ERN, incluem-se o óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) e peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ). Enquanto alguns deles podem ser altamente reativos no organismo atacando lipídios, proteínas e DNA, outros são reativos apenas com os lipídios (Halliwell & Gutteridge, 2007; Valko e cols., 2006; Chen e cols., 1998).

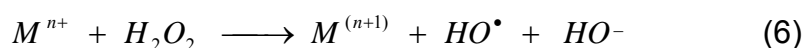
O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é gerado *in vivo* por meio da dismutação do ânion-radical superóxido ( $\text{O}_2^\bullet$ ), por enzimas oxidases ou pela  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos. As mitocôndrias são importantes fontes de  $\text{O}_2^\bullet$  e, como a presença deste ânion-radical pode causar sérios danos, elas são ricas em superóxido dismutase (SOD) que o converte em  $\text{H}_2\text{O}_2$  (eq. 5) ( $k = 2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , T 25° C, pH 7.4) (Amatore e Arbault, 2007). Este último é então eliminado por catalases, glutathiona peroxidase e peroxidases ligadas à tioredoxina. As células que fagocitam, como os macrófagos, produzem grande quantidade dessa espécie para o combate de vírus, bactérias e outros corpos estranhos (Griendling e FritzGerald, 2003). Sob condições fisiológicas, a sua



produção é estimada em cerca de 2 % do oxigênio total consumido pelo organismo (Valko e cols., 2004).

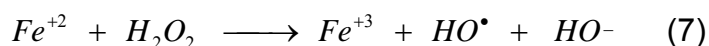


Numerosas respostas celulares são iniciadas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Muitas delas ainda precisam ser caracterizadas. O principal fator de risco do peróxido de hidrogênio para a célula é proveniente de sua facilidade em atravessar a membrana celular e organelas e levar à modificação das subunidades inibidoras do fator nuclear da transcrição citoplasmática. Devido ao fato da célula possuir metais de transição, ocorre geração do radical HO• em seu interior (eq. 6). Os cátions metálicos mais importantes para a ocorrência desta reação são Cu<sup>1+</sup> e Fe<sup>2+</sup> (Thorpe e cols., 2004; Liochev e Fridovich, 2007).

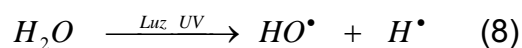


onde M = metal.

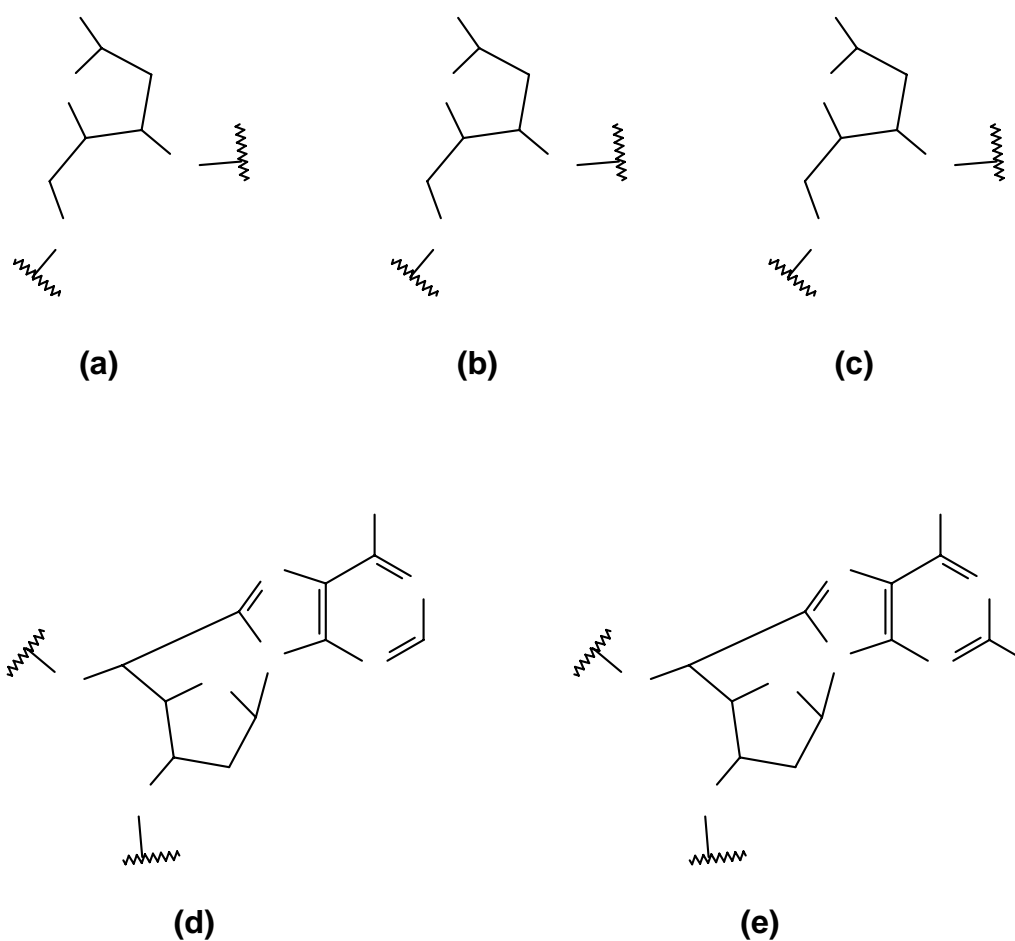
A reação do Fe<sup>2+</sup> com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reação de Fenton, pode ser representada como (eq. 7):

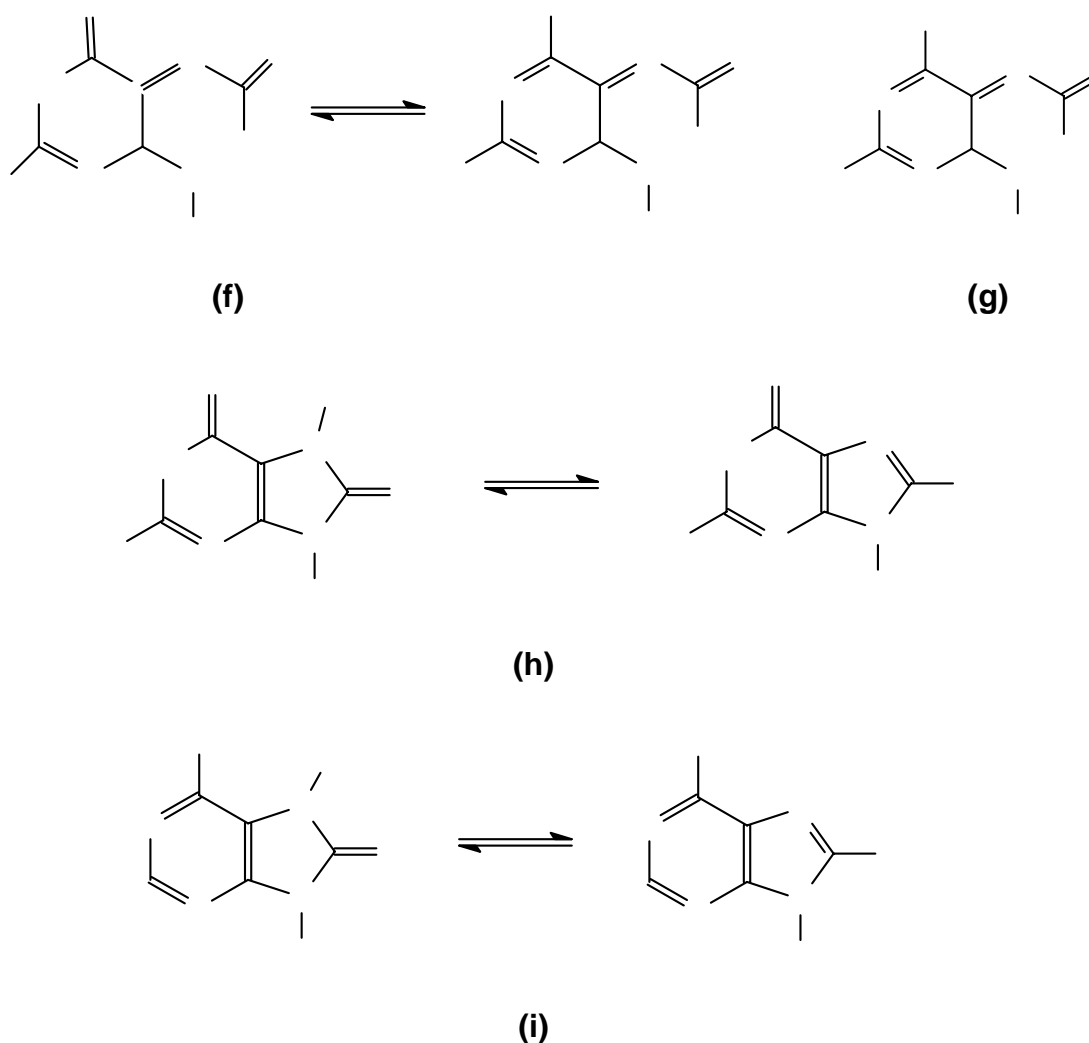


Outra importante espécie de oxigênio é o radical hidroxila (HO•), sendo considerado o mais nocivo para o ambiente biológico. Ele é altamente reativo com uma meia-vida em solução aquosa menor que 1 nanossegundo, contém um elétron desemparelhado, abstrai hidrogênio das moléculas ou ataca as moléculas insaturadas por adição. Ele retira hidrogênios atômicos dos lipídios dando início à peroxidação lipídica, pode oxidar compostos sulfídricos e atacar o DNA. O radical HO• é formado no organismo pela reação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com metais de transição (Eq. 7) e pela homólise da água por exposição à radiação ionizante. A incidência de radiação no ultravioleta, radiação γ e raios X pode produzir o radical HO• nas células da pele (Eq. 8). (Cash et al, 2007; Valko e cols., 2004).



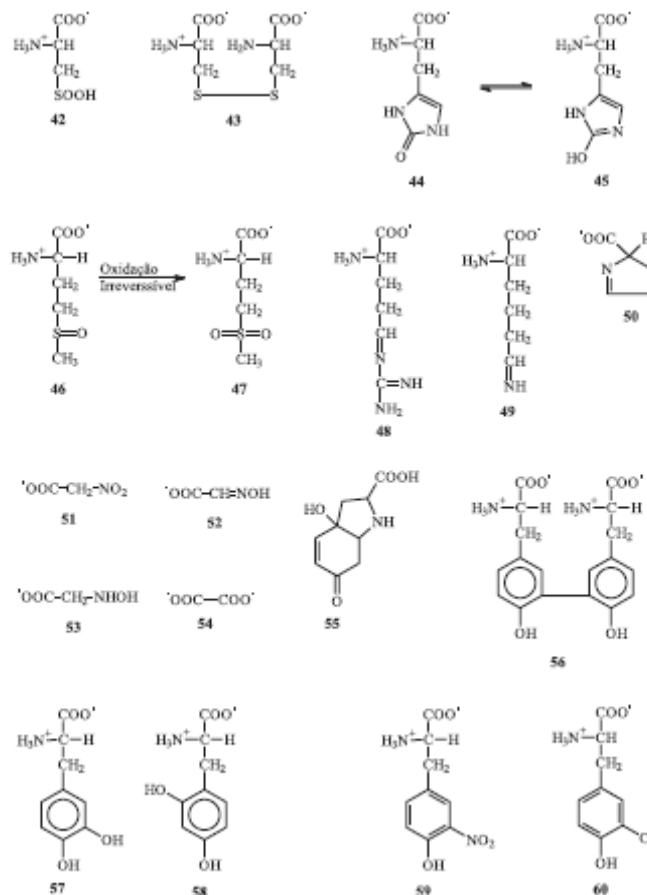
A produção de HO• nas proximidades do DNA poderá ocasionar danos ao DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e das mitocôndrias. No DNA, ele ataca tanto as bases nitrogenadas quanto a desoxirribose. O ataque ao açúcar pode ser realizado por abstração de um dos átomos de hidrogênio (a-c) e quase sempre leva à ruptura da cadeia de DNA. O mecanismo dessa ruptura tem como principais produtos 5',8-ciclo-2'-desoxiadenosina 8OHdA (d) e 5',8-ciclo-2'-desoxiguanosina 8OHdG (e). A eletrofilia do HO• possibilita sua interação com as bases nitrogenadas por adição às insaturações em sítios de alta densidade eletrônica. Assim, reage com as bases púricas por adição a C-4 e C-8, e em menor proporção com C-5, gerando 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FapyG) (f), 4,6-diamino-5-formamidopirimidina (FapyA) (g), 8-oxo-7,8-diidro-2'-desoxiguanosídeo (8-oxoG) (h), 8-oxoA (i) (Figura 4) (Barreiros e cols., 2006).





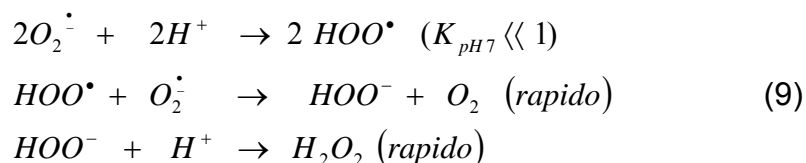
**Figura 4:** Principais produtos da oxidação do DNA por ERO e ERN (Barreiros e cols., 2006).

Nos aminoácidos e proteínas,  $\text{HO}^\bullet$  pode reagir na cadeia lateral, onde ataca preferencialmente cisteína, histidina, triptofano, metionina e fenilalanina, e, em menores proporções, arginina e asparagina. Os ataques aos aminoácidos que compõem as proteínas podem gerar danos como quebras de ligações com ou sem geração de fragmentos e ligações cruzadas, o que pode ter como consequência, a perda de atividade enzimática, dificuldades no transporte ativo em membranas celulares, citólise e morte celular. O ataque ocorre por adição do radical ou por abstração de hidrogênio. Todos os aminoácidos podem sofrer abstração do hidrogênio do carbono  $\text{NH}_2\text{-C}\alpha\text{-COO}^-$  ligado ao carboxilato e ao grupo amino (Figura 5).



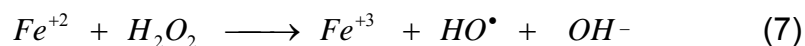
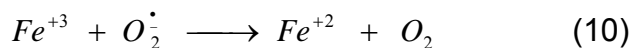
**Figura 5.** Principais produtos da oxidação dos aminoácidos e proteínas por ERO e ERN (Barreiros e cols., 2006).

Ao contrário da maioria das moléculas com elétrons desemparelhados, o ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) é inerte. Em meio aquoso, sua reação principal é a dismutação, o ânion radical superóxido pode ser consumido sem o intermédio de enzimas, em pH fisiológico, de forma mais lenta ( $k = 2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , T 25° C, pH 7.4), na qual se produz uma molécula de peróxido de hidrogênio e uma molécula de oxigênio (Eq. 9) (Babior, 1997; Amatore e Arbault, 2007).

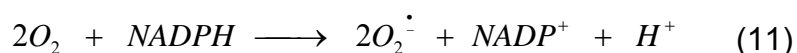


O ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) participa de certos processos químicos importantes no contexto biológico. O principal deles é auxiliar na produção de radical

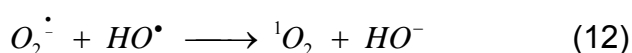
HO•, através da redução de quelatos de Fe<sup>+3</sup> formando Fe<sup>+2</sup>. Assim, o HO• pode ser obtido através da reação de Haber-Weiss (Eqs. 10 e 7) (Babior, 1997).



O radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> é gerado *in vivo* por fagócitos ou linfócitos e fibroblastos durante o processo inflamatório, para combater corpos estranhos. Os fagócitos produzem o radical superóxido com auxílio da enzima NADPH oxidase, que catalisa a redução por um elétron do O<sub>2</sub> com gasto de uma molécula de NADPH (Eq. 11) (Shi e cols., 1996).



O radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> também reage com o radical HO• produzindo oxigênio singlete <sup>1</sup>O<sub>2</sub> e com o óxido nítrico (NO•) produzindo peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), respectivamente (Eqs. 12 e 13). Apesar destes efeitos danosos, o radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> tem importância vital para as células de defesa e sem ele o organismo estaria desprotegido contra infecções causadas por vírus, bactérias e fungos (Babior, 1997).



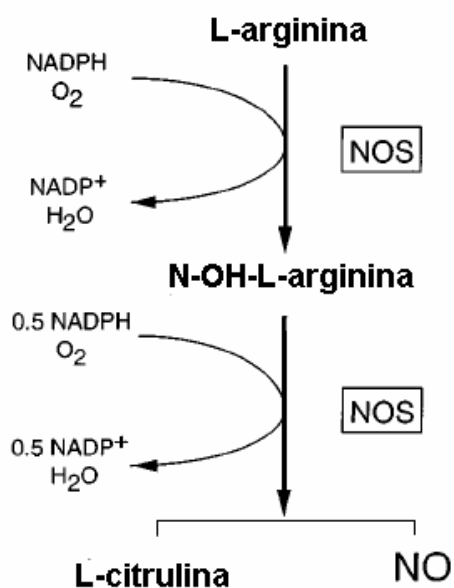
As células do sistema imune produzem o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) e o óxido nítrico (NO•) durante o processo de inflamação. Dessa forma, os macrófagos possuem um potente sistema enzimático gerador de anion superóxido, NADPH oxidase. Sob essas condições, o óxido nítrico (NO•), que não é suficientemente reativo para atacar o DNA diretamente, pode reagir com o radical ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), em velocidade próxima ao limite de difusão (~ 3·10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) para produzir quantidades significativas de uma molécula mais ativa e perigosa, o ânion peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), que é oxidante e pode causar fragmentação ao DNA e

provocar oxidação lipídica. Assim, a toxicidade do NO<sup>•</sup> está ligada a sua habilidade para combinar com o ânion superóxido (Xia e Zweter, 2007; Fialkow e cols., 2007).

Assim como as espécies reativas de oxigênio, as ERN não podem ser consideradas como meramente subprodutos tóxicos, e mais apropriadamente, eles são componentes integrais do metabolismo basal e função celular. Inúmeros fatores podem determinar se o efeito de sua presença é benéfico ou deletério (Espey e cols., 2000). A alta produção de ERN é chamada de estresse nitrosativo. Este pode levar a reações de nitrosilação que podem alterar a estrutura de proteínas e então modificar sua função normal.

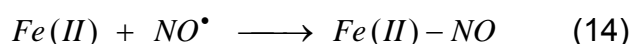
A química do NO<sup>•</sup> pode ser dividida em duas categorias básicas, os efeitos diretos e os efeitos indiretos, baseados principalmente em sua concentração. Os efeitos diretos estão ligados a reações diretas do NO<sup>•</sup> com alvos biológicos. Reações de NO<sup>•</sup> com metaloproteínas, como hemoglobina, para formar um complexo nitrosil-heme, exemplifica efeitos diretos, que predominam em baixos fluxos de NO<sup>•</sup>. Efeitos indiretos são aqueles em que o NO<sup>•</sup> inicialmente se combina com outro reagente, como o ânion radical superóxido, antes de participar na modificação química de alvos biológicos (Quijano e cols., 2005; Espey e cols., 2000).

O óxido de nitrogênio é um radical abundante que age como um importante sinalizador biológico oxidativo em diversos processos fisiológicos, que incluem neurotransmissão, regulação da pressão sanguínea, mecanismos de defesa, relaxação muscular e regulação imune (Espey e cols., 2000; Vasconcelos e cols., 2007; Meßmer e cols., 1995). O NO<sup>•</sup> é sintetizado no organismo pela ação das várias isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS), a partir da *L*-arginina, oxigênio e NADPH, gerando também NADP<sup>+</sup> e citrulina (Figura 6) (Macmicking e cols., 1997).

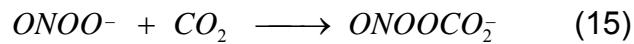


**Figura 6:** Reação bioquímica da formação de NO em células (Macmicking e cols., 1997).

O óxido de nitrogênio se liga, também, a certos metais de transição, e a maioria de seus efeitos fisiológicos são exercidos pela ligação inicial aos grupos heme-Fe(II) nas enzimas ciclase gualilato (Eq. 14) (Spitsin e cols., 2002). Quando difunde para regiões significativamente distantes de sua fonte, espera-se que o NO<sup>•</sup> reaja com o oxigênio ( $k = 2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) para formar o íon nitrito (Amatore e Arbault, 2007).



O ONOO<sup>-</sup> pode causar inúmeros efeitos, incluindo oxidação ao DNA e proteínas, peroxidação lipídica, inibição da respiração mitocondrial e nitração da tirosina. Além disso, ONOO<sup>-</sup> pode mediar a morte celular via a quebra da fita simples de DNA e a ativação da enzima nuclear polimerase poli(ADPribose). Em meio biológico, o peroxinitrito interage rapidamente com o bicarbonato/dióxido de carbono para formar o ânion nitrosoperoxicarbonato (ONOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup>) (15) que possibilita a geração de radicais intermediários como NO<sub>2</sub><sup>•</sup> e CO<sub>3</sub><sup>•-</sup> ( $k = 3 \cdot 6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) (Sergei e cols., 2002; Espey e cols., 2000).



O peroxinitrito tem uma meia-vida menor que 1 s em tampão fosfato, pH 7,4, sendo suficientemente estável, sob condições fisiológicas, para difundir de seu sítio de formação antes de reagir com as moléculas alvo tais como os lipídios das membranas e os grupos sulfidríla das proteínas. Uma vez protonado, o peroxinitrito se decompõe em radical hidroxila mais dióxido de nitrogênio (Ischiropoulos e cols., 1992; Genestra, 2007).

### 1.3 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio

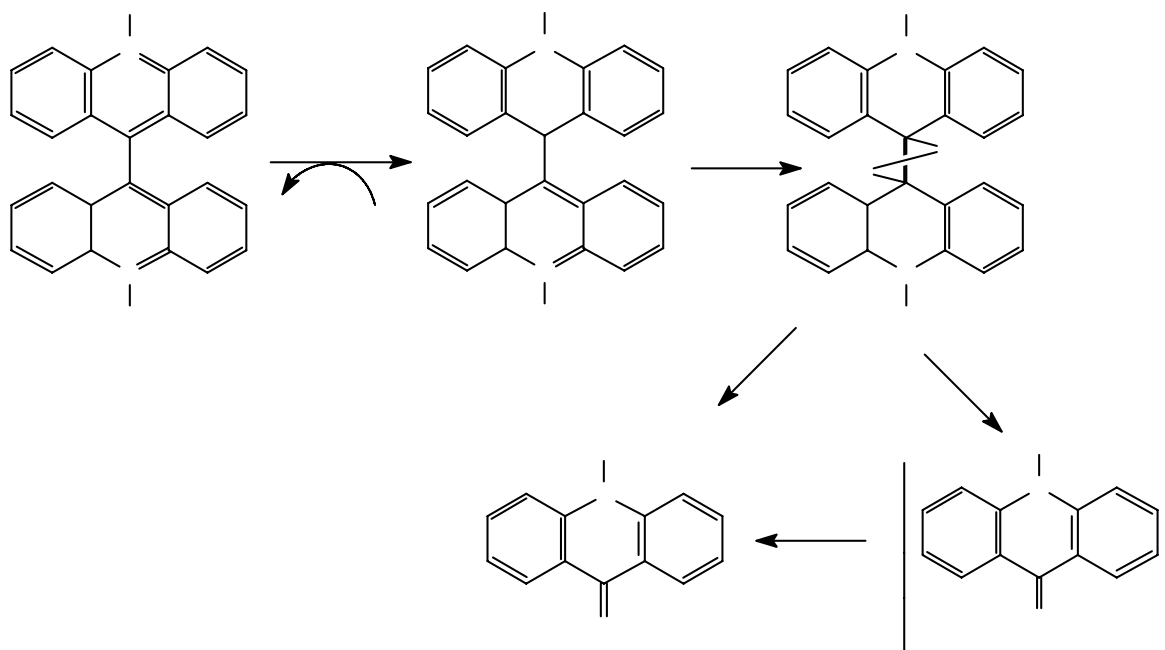
A detecção e a mensuração em sistemas biológicos de espécies reativas de oxigênio receberam grande interesse devido a sua importância nos eventos fisiológicos e patológicos, como mencionado anteriormente. Entretanto, são dificultadas pela alta reatividade e relativa instabilidade dessas espécies. Então, a determinação de ERO tem sido normalmente realizada por medidas indiretas, por meio da quantificação de vários produtos finais resultantes da interação de ERO com os componentes celulares, como lipídios, proteínas ou DNA. A maioria dos métodos para identificação de ERO específicas se baseia nas reações com várias moléculas detectoras que são modificadas por reações químicas específicas para gerar sinais luminescentes ou fluorescentes (Thannickal e Fanburg, 2000; Bartosz, 2006).

Técnicas de fluorescência e luminescência usadas para medir  $\text{ONOO}^-$  são também métodos indiretos que fazem medidas de espécies secundárias. Para que essas técnicas sejam exatas, o dispositivo molecular deve ser completamente específico e altamente sensível para  $\text{ONOO}^-$  dentre outras ERO/ERN que poderão estar presentes. Na prática, essa determinação é difícil.

Serão apresentadas, abaixo, certas limitações de alguns métodos clássicos para a detecção de ERO/ERN. Por exemplo, a lucigenina (10,10-dinitrato de dimetil-biacrinidina) é uma substância que foi muito utilizada como substrato quimio-luminescente para a detecção de ânion radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) em muitos sistemas biológicos. O processo baseia-se em sua habilidade de sofrer redução e depois reagir com o ânion radical superóxido e formar um composto que emite luz. Contudo, mesmo na ausência dessa espécie reativa, a lucigenina pode se auto-

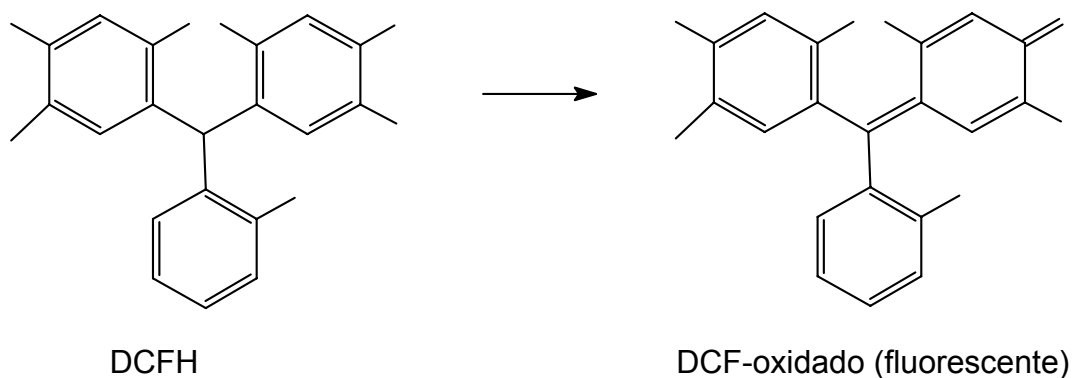


oxidar, após sofrer redução por vários sistemas enzimáticos, ocasionando uma falsa detecção (Figura 7) (Liochev e Fridovich, 2007).



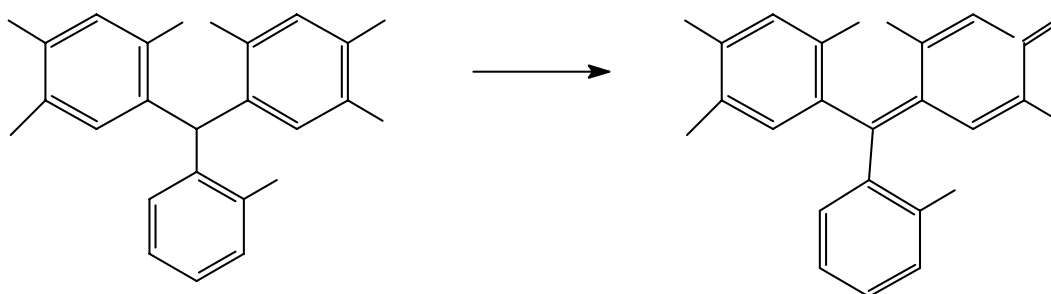
**Figura 7:** Caminho quimioluminescente da lucigenina (Wardman, 2007).

Outra técnica, muito utilizada, é baseada na oxidação do composto não fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH) ao produto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) para detectar a produção intracelular do peróxido de hidrogênio (Figura 8). Essa reação também pode apresentar problema, já que reações com radicais livres com DCFH na presença de peroxidase, mesmo na ausência de peróxido de hidrogênio, podem gerar o DCF fluorescente e consumir  $O_2$  (Wang e Joseph, 1999).

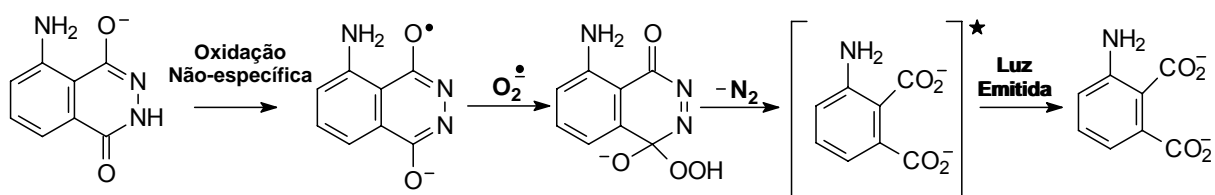


**Figura 8:** Oxidação da 2',7'-diclorodihidrofluoresceína.

Diidrorodamina-123 (DHR-123) (Figura 9) e 2,7-diclorodiidrofluoresceína (DCFH) (Figura 8) são reagentes de dois dos métodos fluorescentes usados na investigação de  $\text{ONOO}^-$  (Crow, 1997). Entretanto, o DHR é oxidável por outras espécies como o citocromo c, HOCl ou  $\text{H}_2\text{O}_2$ , na presença de peroxidases, enquanto que DCFH é oxidável por espécies como  $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{ROO}^\bullet$ ,  $\text{NO}^\bullet$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , citocromo c e xantina oxidase (Halliwell e Whiteman, 2004; Gomes e cols., 2006; Bartosz, 2006). Outros estudos mostram que  $\text{ONOO}^-$  pode ser detectado por sua reação com luminol, com produção de quimioluminescência. Como DHR e DCFH, o luminol também não é específico, ele exibe quimioluminescência via processo em duas etapas, sendo a primeira delas oxidativa. O luminol radicalar obtido a partir da oxidação reage com o oxigênio, há a perda de nitrogênio, gerando o precursor que emite luminescência (Figura 10) (Tarpey e Fridovich, 2001; Halliwell e Whiteman, 2004).



**Figura 9:** Oxidação da Diidrorodamina-123.



**Figura 10:** Caminho quimioluminescente do luminol (Wardman, 2007).

A espectroscopia de ressonância de spin do elétron (ESR) surgiu como o método analítico que mede diretamente e identifica os radicais hidroxila e superóxido. A ressonância de spin de elétrons e a ressonância paramagnética são as técnicas que especificamente e diretamente vêem os spins desemparelhados de radicais livres. Uma limitação significativa dessa técnica é, entretanto, sua baixa

sensibilidade, requerendo concentrações na faixa micromolar, sendo este o valor limite da maioria dos sistemas biológicos, especialmente, em condições aquosas, e à temperatura ambiente. Os radicais livres endógenos produzidos *in vivo* apresentam meia-vida muito curta e estão em baixa concentração, tornando difícil sua detecção direta por ESR. Esta limitação pode ser resolvida pela técnica de “spin trapping” (captura de spin), na qual um composto nitroso ou uma nitrona, por exemplo, reage com os radicais livres e forma um aduto nítróxido mais estável que se acumula, atingindo concentrações na faixa detectável por esse método (Holley e Cheeseman, 1993; Togashi e cols., 2000; Bartosz, 2006).

É importante ressaltar que as técnicas fluorescentes, espectrofotométricas e luminescentes são menos diretas e menos específicas para detecção de radicais livres em relação à espectroscopia de ressonância de spin do elétron. Uma alternativa para conseguir a confiabilidade de uma análise seria combinar as metodologias. Essa estratégia fornece uma análise mais profunda e compreensível dos fatos. Embora o uso da investigação espectroscópica seja, aparentemente, mais simples e fácil para a detecção e mensuração da produção de ERO no sistema celular, há limitações inerentes desta metodologia e muitas fontes de erros.

Como exemplificado acima, os métodos clássicos utilizados para a detecção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, em sistemas biológicos, são indiretos, incluindo a espectroscopia de ressonância de spin de elétrons. Deve-se ressaltar a necessidade de atenção no uso de técnicas analíticas indiretas, para evitar interpretações errôneas e artefatos.

A demonstração da produção de  $\text{NO}^\bullet$  é ainda difícil, sendo na maioria das vezes feita de maneira indireta. Aliás, quase todas as pesquisas pioneiras não analisaram o  $\text{NO}^\bullet$  propriamente dito devido à sua fugacidade, considerando-se a concentração de nitrito e nitrato como prova de sua produção. Outra forma de demonstrar a presença de  $\text{NO}^\bullet$  é via aplicação de inibidores de sua geração ou consumidores do substrato, no qual a diminuição ou ausência do sinal referente à espécie nitrogenada pode ser atribuído à não formação de  $\text{NO}^\bullet$ , devido ao bloqueio da reação da *L*-arginina a *L*-citrulina (Borgmann e cols., 2006; Valko e cols., 2006). Entretanto, o grupo do Professor Amatore mostrou que o fluxo de  $\text{NO}^\bullet$  e  $\text{NO}_2^-$  produzido durante o surto oxidativo pode ser precisamente determinado através da

amperometria em microeletrodo, pela comparação dos valores de corrente (Amatore e cols., 2006).

#### **1.4 Detecção Eletroquímica Direta de Espécies Reativas Liberadas em Células Individuais**

A capacidade dos métodos eletroquímicos para detectar, em condições biológicas, algumas das ERO e ERN citadas acima ou apresentadas na Figura 1 depende de dois fatores principais: o potencial de meia-onda do par redox envolvendo a ERO ou ERN e a meia-vida dessas espécies, quando produzidas por uma célula viva, na qual o último parâmetro controla a permanência e difusão dessas espécies nas células ou tecidos.

Além disso, em vista de as análises acontecerem em células individuais em condições de aerobiose, as medidas precisam ser conduzidas em meio aquoso (tamponado) na presença de oxigênio (solução em equilíbrio com a atmosfera normal). Esta condição impede as análises eletroquímicas na região de redução, desde que a redução do oxigênio acontece em baixos potenciais de redução na maioria dos eletrodos, isto é, -0,1 V em relação ao ECSS nos microeletrodos de platina e a concentração de oxigênio nas proximidades da célula pode também variar durante o processo de atividade oxidativa devido ao seu consumo (Amatore e Arbault, 2007).

As espécies radicalares primárias, ânion radical superóxido e o óxido de nitrogênio, que geram a complexa família de ERO e ERN, são alvos mais simples para a detecção eletroquímica na região da oxidação. Os potenciais-padrão dos pares redox para oxidação de  $\text{NO}^\bullet$  ( $E^\circ(\text{NO}^+ / \text{NO}^\bullet) = +1,21 \text{ V vs. ENH}$ ) e de  $\text{O}_2^\bullet$  ( $E^\circ(\text{O}_2 / \text{O}_2^\bullet) = -0,33 \text{ V vs. ENH}$ ) não impedem sua detecção (Koppenol, 1998; Koppenol e cols., 1992; Koppenol, 1996). Do ponto de vista cinético, a meia-vida de cada uma dessas espécies primárias depende das condições locais nas células para sua produção. Como já citado anteriormente, o desaparecimento do ânion radical superóxido por desproporcionamento depende da concentração das espécies e é mais acelerado na presença de SOD. Igualmente, o processo de auto-oxidação do óxido de nitrogênio é dependente da concentração e da disponibilidade de  $\text{NO}^\bullet$  e de suas reações com os possíveis alvos biológicos nas células. O óxido de nitrogênio em concentração local na faixa de nano ( $10^{-9}$ ) a micromolar ( $10^{-6}$ ) pode difundir em

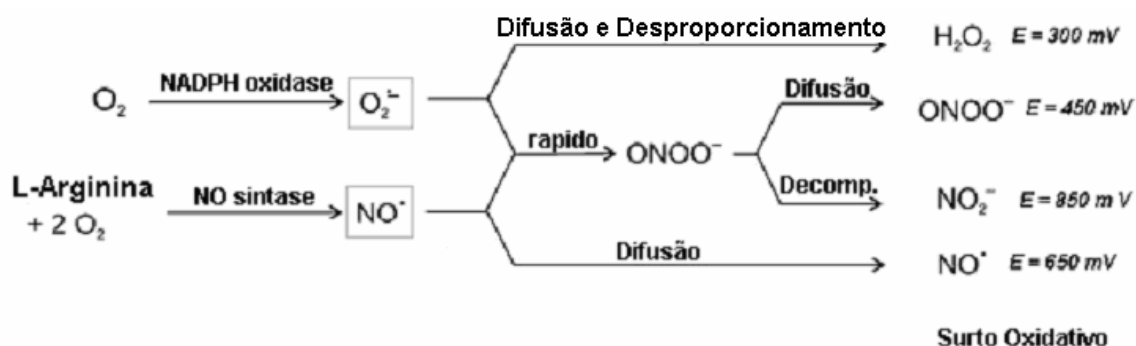
distância micrométrica e sua detecção no espaço celular torna-se possível. Além disso, o caráter altamente lipofílico de  $\text{NO}^\bullet$  e o caráter fracamente lipofílico do  $\text{O}_2^\bullet$  permite sua difusão através da membrana celular e sua detecção realizada por um microeletrodo, colocado acima da célula. Pode-se considerar a possibilidade destas espécies reativas serem produzidas pelo sistema enzimático localizado na membrana celular, tais como as NADPH oxidases para o superóxido e as NO sintases constitutivas para o  $\text{NO}^\bullet$ . Sob tais condições, a geometria local pode desfavorecer possíveis reações entre  $\text{NO}^\bullet$  ou  $\text{O}_2^\bullet$  e os componentes celulares, proporcionando, assim, uma melhor probabilidade para sua observação, em separado (Amatore e Arbault, 2007).

Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio neutras ou aniônicas são ótimos candidatos para a detecção e caracterização no surto oxidativo em células. Em relação às EROs, o peróxido de hidrogênio é o composto mais provável e mais estável entre as espécies dessa família, sua meia-vida *in vivo* depende essencialmente da possível reação com íons metálicos livres, como Ferro (II) ou a catalase, presentes no meio. O potencial redox de seu par [ $E^\circ(\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2) = -0,146 \text{ V vs. ENH}$ ] faz dele um ótimo candidato para a detecção direta em células. O nitrito é um composto muito estável *in vivo* e o potencial redox de seu par [ $E^\circ(\text{NO}_2^\bullet/\text{NO}_2^-) = +0,99 \text{ V vs. ENH}$ ] é inicialmente compatível para uma oxidação direta. O nitrito é essencialmente o produto final do metabolismo do óxido de nitrogênio e é usado como um marcador indireto do estresse oxidativo ou nitrosativo, com o problema que seu nível basal pode ser bastante alto. A oxidação do íon nitrato é um processo muito difícil [ $E^\circ(\text{NO}_3^\bullet/\text{NO}_3^-) = +2,50 \text{ V vs. ENH}$ ], na ausência de um sistema enzimático, sendo este um produto final muito estável (Koppenol, 1998; Koppenol e cols., 1992; Koppenol, 1996). Uma outra espécie reativa nitrogenada e de grande importância biológica, o ânion peroxinitrito, é um alvo importante para medidas eletroquímicas. Já foram citadas, anteriormente, as limitações dos métodos fluorométricos e quimioluminescentes para a detecção de  $\text{ONOO}^-$ , que são indiretos e não seletivos. Assim também, a quantificação e a determinação do perfil cinético do peroxinitrito liberado pelas células são dificilmente realizadas por tais métodos. De forma contrária, a análise eletroquímica com microeletrodo pode oferecer vantagens para a detecção direta do peroxinitrito por meio de sua oxidação, já que

seu potencial redox é muito baixo ( $E^{\circ}(\text{ONOO}^{\bullet}/\text{ONOO}^{-}) = +0,20 \text{ V vs. ENH}$ ) (Koppenol, 1998, Koppenol, 1996; Amatore e cols., 2001). Assim, considerando um sensor eletroquímico posicionado próximo a uma célula, fonte de peroxinitrito, em condições similares às usadas para a detecção de  $\text{NO}^{\bullet}$  e  $\text{O}_2^{\bullet -}$  (as espécies que geram o  $\text{ONOO}^{-}$ ), pode ser possível detectar e monitorar esta espécie antes de sua reação com seus alvo biológicos, ou antes da mesma sofrer decomposição.

### 1.5 Determinação Individual das Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio

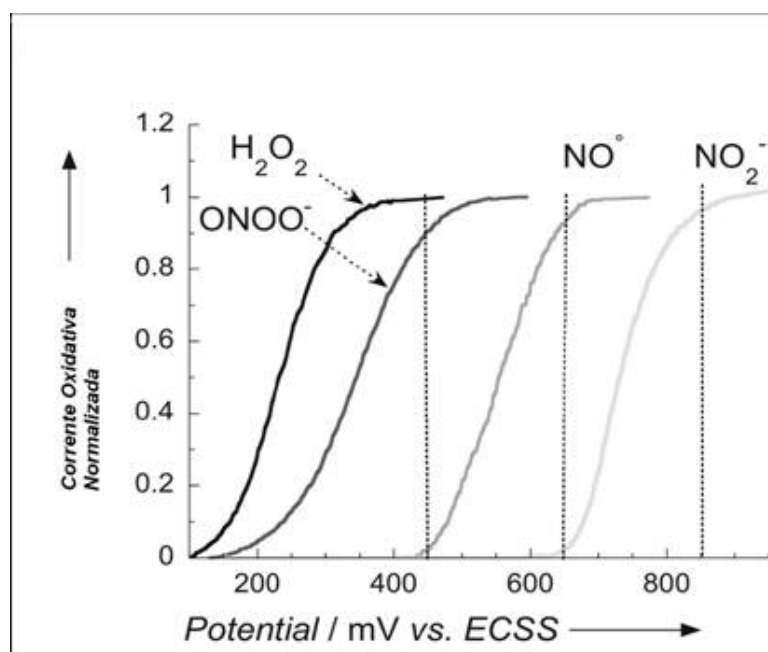
A análise amperométrica da liberação de ERO/ERN é realizada pelo posicionamento de um microeletrodo de fibra de carbono platinizada e por detecção, em tempo real, por amperometria em potencial constante,  $E$ , versus o eletrodo de calomelano saturado. As medidas amperométricas são realizadas pela aplicação de  $E$  em +300 mV, +450 mV, +650 mV e 850 mV em relação ao ECSS, para permitir a detecção e quantificação de cada espécie liberada (Figura 11). Estes potenciais são selecionados, com base em estudos voltamétricos de oxidação *in vitro*, feitos previamente a partir de soluções, em tampão fosfato (PBS), individuais de  $\text{NO}^{\bullet}$ ,  $\text{ONOO}^{-}$ ,  $\text{NO}_2^{-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Amatore e cols., 2000; Amatore e cols., 2006). Combinações lineares das correntes medidas obtidas em cada valor dos potenciais são realizadas para caracterizar e quantificar cada uma das quatro espécies (Ghandour, 2006).



**Figura 11:** Espécies oxigenadas e nitrogenadas reativas, formadas no metabolismo celular e seus respectivos potenciais de detecção (Adaptado de Amatore e cols., 2006).

Para quantificar as várias espécies liberadas, é estabelecido previamente que a resposta de corrente,  $I_{\text{potencial}}$ , pode ser integrada versus o tempo e subtraída para cada resposta, obtendo-se, assim, a carga total para cada espécie que sofre oxidação em cada potencial aplicado. Os resultados dependem apenas do potencial

de detecção e do tipo de eletrodo usado, e são determinados experimentalmente dos voltamogramas de cada espécie. A Figura 12 mostra o voltamograma de potencial vs. corrente das soluções das espécies  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$ ,  $\text{NO}^\bullet$  e  $\text{NO}_2^-$ , obtidas com eletrodo de fibra de carbono platinizada. As diferenças entre  $i_{450\text{mV}}$  e  $i_{650\text{mV}}$ , e entre  $i_{650\text{mV}}$  e  $i_{850\text{mV}}$ , correspondem às correntes originadas da oxidação de  $\text{NO}^\bullet$  e  $\text{NO}_2^-$ , respectivamente. Os voltamogramas de  $\text{ONOO}^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , entretanto, se sobrepõem. Em +450 mV em relação ao ECSS, as ondas de oxidação de  $\text{ONOO}^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  se misturam, o mesmo ocorrendo em +300 mV vs. ECSS, com contribuições diferentes das duas espécies (Figura 12). Sendo assim, as respostas amperométricas medidas em + 300 mV e 450 mV são cumulativas em relação às espécies,  $\text{ONOO}^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A contribuição dada (Amatore e cols., 2000; Amatore e cols., 2006; Amatore e cols., 2008).



**Figure 12:** Voltamogramas relativos à oxidação das espécies  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$ ,  $\text{NO}^\bullet$  e  $\text{NO}_2^-$ , obtidas em eletrodo de carbono platinizado,  $v = 20 \text{ mV/s}$  (Amatore e cols., 2006).

Assim, tem-se:

$$i_{850\text{mV}} = i_{\text{H}_2\text{O}_2} + i_{\text{ONOO}^-} + i_{\text{NO}} + i_{\text{NO}_2^-} \quad (18)$$

$$i_{650\text{mV}} = i_{\text{H}_2\text{O}_2} + i_{\text{ONOO}^-} + i_{\text{NO}} \quad (19)$$

$$i_{450\text{mV}} = 0,99 \times i_{\text{H}_2\text{O}_2} + 0,90 \times i_{\text{ONOO}^-} \quad (20)$$

$$i_{300\text{mV}} = 0,85 \times i_{\text{H}_2\text{O}_2} + 0,29 \times i_{\text{ONOO}^-} \quad (21)$$

O sistema de equações (Eqs. 18-21) pode ser prontamente resolvido para separar as contribuições de cada uma das quatro espécies nas correntes obtidas. O fluxo ( $\Phi$ ) de emissão de cada espécie pode então ser calculado a partir de suas respectivas intensidades de correntes, usando a equação de Faraday:

$$\Phi_{\text{espécies}} = I_{\text{espécies}} / (n_{\text{espécies}} \times F) \quad (22)$$

onde  $n_{\text{espécies}}$  é o número de elétrons transferidos por molécula, na oxidação de cada uma das espécies ( $n_{\text{espécies}} = 2$  para  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{NO}_2^-$ ,  $n_{\text{espécies}} = 1$  para  $\text{ONOO}^-$  e  $\text{NO}^\bullet$ ) (Amatore e cols., 2006) e  $F$  é a constante de Faraday. Assim, medidas amperométricas de números estatisticamente significativos de macrófagos individuais, após aplicação de diferentes potenciais (+300 mV, +450 mV, +650 mV e +850 mV em relação ao ECSS) permitem quantificar, com precisão, a liberação das espécies citadas acima. Finalmente, em cada potencial, a corrente pode ser integrada pelo tempo, fornecendo a carga total detectada num intervalo de tempo ( $t_0, t_0+\theta$ ) (Eq. 23) (Amatore e cols, 2006; Amatore e cols, 2008).

$$Q_{\text{espécies}} = \int_{t_0}^{t_0+\theta} I_{\text{espécies}} dt \quad (23)$$

onde  $I_{\text{espécies}}$  é dado pelas equações 18-21, a mesma equação é aplicada para detectar a carga em cada potencial.

A partir desses dados, os fluxos obtidos são:

$$\text{Fluxo de } \text{H}_2\text{O}_2: \Phi_{\text{H}_2\text{O}_2} = I_{450} \times a / (n_{e^-}^t \times F) \quad (24)$$

$$\text{Fluxo de } \text{ONOO}^-: \Phi_{\text{ONOO}^-} = I_{450} \times b / (n_{e^-}^t \times F) \quad (25)$$

$$\text{Fluxo de } \text{NO}^\bullet = [I_{650} - I_{450}] / 1 \times F \quad (26)$$

$$\text{Fluxo de } \text{NO}_2^- = [I_{850} - I_{650}] / 2 \times F \quad (27)$$

Foi estabelecido previamente que o surto oxidativo na célula resulta da produção inicial de apenas duas moléculas reativas, o ânion radical superóxido e o óxido de nitrogênio (Figura 6). O peróxido de hidrogênio detectado resulta da difusão rápida ou desproporcionamento catalisado pela superóxido dismutase (SOD) de  $\text{O}_2^\bullet$



(2 O<sub>2</sub><sup>•</sup> por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). De maneira similar, ONOO<sup>-</sup>, após produzido, difunde-se rapidamente - reação limitada entre NO<sup>•</sup> e O<sub>2</sub><sup>•</sup> (1:1 O<sub>2</sub><sup>•</sup> e NO<sup>•</sup> para formar o ONOO<sup>-</sup>). O íon nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) resulta da decomposição espontânea do peroxinitrito e representa a mesma proporção das espécies primárias (1:1 O<sub>2</sub><sup>•</sup> e NO<sup>•</sup> para NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), enquanto o excesso de NO<sup>•</sup> difunde-se livremente para a superfície do microeletrodo, sendo detectado diretamente, uma vez que a reação com O<sub>2</sub> é negligenciável com a distância (5 μm) da célula-eletrodo. Esses dados estequiométricos permitem a reconstrução dos fluxos primários de O<sub>2</sub><sup>•</sup> e NO<sup>•</sup> baseado no fluxo das espécies individuais detectadas nos macrófagos de acordo com as equações abaixo (Eqs. 28-29) (Amatore e cols, 2006; Amatore e cols, 2008):

$$\left(\Phi_{O_2^{\bullet-}}\right)^{produzido} = 2\left(\Phi_{H_2O_2}\right)^{medido} + \left(\Phi_{ONOO^-}\right)^{medido} + \left(\Phi_{NO_2^-}\right)^{medido} \quad (28)$$

$$\left(\Phi_{NO^{\bullet}}\right)^{produzido} = \left(\Phi_{NO^{\bullet}}\right)^{medido} + \left(\Phi_{ONOO^-}\right)^{medido} + \left(\Phi_{NO_2^-}\right)^{medido} \quad (29)$$

A seletividade das medidas amperométricas são demonstradas por Arbault e colaboradores (1995) por meio da adição de conhecidos consumidores de peróxido de hidrogênio (catalase ou peroxidase) ao meio que se encontra a célula, antes da despolarização da membrana celular. Dessa forma, observa-se a extinção ou redução do sinal amperométrico quando foi adicionado ao meio um desses consumidores, mostrando que o peróxido de hidrogênio foi a substância primária detectada. Assim como, para verificar a seletividade para as espécies nitrogenadas reativas, como o NO<sup>•</sup>, a utilização de lipopolissacarídeo (LPS) estimula produção aumentando a resposta das medidas (Amatore e Arbault, 2007).

Ainda, a escolha pela amperometria no lugar da voltametria cíclica se deu pela ótima razão do sinal/ruído obtida da subtração da corrente capacitiva pela corrente faradaica para detectar as espécies eletroativas nas análises realizadas com microeletrodo de fibra de carbono platinizada (Arbault e cols., 1995).

## 1.6 Microeletrodos

Os microeletrodos podem ser definidos como um dispositivo onde ao menos uma de suas dimensões (como o raio de um disco) é inferior ou igual a algumas dezenas de microns. Esta característica é chamada de dimensão crítica. Estes

eletrodos com a dimensão crítica de algumas dezenas de nanômetros podem ser fabricados e sua dimensão torna-se comparável à espessura da dupla camada (alguns nanômetros) ou ao tamanho de algumas moléculas (nanômetros). Os ultramicroeletrodos podem ter formas variadas: disco, esférico, cilíndrico, etc (Amatore e cols., 1996).

A introdução de microeletrodos levou a avanços significativos no estudo de reações heterogêneas e homogêneas rápidas, medidas em vários microambientes e com altas resoluções. O maior interesse por esse tipo de eletrodo está relacionado principalmente ao seu comportamento eletroquímico resultante de suas pequenas dimensões e a segunda diz respeito à presença de grupos funcionais na superfície eletródica (Correia e cols., 1995; Wightman, 1981; Kounaves e cols., 2001).

O termo microeletrodo está associado à obtenção de situações em estado estacionário. Em eletroquímica, o estado estacionário refere-se a uma condição experimental em que uma das variáveis em questão (corrente ou potencial) assume valores independentes do tempo. Assim, em experimentos cronoamperométricos (onde o potencial é constante) ou voltamétricos (em que se varia o potencial em função do tempo) a corrente é constante em diferentes tempos ao longo do experimento ou qualquer que seja a velocidade de varredura e seu sentido (dentro de certos limites) (Bard e Faulkner, 2001).

Devido às suas pequenas dimensões, propriedades vantajosas frente a eletrodos convencionais são obtidas, proporcionando características singulares como (Pereira e cols., 2002, Bard e Falker, 2001):

a) baixa sensibilidade à queda ôhmica, possibilitando o estudo em sistemas redox em solventes com elevada resistência ou na ausência de eletrólito de suporte. Neste caso, alarga-se o espectro de aplicações de técnicas eletroquímicas para o estudo em solventes orgânicos não polares, líquidos congelados, sistemas em fase gasosa e para aplicações analíticas *in situ*, sem manipulação das amostras. Cabe notar, entretanto, que, apesar dos aspectos desfavoráveis associados à adição de eletrólito suporte às soluções de trabalho (e entre eles, pode-se citar a introdução de impurezas em estudos analíticos ou a necessária consideração das interações entre eletrólito suporte e espécie eletroativa em estudos relativos à determinação de parâmetros físico-químicos), estes são certamente sobrepujados por algumas vantagens tais como o aumento na condutividade das soluções, a maior compactação da dupla camada elétrica, a eliminação do fenômeno de migração

elétrica e a minimização da convecção natural em razão da maior população iônica (Amatore e cols., 1996)

b) a elevada relação corrente faradaica/corrente capacitiva, permitindo o emprego dos microeletrodos em altas velocidades de varreduras (Amatore e Maisonhaute, 2005; Correia e cols., 1995).

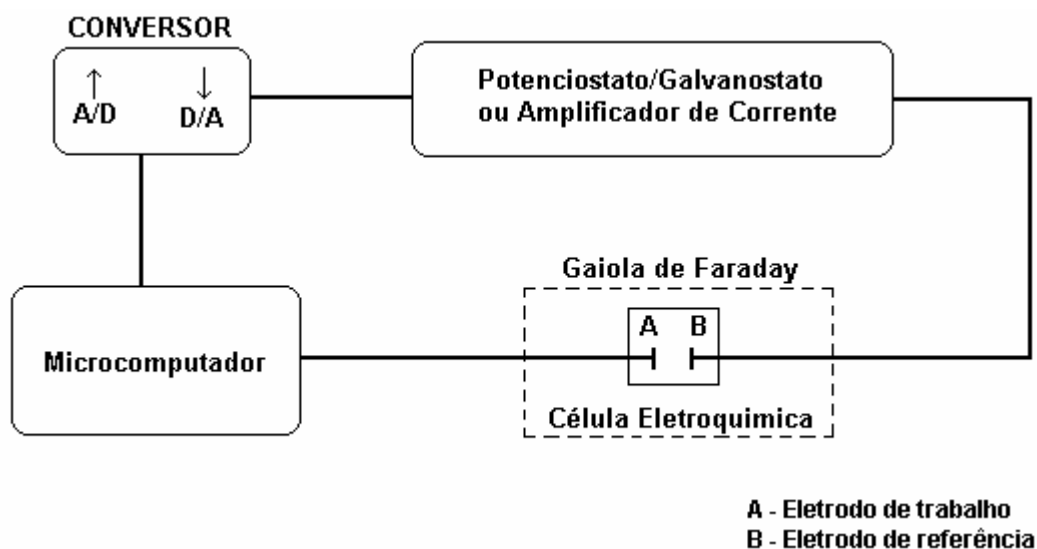
Considerando as importantes propriedades citadas acima, os microeletrodos estão particularmente adaptados para a análise em tempo real dos eventos biológicos ao nível de célula única. A resposta em corrente do eletrodo é proporcional à concentração da espécie detectada dentro de uma área bem próxima ao eletrodo. Um eletrodo posicionado sobre uma célula, à distância micrométrica, capta as moléculas liberadas por ela, após um tempo de difusão muito curto (Yang e cols., 2004).

A corrente limite obtida no ultramicroeletrodo de disco é dada pela expressão (Eq. 31):

$$i = 4nrFDoC \quad (31)$$

onde  $r$  é o raio do microeletrodo de disco,  $F$  é a constante de Faraday,  $C$  é a concentração das espécies eletroativas na solução,  $n$  é o número de elétrons e  $Do$  é o coeficiente de difusão da espécie eletroativa. É uma forma de se obter a quantidade de elétrons envolvidos num processo faradaico (Sun e cols., 2006).

O uso dos ultramicroeletrodos sofre limitação devido à exigência de uma instrumentação adequada para medir correntes na ordem de nano a picoampères, requerendo amplificadores sensíveis a este nível de sinal, implicando na necessidade de se eliminar os ruídos externos com a utilização de filtros de ruídos ou gaiolas de Faraday (Silva e cols., 1998). Nesse sentido, cabe também destacar o desenvolvimento na área de instrumentação, que permitiu a construção de equipamentos com tecnologia suficientemente precisa para o monitoramento de correntes baixíssimas, muitas vezes na ordem de picoampères ou até mesmo femtoampères (Figura 13) (Yang e cols., 2004).



**Figura 13:** Diagrama da instrumentação eletroquímica desenvolvida para a utilização de UME (ultramicroeletrodos) (Silva e cols., 1998).

A aplicação dos ultramicroeletrodos em eletroquímica tem sido mais freqüente em áreas mais variadas e, principalmente, na eletroanalítica. O uso de microeletrodos como sensores eletroquímicos é sem dúvida a área de maior progresso, especialmente, devido à possibilidade de se poder monitorar a concentração de espécies químicas em micro-ambientes, como por exemplo, no interior de uma célula, ou com volumes muito pequenos de amostras. Para o crescimento desta linha de pesquisa, as contínuas evoluções na área de nanomateriais certamente são de grande importância. Um exemplo bastante interessante sobre os progressos recentes na área diz respeito a metabólitos de interesse biológico, para monitoração ambiental, metais pesados ou substâncias tóxicas em alimentos (Yasukawa e cols., 2002; Chen e cols., 2007).

Os materiais mais utilizados para a fabricação dos ultramicroeletrodos são: platina, ouro, níquel, ferro, fibra de carbono com variados diâmetros, etc.

Atualmente, entre os diversos materiais estudados, as fibras de carbono são empregadas nos mais diversos segmentos de atividades humanas e, nas últimas décadas, tem crescido também o seu emprego na construção de eletrodos utilizados em medidas eletroquímicas (Edmonds, 1985). Uma importante característica para as fibras de carbono está na possibilidade de modificação de sua superfície, permitindo a construção de eletrodos com maiores sensibilidade e seletividade, especialmente no caso de biossensores (Arbault e cols., 1995; de Carvalho e cols., 1999; Cahill e cols., 1996).

Fibras de carbono têm sido aplicadas na construção de eletrodos para a determinação de espécies inorgânicas. Por exemplo, fibra modificada com polímero [Os(bipy)<sub>2</sub>(PVP)<sub>20</sub>Cl]Cl foi empregada para a determinação de nitrito (Malone e cols., 1992). A modificação com membranas poliméricas permite a imobilização de muitas monocamadas da espécie ativa na superfície modificada, ampliando consideravelmente a resposta eletroquímica. Então, filmes poliméricos têm sido empregados em eletrodos quimicamente modificados e usados no desenvolvimento de sensores para proteger a superfície dos eletrodos de impurezas, bloquear interferentes, imobilizar biocomponentes e fornecer biocompatibilidade (Pereira e cols., 2002).

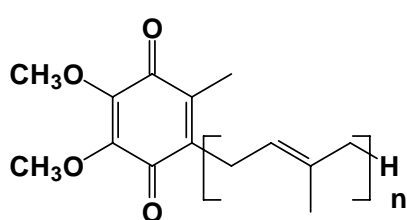
O uso de microeletrodos de fibra de carbono permite a execução de medidas eletroquímicas em tempo real em locais discretos, por exemplo, dentro ou próximo à superfície de células biológicas únicas. A maioria dessas investigações envolve a detecção de neuroquímicos, porém, recentemente outras moléculas de interesse biológico como insulina e ânion radical superóxido foram estudadas (Schroeder e cols., 1992; Arbault e cols., 1995).

### **1.7 Considerações gerais sobre quinonas**

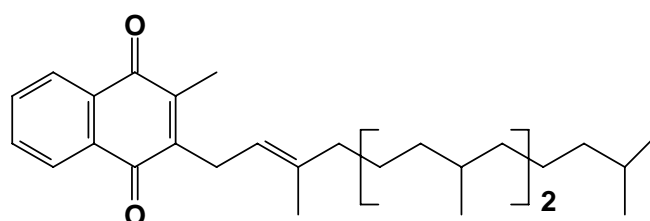
Existe um grande interesse no desenvolvimento de novos compostos seletivamente tóxicos aos alvos de ação de males como malária, doenças de Chagas e o câncer. Uma grande variedade de espécies químicas (naturais ou sintéticas) apresenta capacidade de, após transferência eletrônica, gerar espécies reativas tóxicas ou se comportar como agentes alquilantes do DNA. De modo geral, o mecanismo de ação desses compostos ativos está relacionado à geração de espécies reativas de oxigênio. O entendimento de seu papel e seu mecanismo de ação pode, eventualmente, levar ao desenvolvimento de novas drogas e novos conceitos de tratamento. Dentre as classes de compostos ativos e em desenvolvimento podemos citar os nitroaromáticos, as quinonas, N-heterocíclicos entre outros (Powis e cols., 1981; Petrillo e cols., 2008; Kapadia e cols., 2001).

Dentre as classes principais de farmacóforos eletroquimicamente ativos, destacam-se as quinonas (ou seus precursores fenólicos). As atividades farmacológicas e toxicológicas advêm dessas propriedades, diretamente ou após metabolismo.

Quinonas são muito difundidas na natureza e desempenham uma variedade de funções bioquímicas e fisiológicas. Elas são componentes da cadeia de transferência de elétrons, localizada na membrana mitocondrial interna da mitocôndria, em bactérias e em cloroplastos, e estão envolvidas na respiração celular e fotossíntese. Algumas quinonas são usadas como vitaminas e várias delas, como fármacos. Por exemplo, a coenzima Q funciona como transportadora de elétrons, enquanto a vitamina K é requerida em processos de coagulação sanguínea e participa na carboxilação do glutamato.



**Coenzima Q**

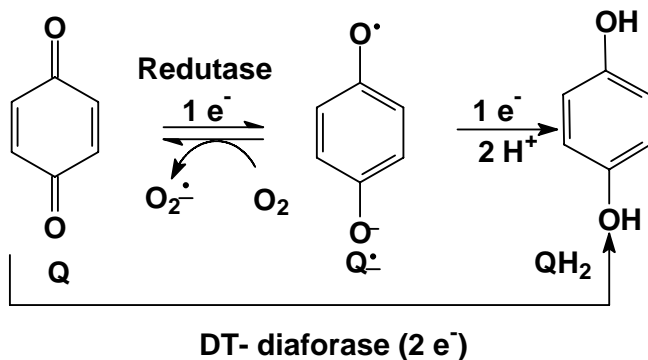


**Vitamina K**

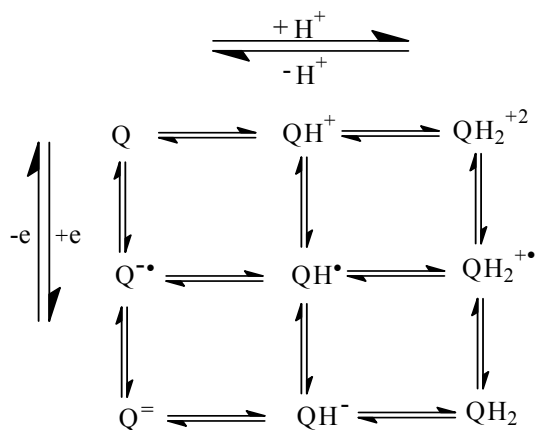
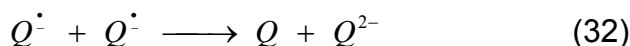
Do ponto de vista toxicológico, quinonas apresentam duas propriedades químicas principais que lhe conferem reatividade em sistemas biológicos: quinonas são oxidantes e também eletrofílicas, porém, como a adição de nucleófilos a uma quinona representa uma redução formal de dois elétrons, suas propriedades oxidantes e eletrofílicas são interligadas. Após o processo de redução, como será visto a seguir, ocorre a inversão de polaridade e o produto resultante se torna um nucleófilo.

As funções bioquímicas das quinonas referem-se, em grande extensão, a sua habilidade em realizar conversões redox reversíveis. A facilidade de redução explica-se pela formação de sistemas aromáticos (Figura 14). A completa redução de uma quinona à hidroquinona correspondente requer dois elétrons e dois prótons. Quinonas são espécies neutras e sofrem reações de protonação com dificuldade. No entanto, quando protonadas, são oxidantes mais fortes do que a forma não protonada. Semiquinonas ( $Q^{\cdot-}$ ) são geradas por redução envolvendo um elétron (Figura 14). A semiquinona não é suficientemente básica para ser protonada. Conseqüentemente, muitas semiquinonas existem como ânions radicais em pH fisiológico. Por causa da repulsão entre as cargas, um ânion radical semiquinônico é um oxidante muito mais fraco do que a quinona original. Assim, a química redox das

quinonas, semiquinonas e hidroquinonas está intimamente relacionada a sua química ácido-base. Adicionalmente, semiquinonas desproporcionam (Eq. 32), formando as quinonas e hidroquinonas correspondentes, freqüentemente e com grande facilidade. Seu comportamento eletroquímico básico pode ser representado pela Figura 15 (Jacq, 1967; Jetic e Manning, 1970; Tonholo e cols., 1998).



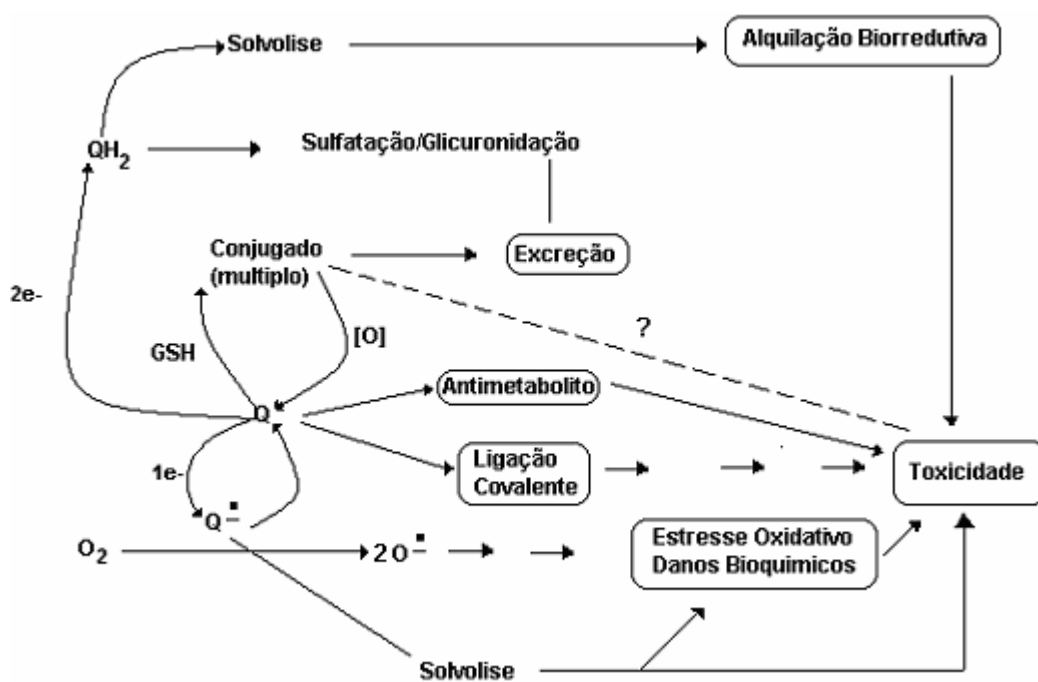
**Figura 14:** Redução de quinonas (Q) via 1 e 2 elétrons, gerando semiquinonas (Q<sup>•</sup>) e hidroquinonas (QH<sub>2</sub>).



**Figura 15:** Esquema quadrado representativo da oxirredução de quinonas em vários meios. Adaptado de Tonholo e cols., 1998.

A maioria das quinonas exerce atividades biológicas importantes, com conseqüências benéficas ou deletérias. Sua ação citostática e antimicrobiana advém de sua habilidade em agir como potentes inibidores do transporte eletrônico nas mitocôndrias, nos processos de fosforilação oxidativa, como agentes intercaladores na dupla hélice do DNA, como agentes bioalquilantes de biomoléculas e como

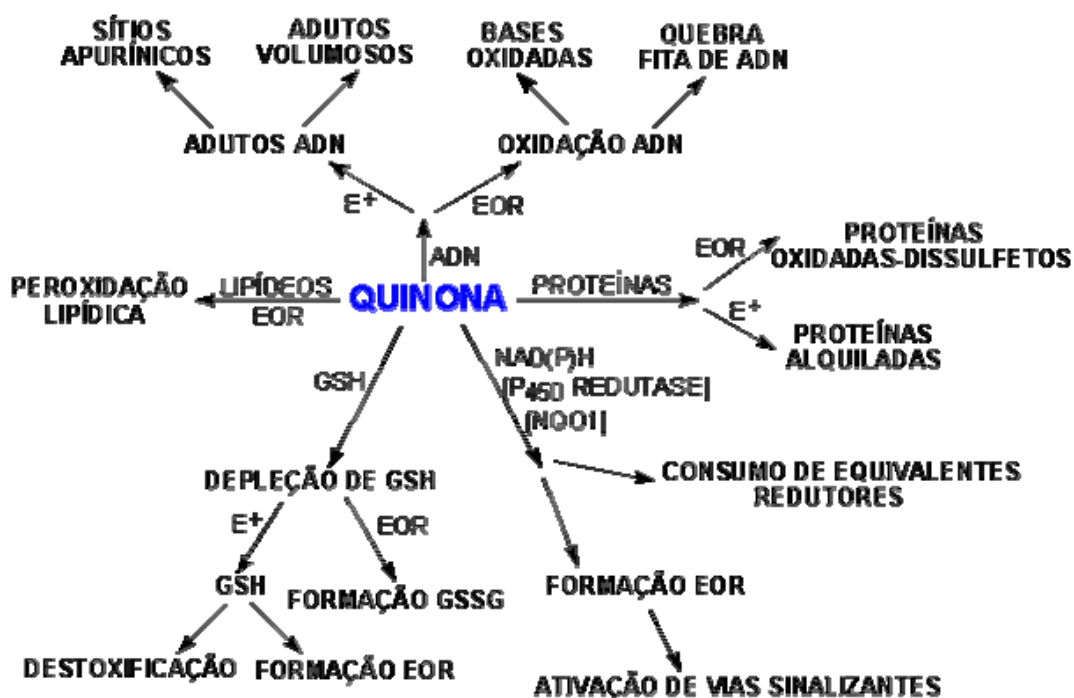
geradores de espécies reativas de oxigênio, após ciclagem redox, em condições aeróbias (Figura 16) (Hillard e cols., 2008). Em todos esses casos, o mecanismo de ação, *in vivo*, requer a biorredução como etapa de ativação (Vennerstrom e Eaton, 1988; Monks e cols., 1992). Eventualmente, outros mecanismos independentes de processos de transferência eletrônica podem operar, como arilação de grupos sulfeto ou reação com topoisomerasas, em seus diferentes sítios (Irons e Sawahata, 1985; Frydman e cols., 1997).



**Figura 16:** Mecanismos gerais de ações biológicas de quinonas. Adaptado de Monks e cols., 1992.

Mais especificamente, as atividades citotóxicas das quinonas advêm de sua atuação sobre proteínas, DNA, lipídios e agentes celulares redutores e oxidantes, como mostrado na Figura 17 (Bolton e cols., 2000).





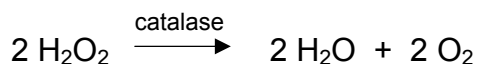
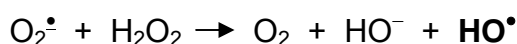
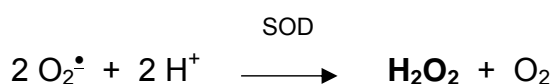
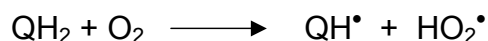
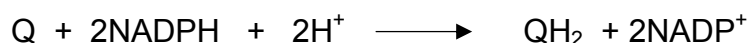
**Figura 17:** Sumário dos potenciais mecanismos citotóxicos para quinonas (ADN: ácido desoxirribonucléico e EOR: espécies oxigenadas reativas). Adaptado de Bolton e cols., 2000.

Sabe-se que dois ou mais mecanismos podem operar simultaneamente, nesses casos, não sendo possível avaliar o mais importante. Serão expostos aqui os mecanismos mais aceitos para a atuação biológica das quinonas, mais diretamente ligados ao presente trabalho.

### 1.7.1 Quinonas como cicladores redox

A redução pela transferência de um elétron por uma enzima resulta na formação da semiquinona, que pode reagir com o oxigênio molecular formando o ânion-radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), que subsequenteiramente sofre, espontaneamente ou após catálise enzimática, um desproporcionamento para formar peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O ânion-radical superóxido também pode reduzir  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ . O peróxido de hidrogênio reage, então, com o  $Fe^{2+}$  para gerar o radical hidroxila ( $HO^{\bullet}$ ) (Reação de Fenton, Eq. 7), que é, provavelmente, a espécie reativa responsável pelo dano oxidativo, pois ela não é detoxificada por qualquer enzima presente no meio celular (Figura 18). Por meio de um mecanismo eficiente de redução da quinona a semiquinona, haverá um ciclo redox, que tem como consequência, o estresse oxidativo, resultante do consumo desproporcional de equivalentes

redutores celulares e a geração das espécies oxigenadas reativas ( $O_2^{\bullet}$ ,  $H_2O_2$ ,  $HO^{\bullet}$ ), já mencionadas (Lown, 1982; Kovacic and Becvar, 1999).



**Figura 18:** Atuação de quinonas na geração de espécies oxigenadas reativas e detoxificação por catalase e superóxido dismutase (SOD).

As quinonas servem como substrato para uma grande variedade de flavoprotéínas, incluindo NADPH-citocromo P-450 redutase, NAD(P)H-quinona oxirredutase (DT-diaforase), NADH citocromo redutase e NADH-ubiquinona oxidorredutase (Monks e Jones, 2002; Chesis e cols., 1984; Powis e cols., 1981; Gaikwad e cols., 2007).

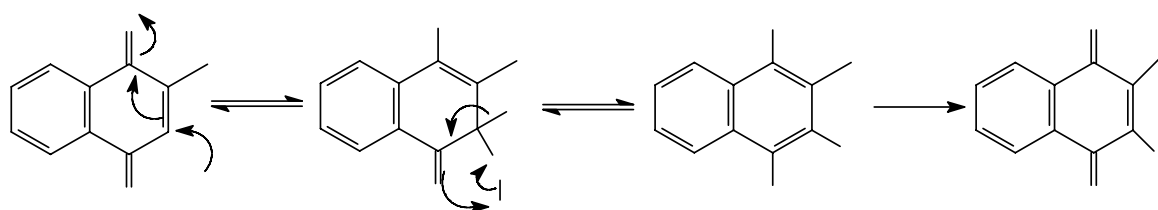
A redução, com transferência de dois elétrons, catalisada pela DT-diaforase, é geralmente considerada como um caminho desintoxicante, desde que a hidroquinona resultante possa ser conjugada e excretada (Figura 16) (Monks e cols., 1992).

### 1.7.2 Quinonas como aceptores de Michael

A atividade toxicológica de quinonas também reside em sua habilidade em reagir diretamente com nucleófilos celulares tais como a glutathiona (GSH), e originar tioéteres quinônicos (Figuras 16 e 17). Tal processo é usualmente associado com desintoxicação e excreção; porém, pode levar à inibição de grupos tiol e à alteração do balanço de tiol na célula, interferindo no processo regulatório celular. Há ainda evidências de que uma variedade de tioéteres quinônicos, derivados de GSH, apresente atividade biológica, retendo a habilidade de ciclagem redox com formação

de espécies oxigenadas ativas (Monks e cols., 1992; Thornton e cols., 1995; Wang e cols., 2006; Alcaín e Villalba, 2007).

Naftoquinonas são eletrófilos fracos, mostrando caráter eletrodeficiente em átomos de carbono  $\alpha$  à carbonila quinônica. Elas reagem, via adição de Michael, com espécies endobióticas nucleofílicas, em particular, glutathiona (GSH) e proteínas sulfídricas, formando adutos arilados (Figura 19). Substituição em  $\alpha$  modifica esse caráter e diminui o grau de ligação a nucleófilos celulares. Substituição em ambos os carbonos,  $\alpha$  e  $\beta$ , elimina qualquer possibilidade de arilação (Ham e cols., 1998).



**Figura 19:** Esquema de reação de naftoquinona com GSH via adição de Michael (arilação) e sua subsequente oxidação. Adaptado de Ham e cols., 1998.

### 1.7.3 Quinonas como venenos de topoisomerases

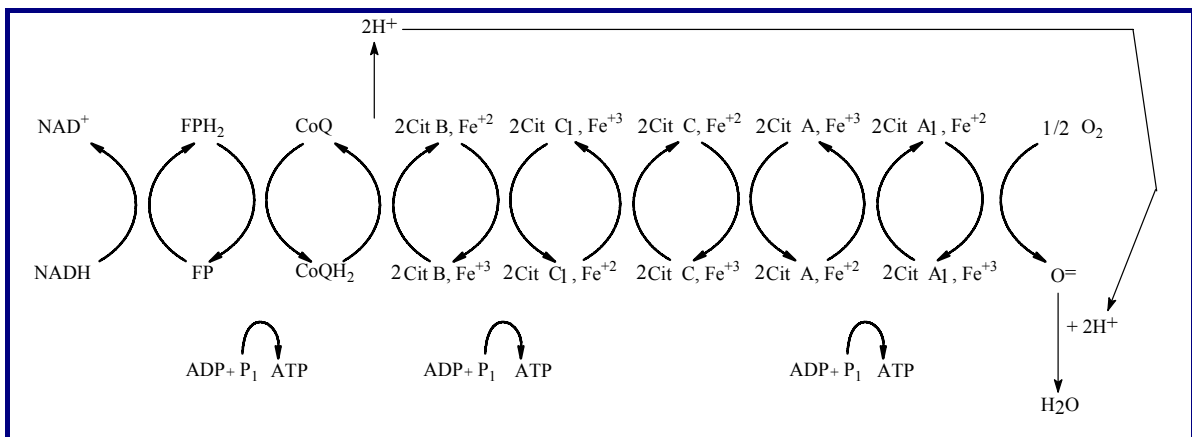
As enzimas nucleares topoisomerases I e II são muito importantes e, geralmente, imprescindíveis para o funcionamento normal de qualquer célula. Estão intimamente envolvidas em todos os aspectos do metabolismo e estrutura do DNA. São elas que mantêm a integridade do DNA, reparando-o quando danificado (Silva e cols., 2003).

Inibidores de topoisomerase constituem uma nova família de agentes antitumorais, o que recomenda o desenvolvimento de estudos para essa classe de compostos (Bailly, 2000). A topoisomerase II tem estrutura muito complexa, e com 15 resíduos de cisteína que, se localizados favoravelmente, podem ser susceptíveis à oxidação por quinonas ou ainda reações com as mesmas.

### 1.7.4 Quinonas como antimetabólitos

Quinonas são consideradas venenos respiratórios, por competirem com a coenzima Q (CoQ) (Figura 20), localizada no complexo citocrômico  $bc_1$ , ou ainda, através de sua redução à hidroquinona correspondente com possibilidade de formar quinonametídeos que podem alquilar enzimas requeridas pela CoQ (agentes bioalquilantes) (Haile e Flaherty, 1993). Ambos os procedimentos inibem o processo

respiratório mitocondrial, pelo bloqueio do mecanismo de transferência de elétrons de NADH ou de FADH<sub>2</sub> para o oxigênio molecular. Esse processo de transferência de elétrons, responsável pela geração de grande parte da energia (ATP) nas células, ocorre através de três complexos de proteínas, que contém muitos centros de oxidação-redução, tais como flavinas, quinonas, aglomerados ferro-enzofre, hemes e íons cobre.



**Figura 20:** Interrupção da Cadeia Respiratória Mitocôndrica. Fp: flavoproteína; Cit: citocromo, Adaptado de Stryer, 1995.

As *orto*-naftoquinonas lipofílicas possuem efeitos antibacterianos, antifúngicos, tripanossomicidas e citostáticos. Entre estas *o*-naftoquinonas, a beta-lapachona exerce efeito citotóxico sobre uma série de células cancerosas (Tabela 1). A beta-lapachona e *o*-naftoquinonas relacionadas foram sugeridas como agentes antitumorais cujos efeitos foram freqüentemente associados a apoptose e necrose dependendo do alvo celular, tempo e dose da droga. Além disso, células normais são relativamente mais resistentes à beta-lapachona do que culturas de células tumorais (Witte e cols., 2004).

**Tabela 1:** Algumas atividades biológicas para a beta-lapachona

Atividade testada	Teste modelo	Dosagem	Result	Notas/Organismo testado
Toxicidade (geral)	Oral cachorro	100 mg/kg	I	Doses mais altas causaram úlcera gástrica e perda de eritrócitos, mas sem sinais de supressão da medula óssea.
	Oral rato	200 mg/kg	FR	
	Não testado Rato	Não testado	I	
	Não testado Frango	Não testado	I	
Fungicida	placa Agar	Não testado	A	<i>Candida albicans</i> <i>C. tropicalis</i> <i>Tricophyton mentagraphytes</i> <i>T. glabrata</i>
Antiviral	<i>In vitro</i>	Não testado	A	Replicação HIV-1
Tripanossomicida	<i>In vitro</i>	Não testado	A	<i>Trypanosoma cruzi</i> (epi)
	(epimastigoto), <i>in vitro</i> (promastigoto)	0,21 mM	A	<i>Trypanosoma cruzi</i> , Y-strain (73% lise)
Antimalárico	<i>In vivo.</i>	200 mg/kg	I	<i>Plasmodium berghei</i> em camundongo – cepa NK 65
	<i>Plasmodium berghei-rato infectado</i>		AFR	
Antimalárico	<i>In vitro</i>	CI <sub>50</sub> ± SD (µM) 4,1 ± 1,17	A	<i>Plasmodium falciparum</i> F-32 sensível à cloroquina
Antineoplásico Citotóxico	Cultura celular	CI <sub>50</sub> 1 a 10 (µM)	A	Linhagens de células cancerosas humanas
	Cultura celular	Não testado	A	Linhagem de células leucêmicas Promielocítica, glioma maligna, hepatoma, prostata, cólon, seio, ovariano, câncer pancreático e mielomas múltiplos incluindo linhas normais resistentes a drogas.
Citotóxico	Cultura celular	CI <sub>100</sub> = 4-8 µM	A	Células tumorais de próstata humana independente de androgeno PC-3 e DU145
		Não testado	A	Células LNCaP
		CI <sub>100</sub> = 16 µM	A	21MT (carcinoma de seio humano)
		CI <sub>100</sub> = 16 µM	A	AD2780s (carcinoma de ovário humano)
			I	SW116 (adenocarcinoma cólon humano)

		CI <sub>100</sub> = 128μM CI <sub>100</sub> = > 32 μM	I	H596, H520 (carcinoma lingual humano), e (célula epitelial) 293 (célula epitelial humano de rim)
Citotóxico	Cultura celular	4 μM	A	Aumentou a letalidade de raios X contra células de carcinoma da epiderme da laringe humana (Hep-2).
Citotóxico	Cultura celular	Não testado	A	Aumentou o efeito citotóxico de agentes que causam dano ao DNA, que induzem o corte da fita de DNA (raio-X) contra melanoma humano maligno resistente (U1-Mel)
Citotóxico	Não testado	Não testado	A	tumor de Yoshida e carcinosarcoma Walker 256
Citotóxico	Não testado	Não testado	A	Inibição da síntese de DNA, topoisomerase I e II e polimerase poly(ADP-ribose)
Citotóxico	Não testado	Não testado	A	Células de câncer de epiderme de laringe, próstata, cólon, ovário, cancer de seio e várias leucemias.
Citotóxico	Não testado	Não testado	A I	Induziu apoptose de câncer de próstata humano PC-3 (em 62% das células durante 24 h), DU145 e LNCap (68% das células durante 24 h.). Não se observou apoptose em 21-MT (célula epitelial do seio humano), 520 (célula do carcinoma de língua humana), SW1116 (adenocarcinoma cólon humano), A2780s (carcinoma de ovário humano)
Citotóxico	Cultura celular implantado em camundongo	Não testado	A	Aumentou a letalidade de raios-x e agentes alquilantes a células tumorais, inibição da reparação de lesão no DNA.
Citotóxico	IP rato	50 mg/mL	A A	Adenocarcinoma de próstata de rato Dunning R-3327.

Necrótico	Cultura celular	Não testado	A	Adenocarcinoma de próstata maligno e metastático RT-3.1. células de osteocarcinoma humano. Induziu necrose antes que apoptose.
Antileucêmico	Cultura celular	Não testado	A	Induziu apoptose de células leucêmicas humanas, linha HL-60
Citostático	IP rato	50 mg/kg	A	Peso da Próstata em ratos tratados foi 203 g comparado a controles em 345 g.
Citostático	Não testado em rato	500 mg/kg 250 mg/kg	F A	Adenocarcinoma de próstata humana PC-3
Anti-inflamatório	Cultura celular	1-4,5 $\mu$ M	A	Adenocarcinoma de próstata humana PC-3 Inibiu a óxido nítrico sintase induzida por LPS em macrófagos alveolares e do anel da aorta de ratos
Antipsoriático	Cultura celular	CI <sub>50</sub> = 0,7 $\mu$ M	A	Antiproliferativo de células queratinocíticas da linha HaCaT com atividade antipsoriática comparável a antralina.
Citotóxico	Cultura celular/célula de mama humana (MCF7 cells)	1-5 $\mu$ M/DMSO	A	Linhagem de células de câncer de seio e próstata humana inicia a apoptose, dependente de NQO1, uma redutase bi-eletrônica. Sugestão de atuação do Ca <sup>2+</sup> , mas não sozinho. Sugestão de protease Ca <sup>2+</sup> -dependente com propriedades similares a calpaína. Eles mostram um modelo para apoptose mediada pela beta-lapachona.
Citotóxico	Cultura celular, macrófagos alveolar de ratos e macrófago/monócito de camundogos	1-4,5 $\mu$ M DMSO LPS (10 $\mu$ g/mL)	A	Supressão induzida de óxido nítrico sintase (iNOS) e produção de fator- $\alpha$ de necrose de tumor.
Anti-inflamatório	<i>In vivo</i> com BALB/c rato (20-25 g)	1.25; 2.5; 5 mg/kg, IP LPS (7.5 mg/kg)	A	Proteção contra a indução de edema da língua, indução de óxido nítrico sintase,

Citotóxico	Cultura celular Células Leucêmicas HL-60	1 µM/ ice cold absolute ethanol	A	letalidade, aumento da produção de nitrito no plasma por LPS Método: pigmento fluorescente DCFH (detecção de peróxidos) e pigmento HE (detecção de superóxido), em microscopia de fluorescência. 30 min. tratamento. Vitamina C bloqueou a ação. Ativação de JNK. Modelo Proposto. Produção de ERO inicia a ativação de JNK.
Citotóxico	Cultura celular, célula cancerosa de adenocarcinoma humano	(0.5; 2, 4, ou 8 µM) DMSO	A	Induziu a morte seletiva em células cancerosas humanas. O modelo inclui E2F1, um regulador de checkpoint-mediated apoptosis.
Citotóxico	<i>In vitro</i> , Cultura celular, células do pâncreas humano adenocarcinoma	(2.5, 5 e 10 µM) DMSO	A	Aumento dose-dependente na citotoxicidade. Uso de dicumarol (50 µM) (inibidor de NQO1) leva a reversão da citotoxicidade da da beta-lapachona (10 µM).
	<i>In vivo</i> , usando Beta-Lap em ciclodextrina (CD)	50 mg/kg IP/DMSO, melhor 75mg/kg ID	A	Efeito no volume do tumor, mas nenhuma diferença na sobrevivência. Intratumoral dado (ID), maior inibição do crescimento do tumor. Complexação com CD,
Citotóxico	<i>In vitro</i> , células MCF-7	50 a 60 mg/kg	A	Complexação de B-Lap com HPB-CD oferecem melhoria na solubilidade e disponibilidade da substância.
	<i>In vivo</i> , em rato C57Blk/6 (18-20 g)		A	
Citotóxico	Cultura celular, célula de seio, células tumorais humanas de	Beta-Lap (2 a 4 µM) + taxol (0,1 a 0,2 µM)  beta-Lap (50 mg/kg IP)	A	Sinergismos dependentes da ordem de adição: taxol + B-Lap simultaneamente ou B-Lap seguida por taxol. A ordem é importante para o sinergismo.

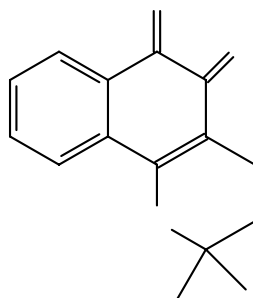


	próstata e células cancerosas do pâncreas. Etc <i>In vivo</i> , célula de ovário de ratos.	+ taxol (1 mg/kg IP)	A	b-Lap + taxol mostrou atividade antitumoral. Os tumores não voltaram a crescer.
Antibacteriano	<i>In vitro</i> , cultura de bactéria.	CIM 6,25 a 12,5 µg/mL	A	Várias cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> , resistentes a vários antibióticos
Citotóxico	Cultura celular		A	A549 células humanas de carcinoma do pulmão, telomerase
Citotóxico	Cultura celular		A	Células tumorais FSall de ratosC3H + radiação ionizante. Sinergismo: IR seguida por b-Lap. Dose e tempo-dependente, relacionado a NQO1
Citotóxico	Cultura celular			Preparação de Microsossomos e citosol do fígado – Natureza Redox
Anti-inflamatório	Microglia BV2 estimulada por LPS	2 µM	A	Inibe liberação de NO e PGE <sub>2</sub> . Inibe iNOS e COX-2, entre outros.

A = ativo; FR = fraco, I = inativo, F = forte

## 1.8 Beta-lapachona

A beta-lapachona [3,4-diidro-2,2-dimetil-2H-nafto(1,2b)piran-5,6-diona] é uma o-naftoquinona que ocorre na natureza, presente na árvore Lapacho (*Tabebuia avellanedae*) ou é facilmente sintetizada do lomatiol, isolado da Lomatia que cresce na Austrália (Ough e cols., 2005; LI, C. J. e cols., 1999; Tagliarino e cols., 2001; Don e cols., 2001; Mans e cols., 2000; Liu e cols., 1999).



beta-lapachona

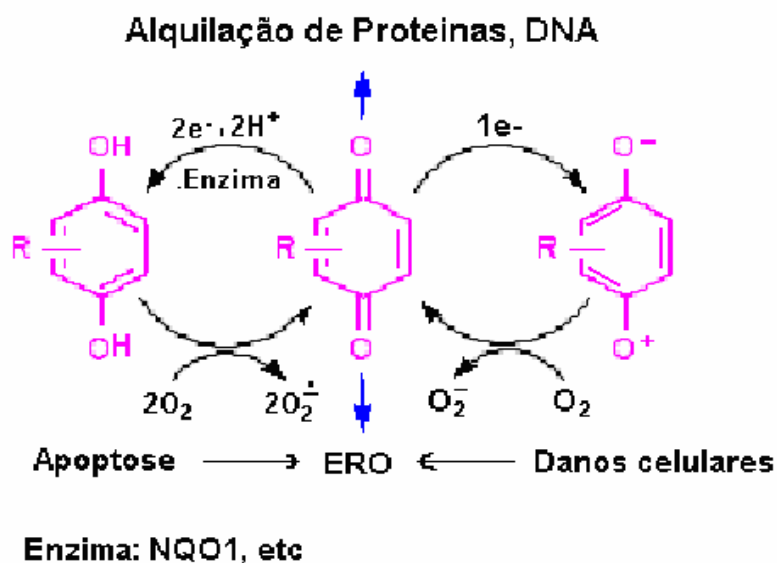
A beta-lapachona e seus derivados exibem inúmeras ações farmacológicas incluindo atividades antibacterianas, antifúngicas e tripanossomicida (Tzeng e cols., 2003; Kumi-Daka, 2002; Chau e cols., 1998; Don e cols., 2001; Choi e cols., 2002). É um potente inibidor de reparação de DNA que sensibiliza as células tumorais a agentes que destroem o DNA (Shian e cols., 1999), atuou como bloqueador da multiplicação do vírus da imunodeficiência humana HIV-1 e de sua transcrição (Pardee e cols., 2002). Inibiu a síntese de proteína de *Trypanosoma cruzi*, e induziu a produção de espécies oxigenadas reativas em *Trypanosoma cruzi* (Portela e cols., 1996; Boveris e cols. 1978).

Várias das ações da beta-lapachona estão ligadas à formação de espécies oxigenadas reativas (Docampo e cols., 1979; Portela e cols., 1996). A beta-lapachona é um potente agente citotóxico que apresenta atividade (sozinha ou em combinação) contra várias linhagens de células (Reinicke e cols., 2005; Ough e cols., 2005; Tagliarino e cols., 2001). Dessa forma, tratamentos da combinação de beta-lapachona e taxol (Li e cols., 1999), ou radiação ionizante (Park e cols., 2005), ou genisteína (Kumi-Daka, 2002) mostraram forte atividades contra um amplo espectro de células cancerosas.

O mecanismo de ação farmacológica/biológica da beta-lapachona permanece indefinido, apesar de intensa investigação. O entendimento desse mecanismo é

dificultado, em parte, pelo reconhecimento de que ela age sobre múltiplos alvos biológicos. Reconhece-se, no entanto, que as atividades tripanossomicida, antibacteriana e citotóxica da beta-lapachona possam ser atribuídas ao mecanismo Transferência de elétrons-ERO-Estresse oxidativo, isto é, à formação, após redução, de espécies oxigenadas reativas que causam danos celulares, principalmente ao DNA (Misico e Forzani, 2003; Moura e cols., 2001; Goijman e Stoppani, 1985; Pardee e cols., 2002).

Pink e colaboradores (2000) demonstraram que beta-lapachona mata as células cancerosas da mama e da próstata por apoptose, uma resposta citotóxica significativamente aumentada pela atividade enzimática da NAD(P)H:quinona oxidoreductase, NQO1. Esta é uma enzima que apresenta concentração elevada em células cancerosas da mama, próstata (Tagliarino e cols., 2001) e pâncreas (Reinicke e cols., 2005) e catalisa a redução bi-eletrônica de quinonas utilizando ou NADH ou NADPH como doadores de elétrons (Figura 21).



**Figura 21:** Redução mono- e bi-eletrônica de quinonas.

O tratamento de células leucêmicas com beta-lapachona na concentração de 1  $\mu$ M produziu grande quantidade de ERO, no qual a vitamina C bloqueou a elevação de  $O_2^{\bullet -}$  (Shian e cols., 1999). Entretanto, Liu e colaboradores (2002) encontraram que a necrose induzida pela beta-lapachona em células de osteosarcoma humano não envolve a formação de espécies oxigenadas pelo caminho mitocondrial (Liu e cols., 2002).

Outra hipótese de ação da beta-lapachona é atuar como um inibidor de enzimas topoisomerase I e II $\alpha$ . Sugere-se que seu efeito resulta de uma interação direta com a enzima antes da estabilização da quebra-DNA *in vitro* (Liu e cols., 2002).

O papel da NQO1 na letalidade da beta-lapachona é fortemente indicado pelo bloqueio de seu efeito com o dicumarol, que é um inibidor de várias quinona-redutases. Células que são geneticamente deficientes em NQO1 foram mais resistentes à apoptose após serem expostas a beta-lapachona (Planchon e cols., 2001).

Foi registrado por diversos pesquisadores que a beta-lapachona pode reagir sinergicamente aumentando seu potencial farmacológico. PARK e colaboradores (2005) observaram que ela reage sinergicamente com radiação ionizante causando a morte de células cancerosas, sendo o fato relacionado, principalmente, ao aumento da atividade da NAD(P)H:quinona oxidoreductase induzida pela radiação, esta enzima é um mediador da toxicidade da beta-lapachona. Tratamento em células cancerosas de camundongos mostrou também que o tratamento combinado da genisteína e beta-lapachona apresenta benefício potencial através do sinergismo entre estas substâncias (Kumi-Diaka, 2002).

A indução de NQO1 não é necessária em células que já expressam esta enzima. Estudos sugeriram que a beta-lapachona ativa um genoma de fiscalização mediado pela E2F1 e induz a geração de ERO dependente de NQO1 e quebra de DNA, além de provocar a liberação de Ca<sup>+2</sup> do retículo endoplasmático e hiperativar a enzima polimerase-1 poli(ADP-ribose), que diminui a concentração de NAD<sup>+</sup> e ATP, essenciais à célula, interrompendo o ciclo celular. Um importante aspecto do mecanismo é que um mínimo de 2 horas é requerido para a ocorrência da morte celular e um maior tempo de exposição diminui a janela terapêutica deste agente antitumoral, sugerindo que uma dose elevada, e não o tratamento contínuo, deverá ser aplicado para obter vantagem terapêutica dessa substância (Alcaín e Villalba, 2007).

Devido ao amplo espectro de atividades associadas à beta-lapachona, o estudo de um derivado com modificações no grupo o-quinônico, responsável pela característica cicladora redox da molécula, apresenta forte interesse (Misico e Forzani, 2003; Carvalho e cols., 2002, Reinicke e cols., 2005).

Uma das principais hipóteses para a causa da toxicidade da beta-lapachona contra células tumorais é a formação intracelular de HO<sup>\*</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, já que tais intermediários são altamente tóxicos ao sistema biológico (Docampo e cols., 1979; Liu e cols., 2002).

Li e cols. (2003) observaram, que, ao contrário de agentes quimioterápicos convencionais, a beta-lapachona induziu seletivamente a morte celular em células humanas cancerosas (células de câncer de mama), mas não em células humanas normais (células epiteliais não transformadas) submetidas às mesmas condições de tratamento. Esses dados mostram que a seletividade da beta-lapachona contra células cancerosas sustenta a possibilidade do tratamento de determinados tipos de câncer.

A beta-lapachona entra num sistema cíclico com a mitocôndria na presença de NQO1 para produzir uma semiquinona intermediária que resulta na geração de superóxido e espécies oxigenadas reativas (Pink e cols., 2000). Além disso, células tumorais tem baixa atividade da superóxido dismutase, comparada com células de tecidos normais (Docampo e cols., 1979; Chau e cols., 1998). Antioxidantes como ácido ascórbico, alfa-tocoferol e N-acetilcisteína inibiram a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzido pela beta-lapachona (Chau e cols., 1998).

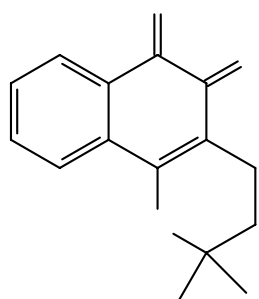
Contrariamente à beta-lapachona, a alfa-lapachona, o isômero *para*-quinônico, não produz radicais livres (Portela e Stoppani, 1996) e apresenta baixa atividade tripanossomicida [IC<sub>50</sub> (alfa) = 24,7 μM vs. IC<sub>50</sub> (beta) = 0,21 μM] (Salas e cols., 2008). As *para*-naftoquinonas, como a alfa-lapachona e menadiona, apresentam menor toxicidade, ciclo redox mais fraco e são também menos potentes em relação à enzima topoisomerase II (Frydman e cols., 1997; Krishnan e Bastow, 2000).

## 2. OBJETIVO

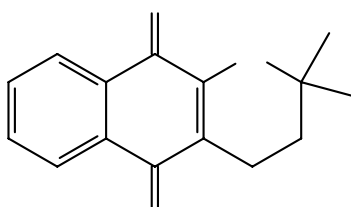
Como o estudo das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em nível celular permite conhecer a reatividade de células vivas frente aos fatores externos (fármacos) ou internos induzidos (fagocitose), torna-se, então, importante a detecção e quantificação dessas no momento de sua liberação através de um método direto. Assim, o presente trabalho teve como objetivo detectar e quantificar ERON, representadas por  $O_2^{\bullet}$ ,  $NO^{\bullet}$ ,  $ONOO^-$  e  $NO_2^-$  e  $H_2O_2$ , em célula única, provocado em macrófagos pelas quinonas beta-lapachona (I), ativa farmacologicamente e alfa-lapachona (II), menos ativa, com a utilização de ultramicroeletrodos de fibra de carbono platinizada, com análise do efeito da concentração e do tempo de contato, em relação às espécies totais e individuais, na tentativa de esclarecer seus mecanismos de ação biológico e farmacológico.

Foi também objetivo desse trabalho, investigar os efeitos pró- e antioxidante do ácido ascórbico (III), por meio da quantificação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio utilizando ultramicroeletrodo, em relação aos macrófagos (RAW 264.7) e às células mielóides (PLB-985), pré-tratadas com 1-forbol 12-miristato-13-acetato (PMA), visando a obtenção de informações úteis ao esclarecimento de controvérsias registradas na literatura.

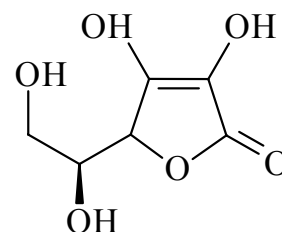
Um outro objetivo deste trabalho foi investigar, por métodos espectrofotométricos, a formação do complexo de inclusão beta-lapachona/beta-ciclodextrina visando melhorar a solubilidade da beta-lapachona.



(I)



(II)



(III)

### 3. EXPERIMENTAL

#### 3.1 Material e soluções

O tampão fosfato (PBS, “phosphate buffer solution”) em tabletes, PMA (1-forbol 12-miristato-13-acetato), ácido ascórbico ( $C_6H_8O_6$ ), nitrito de sódio ( $NaNO_2$ ) e o peróxido de hidrogênio 30% v/v ( $H_2O_2$ ) foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, EUA).

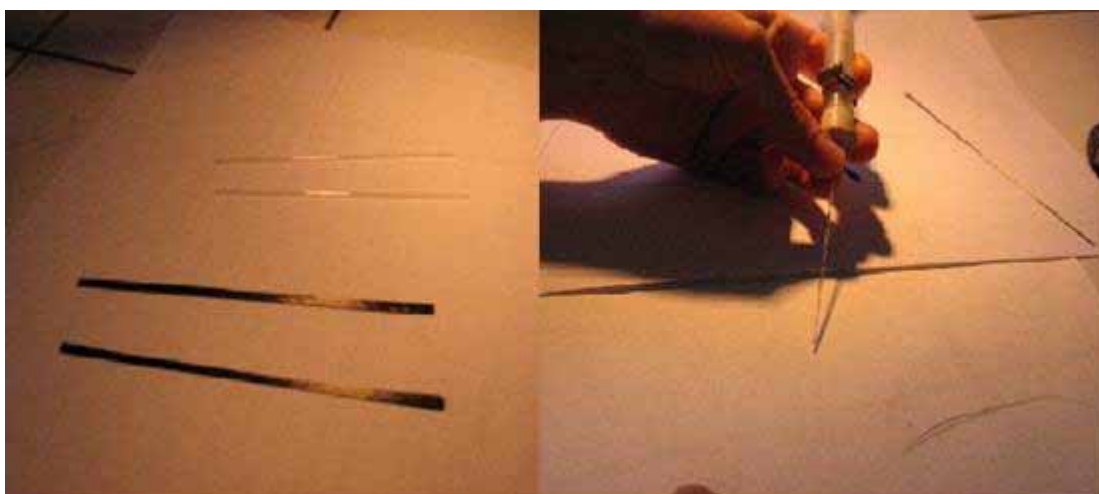
A solução de tampão fosfato (PBS) foi usada em todos os experimentos. O PBS foi preparado a partir de tabletes dissolvidos em água Milli-Q (um tablete dissolvido em 500 mL de água), sendo composto de 0,137 mM NaCl, 10 mM  $Na_2HPO_4$  e 3 mM KCl (pH 7,4). A água é obtida de um sistema purificador Milli-Q (resistividade =  $18 M\Omega \cdot cm^{-1}$ ; Millipore, Billerica, MA, EUA).

A beta-lapachona (I) e alfa-lapachona (II) foram cedidas pelo Prof. Antônio Ventura Pinto (NPPN, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e são produtos sintéticos. Suas soluções-estoque, em etanol ou DMSO, foram preparadas e conservadas envolvidas em papel de alumínio, a frio. A solução estoque de PMA (1-forbol 12-miristato-13-acetato) é preparada (8 mM) e conservada à  $-20^\circ C$ . As soluções aquosas de ácido ascórbico ( $C_6H_8O_6$ ) (III), de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e de nitrito de sódio ( $NaNO_2$ ) foram preparadas, imediatamente antes de cada experimento. Para a formação do complexo de inclusão utilizou-se a beta-ciclodextrina obtida da Aldrich.

#### 3.2 Fabricação de Microeletrodo

Para a fabricação de microeletrodos, é preciso separar individualmente as fibras de carbono (10  $\mu m$  de diâmetro, Thornel P-55S, Cytec Engineered Materials, West Paterson, Nova Jersey, EUA) e inserir em capilar de vidro (GC120F-10, Clark Electromedical Instruments, Harvard Apparatus, Edenbridge, Grã-Bretanha) (Figuras 22A e B). Este é distendido com um “puxador” de microeletrodo (Model PB-7, Narishige, Tóquio, Japão), (Figura 23). Em seguida, a fibra situada entre os dois eletrodos formados é cortada, com o auxílio de uma tesoura. Logo após, ela deve ser isolada pela eletrodeposição polimérica (solução para a polimerização: 0,4 M alilamina, 0,23 M de 2-alilfenol e 0,23 M de 2-butoxietanol em solução de metanol:água 1:1 (v/v)).

A eletrodeposição realizada, em capela, é conseguida pela aplicação de um potencial de +4 V entre 2 a 3 minutos com um eletrodo de platina como contra eletrodo (Figura 24A). A deposição do polímero é acompanhada sob microscópio. Observa-se a presença de bolas ao longo da fibra de maneira regular. Subsequentemente, os microeletrodos são lavados em água destilada e o polímero curado por 3 horas a 150°C para reticular e formar uma camada na superfície da fibra de carbono (Figura 24B). A ponta do microeletrodo é polida num polidor com micropartículas de diamante (Modelo EG-4, Narishige, Tokio, Japão) num ângulo de 45° durante 3 minutos. Esse processo limpa e regula a superfície exposta de carbono (Figuras 25A e B).



(A)

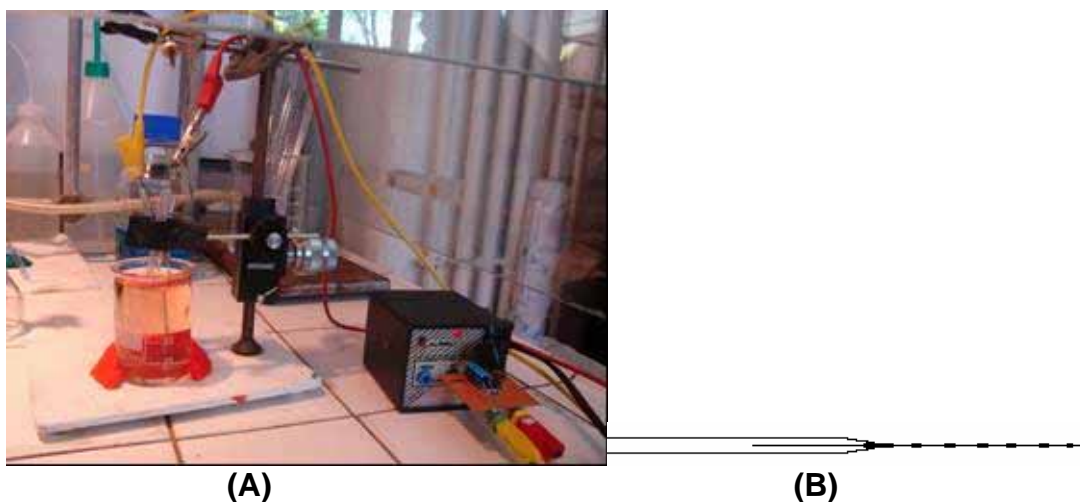
(B)

**Figura 22:** (A) Fibras de carbono de 10  $\mu\text{m}$  e capilar; (B) Aspiração das fibras separadas individualmente dentro de um capilar de vidro de 1 mm de diâmetro.

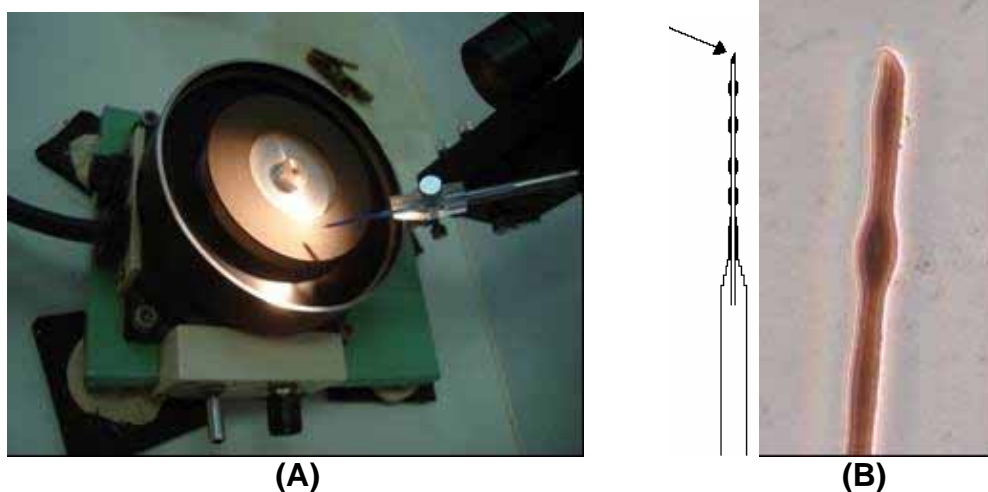


**Figura 23:** "Puxador" de eletrodos e esquema dos eletrodos formados.





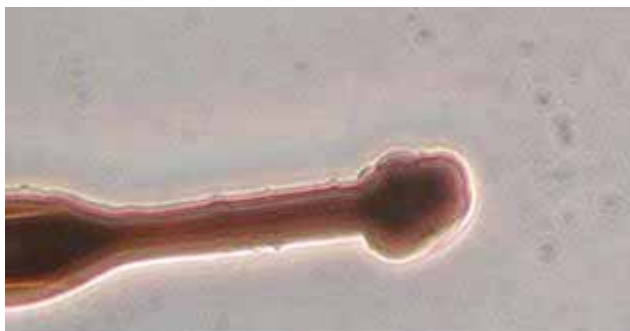
**Figura 24:** (A) Eletrodeposição do polímero nos microeletrodos de carbono, eletrodo de platina como contra eletrodo, potencial de + 4 V; (B) Desenho do microeletrodo de carbono após a eletrodeposição do polímero.



**Figura 25:** (A) Polimento do microeletrodo de carbono platinizado com ângulo de 45°; (B) Desenho e foto da forma da extremidade do eletrodo após o polimento.

Para aumentar a sensibilidade do microeletrodo e seletividade *versus* sua reatividade com relação às espécies reativas de oxigênio e nitrogênio liberadas pelas células, a superfície de carbono polida foi platinizada (para 5 mL de solução de platinização: 1,2 mg de acetato de chumbo; 0,75 mL de hexacloroplatinato de hidrogênio e 4,8 mL de tampão fosfato (pH 7,4) em potencial de -60 mV *versus* eletrodo de calomelano saturado (Figura 26). O aumento linear da corrente de deposição redutiva é acompanhado em computador e o processo é interrompido quando a carga elétrica do sinal alcançado atinge o valor entre 30 – 40  $\mu\text{C}$ ,

correspondendo à atividade ótima da superfície do eletrodo para os experimentos com as células (Arbault et al, 1995).



**Figura 26:** Eletrodo platinizado.

### 3.3 Cultura Celular

O trabalho foi efetuado com macrófagos da linhagem celular RAW 264.7. Eles são provenientes de ratos e foram cedidos pela equipe do Professor Jean Claude Drapier da Université de Gif-sur-Yvette – França. As células vieram prontas para serem mantidas em culturas e são capazes de se multiplicar *ex vivo*.

Estes macrófagos da linhagem RAW 264.7 são mantidos a 37°C numa atmosfera com 5% CO<sub>2</sub> em meio D-MEM (“Dulbecco’s Modified Eagle Médium”) contendo 1,0 g/L de *D*-glicose e 110 mg/L de piruvato de sódio (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). O meio foi suplementado com 5% de soro fetal bovino (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 50 µg/mL de gentamicina.

O meio de cultura era trocado a cada 2 dias. A cultura era examinada ao microscópio para observar o grau de confluência, e assim que era atingido 80 % da superfície do frasco de cultura, as células eram repicadas e mantidas numa densidade de 2-5 x 10<sup>6</sup> células por mL, segundo uma diluição de 1:10 da suspensão celular e meio de cultura.

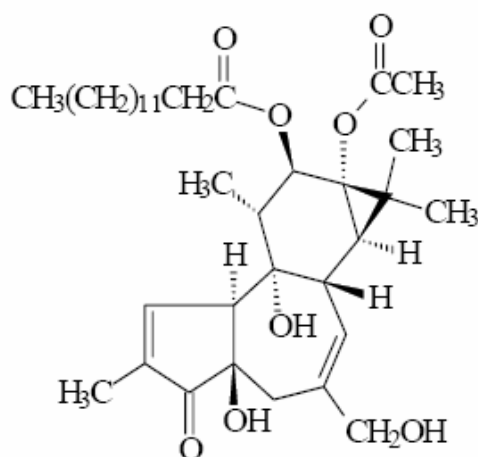
O processo de repicagem é obtido através do descolamento mecânico das células do frasco de cultura com o auxílio de uma seringa pela injeção do meio de cultura no fundo do frasco. Dessa suspensão resultante, duas a três gotas são colocadas, em placas de Petri (35 mm de diâmetro), usadas para os estudos eletroquímicos, 24 horas mais tarde, sendo adicionados, 2 mL de meio de cultura. O tempo de 24 horas é necessário para que as células recobram e se recuperem à superfície da placa de Petri.

### 3.4 Tratamento Celular

Para a realização do tratamento e execução dos experimentos, as células são incubadas com a substância pelo tempo desejado em meio de cultura. A concentração de etanol ou DMSO no meio de cultura foi inferior a 1 %. As células controle receberam a mesma quantidade de etanol ou DMSO que as culturas submetidas ao tratamento com as substâncias.

Os experimentos são executados na ausência (controle negativo, branco) e presença da substância a ser investigada, no caso, a beta-lapachona e alfa-lapachona. Os macrófagos foram incubados com meio de cultura acrescido das substâncias escolhidas, a partir de sua solução-estoque. Após o tempo determinado de incubação com as substâncias estudadas, as células são lavadas três vezes com tampão fosfato (PBS), pH 7,4. As células controle sofrem o mesmo processo que as células tratadas.

Para as análises com o ácido ascórbico, foram utilizadas duas linhagens de células. A primeira delas refere-se aos macrófagos RAW 264.7, metodologia já descrita acima, e a segunda linhagem PLB-985, advém de uma linhagem de células mielóides capazes de se diferenciar em granulócitos (como neutrófilos) ou monócitos (como macrófago) na presença de agentes indutores. A linhagem celular PLB-985 foi cultivado a 37°C, sob uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, em meio RPMI 1640 contendo glutamax (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O meio é suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen) e com 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma, St. Louis, MO, USA). Neste trabalho, o mecanismo de estresse oxidativo é investigado com PLB-985, previamente tratado com PMA (1-phorbol 12-myristate-13-acetate - Sigma). Estas células são incubadas entre 40 a 60 minutos com 50nM de PMA (8 mM de solução estoque foi preparada em etanol e diluída no meio de cultura).



1-Forbol 12-miristato-13-acetato (PMA).

Entre 30-40 minutos, em PBS, as células começam a mudar de aspecto e de resposta, sendo assim descartadas. Daí, o tempo de experimento, em média, limitou-se a 30 minutos.

É necessário ressaltar que essa linhagem celular foi utilizada por outro estudante de doutorado da École Normale Supérieure, Yann Verchier, em suas pesquisas, e para esse trabalho, foram utilizados apenas os dados das medidas amperométricas executadas por ele, para efeito de comparação.

### 3.5 Condicionamento do eletrodo (corrente de base)

Antes de iniciar as medidas, faz-se necessário a despolarização do eletrodo. Para despolarizar o eletrodo de trabalho, aplica-se o potencial desejado (850, 650, 450 ou 300 mV) versus eletrodo de referência (ECSS), em tampão PBS (pH 7,4), e observa-se uma corrente capacitiva (na ordem de dezenas a centenas de nanoampères) que diminui de maneira exponencial até um valor praticamente estável (na ordem de dezenas de picoampères – de acordo com o potencial aplicado). O tempo necessário para atingir uma corrente na ordem de picoampère é cerca de 30 a 40 minutos (PRG-DEL amperometric detector, Radiometer Analytical, Copenhagen, Denmark).

### 3.6 Medidas em uma única célula

O primeiro passo para iniciar a medida amperométrica é posicionar o eletrodo no fundo da placa de Petri, no mesmo nível das células. Em seguida, procurar

células isoladas uma da outra para evitar que a medida obtida seja proveniente de várias células. Essas células devem apresentar características fisiológicas semelhantes como forma, tamanho, brilho, etc.

O segundo passo é posicionar o microeletrodo de fibra de carbono platinizada sobre a célula numa distância micrometricamente precisa. Essa precisão é conseguida com o auxílio de micromanipuladores (MHW-103, Narishige) que permitem controlar o deslocamento desse eletrodo nos três eixos.

O processo para posicionar o eletrodo sobre a célula foi executado da seguinte forma: o eletrodo é fixado no micromanipulador com um ângulo de 45° em relação ao fundo da placa de Petri, a parte que foi polida e platinizada é colocada paralela ao plano da célula. Assim que a célula a ser analisada é escolhida, toca-se o eletrodo no fundo da placa de Petri, isso é percebido pelo deslizar suave da ponta no fundo da placa, e este é elevado cerca de 10 a 15 µm acima do fundo da placa de Petri, o que significa situar-se a uma distância de 5 µm da superfície da célula, sendo a precisão na ordem de  $\pm 1$  µm, e, depois o eletrodo é deslocado e posicionado exatamente acima da célula.

Essa altura é distante o suficiente para que a superfície do eletrodo não seja danificada ou poluída com qualquer partícula celular, entretanto, é uma distância próxima o suficiente para que sejam coletadas por difusão todas as substâncias eletroativas emitidas pelas células.

Os experimentos são executados em temperatura ambiente controlada ( $22 \pm 1$  °C), dentro de uma gaiola de Faraday, em microscópio invertido (Axiovert 135, Zeiss, Göttingen, Alemanha). As placas de Petri contendo macrófagos aderentes, em presença ou não da substância a ser analisada, foram lavadas três vezes com tampão fosfato (PBS) e preenchidas com aproximadamente 5 mL desse tampão imediatamente antes do experimento.

Após o posicionamento do eletrodo de trabalho acima da superfície do macrófago isolado, inicia-se o processo de despolarização membranar mecânica. Para despolarizar mecanicamente a membrana celular e induzir o estresse oxidativo, a ponta do capilar de vidro fechado é posicionada por um segundo micromanipulador entre a superfície do eletrodo e a célula (Figuras 27 e 28). O microcapilar é movido rapidamente em um movimento de ida e volta, com o ajuste do eixo z do micromanipulador para tocar a membrana celular e depois retornar à posição inicial em menos de 1 s. Esta rápida intrusão da ponta do microcapilar na

membrana celular induz a despolarização local e é suficiente para ativar as enzimas responsáveis pela geração da explosão oxidativa.

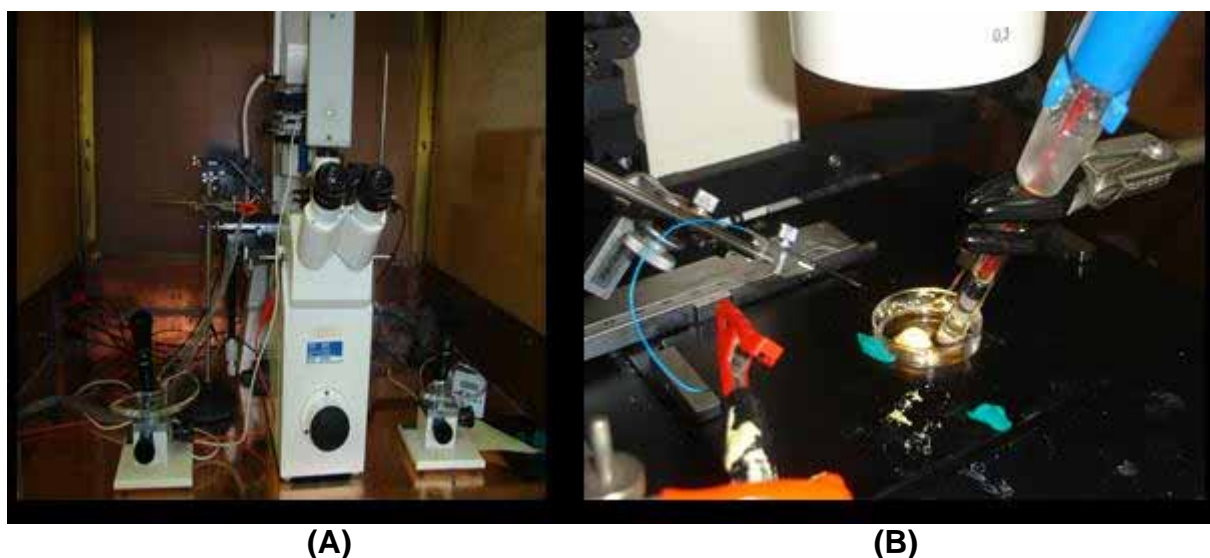
Uma vez a medida realizada, o microeletrodo e a micropipeta de vidro são suspensos e reposicionados para uma nova leitura.

Um eletrodo pode realizar cerca de cinquenta medidas, pois ele, lentamente, perde sua sensibilidade devido, provavelmente, à sujeira na sua superfície pelas substâncias presentes e liberadas pelas células. Os eletrodos podem ser reutilizados após sua ponta ser cortada, polida e platinizada, constituindo, portanto, nova superfície.

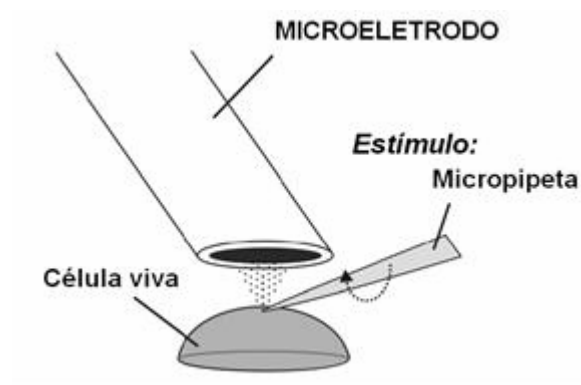
Um dos “inconvenientes” de se trabalhar em experimentos com célula única está ligado à variabilidade celular dentro de um mesmo grupo celular. Essa variabilidade também pode ocorrer de acordo com o tempo de incubação após a repicagem, a quantidade de células dentro da placa de Petri, etc. Para que os resultados sejam estatisticamente aceitos a cada potencial e concentração estudados, foram preparadas várias placas de Petri no mesmo tempo e em cada amostra são feitas medidas em cerca de vinte células.

É possível haver variação da resposta celular durante o dia, por isso é feito o controle a cada experimento e a média dos resultados é obtida separadamente.

As leituras foram realizadas em tampão fosfato (PBS) pH 7,4.



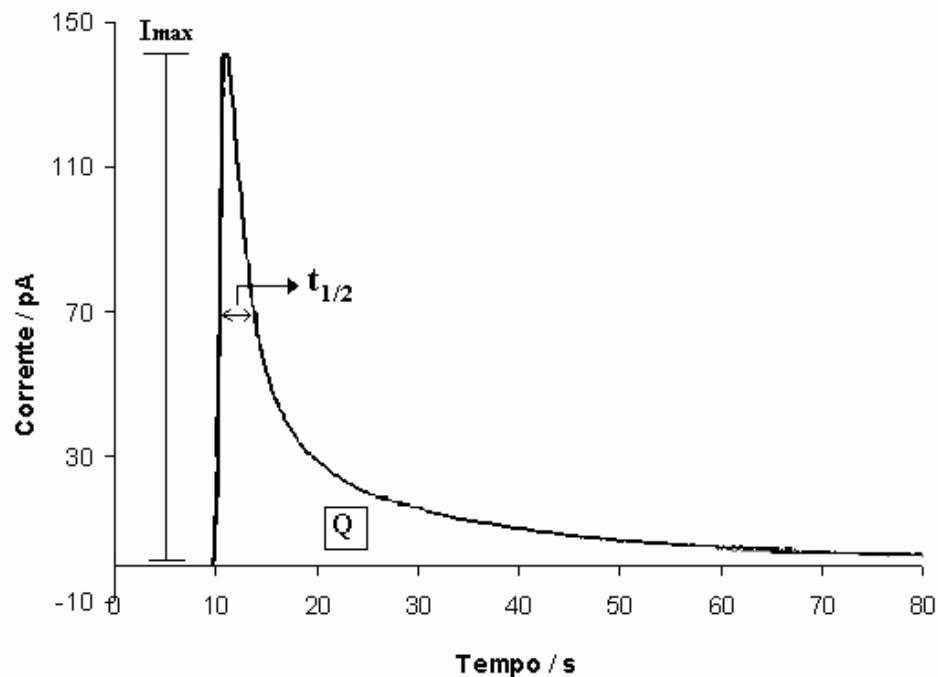
**Figura 27:** (A) Microscópio invertido com os micromanipuladores (direita e esquerda), (B): Posicionamento do microeletrodo de carbono platinizado, eletrodo de referência (Calomelano) e da micropipeta (utilizada para provocar a despolarização mecânica da membrana) sobre a placa de Petri, contendo macrófagos.



**Figura 28:** Esquema relacionado à despolarização mecânica da membrana e leitura dos sinais emitidos pela célula viva pelo microeletrodo.

Assim que a membrana celular do macrófago é tocada, ocorre a despolarização membranar, e a corrente que se encontrava em estado *quasi* estacionário aumenta rapidamente até um valor máximo, e depois diminui lentamente. O sinal amperométrico detectado desse estímulo apresenta a forma de um único pico não simétrico (Figura 29), apresentando as seguintes características:

- Amplitude máxima em corrente ( $I_{\max}$ ) (pA)
- A largura à meia-altura ( $t_{1/2}$ ) (s)
- A carga coulométrica (Q) (pC) que corresponde à quantidade total das espécies eletroativas detectadas à superfície do eletrodo de carbono platinizado.



**Figura 29:** Resposta amperométrica obtida da despolarização mecânica membranar que foi detectada por um microeletrodo de fibra de carbono platinizada, em macrófagos, em PBS (pH 7,4), em situação controle.

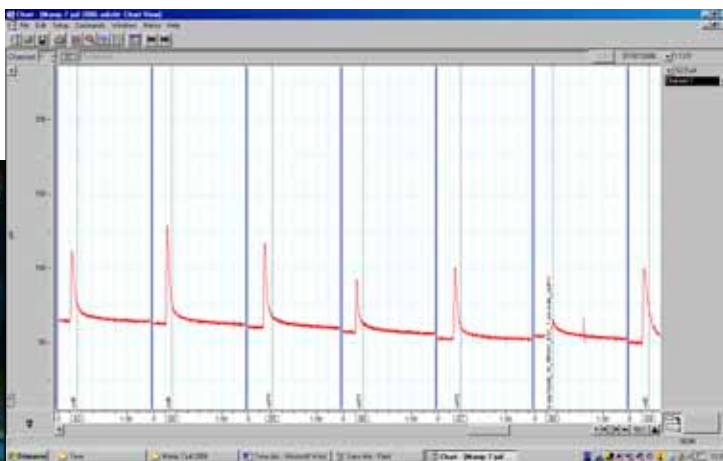
### 3.7 Detecção das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

A liberação das espécies oxigenadas (ERO) e das espécies nitrogenadas reativas (ERN) é tempo-dependente e são detectadas em tempo real por amperometria (PRG-DEL amperometric detector, Radiometer Analytical, Copenhagen, Dinamarca), em potencial constante *E versus* o eletrodo de referência ESC (Eletrodo de Calomelano Saturado). A corrente amperométrica é monitorada e estocada num computador via um conversor A/D (Powerlab 4SP, AD Instruments, Colorado Springs, CO, EUA) e sua interface software (Chart version 5.0) (Figura 30). A escolha apropriada do potencial do microeletrodo (*E*) seletivo para a medida do fluxo tempo-dependente de cada espécie liberada pelas células foi realizada com base nos estudos voltamétricos da oxidação de soluções independentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ONOO<sup>-</sup>, NO<sup>°</sup> e NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (cada uma delas em 1 mM em PBS, pH 7,4) (Figura 12) (Amatore e cols., 2006).





(A)



(B)

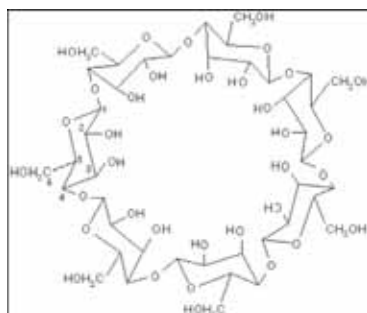
**Figura 30:** (A) Detector amperométrico, conversor do sinal amperométrico (Powerlab) e (B) sua resposta no software.

Este procedimento foi utilizado para o estudo com a beta-lapachona, alfa-lapachona, derivado reduzido da beta-lapachona e ácido ascórbico.

### 3.8 Estudo da formação do complexo de inclusão entre a beta-lapachona e beta-ciclodextrina

Experimentos foram executados por espectrofotometria no UV-Visível com o aparelho UV (Safas). Para a formação do complexo, na presença de etanol, a beta-lapachona foi primeiro dissolvida em etanol e, então, em tampão fosfato, com adição posterior de beta-ciclodextrina (Aldrich) (Figura 31). A solução resultante foi agitada a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , por cerca de 30 horas em rotação de aproximadamente 700 rpm e analisada [ $\lambda_{\text{max}} = 258 \text{ nm}$ ,  $\lambda = 90 \text{ mL} / (\text{mg}\cdot\text{cm})$ ]. Em seguida, na ausência de etanol, a beta-lapachona foi adicionada no tampão contendo 10 equivalentes de beta-ciclodextrina. A suspensão foi agitada por cerca de 30 horas em temperatura ambiente  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  até a solubilização completa da beta-lapachona.

Após a dissolução completa da beta-lapachona, foi adicionado etanol em diferentes proporções para observar o papel do solvente na complexação, com posterior cálculo das constantes de complexação.



**Figura 31:** Representação da beta-ciclodextrina

### 3.9 Estudo do ácido ascórbico

As soluções aquosas de ácido ascórbico, peróxido de hidrogênio e nitrito de sódio foram preparadas imediatamente antes de cada experimento. A investigação da estabilidade do ácido ascórbico em soluções aeróbicas, ou da possível interação entre o ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio ou nitrito de sódio foram executadas por espectrofotometria no UV-Vis (Safas) de uma solução estoque 5 mM de cada espécie ou de sua mistura, cada uma sendo diluída para 1 mM. A temperatura de análise espectrofotométrica foi 37 °C.

### 3.10 Análise Estatística

Os resultados são expressos com barra de erro da média do desvio padrão. O teste ANOVA foi usado para determinar a significância estatística das diferenças entre as médias e pós-teste de Bonferroni, e um valor  $p < 0,05$  (\*) foi considerado como significativo.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Alfa e beta-lapachonas

Para a detecção direta, seletiva e em tempo real de importantes espécies reativas do oxigênio e nitrogênio ( $O_2^{\bullet}$ ,  $NO^{\bullet}$ ,  $ONOO^-$ ,  $NO_2^-$  e  $H_2O_2$ ), aliado a sua quantificação, os métodos eletroquímicos apresentam-se vantajosos por permitir a observação direta do surto oxidativo por amperometria (Amatore e Arbault, 2007; Machado e cols., 2000), em ultramicroeletrodo de fibra de carbono platinizada.

Conforme mostrado na introdução, a beta-lapachona apresenta um amplo espectro de ações farmacológicas e biológicas, destacando-se sua atividade anticâncer. Apresenta interação positiva com vários alvos, sem uma definição clara do seu mecanismo biológico de ação. Essa indefinição prejudica sua utilização clínica. Entre os mecanismos mais citados, está sua atuação como geradora de ERO (Dubin e cols., 1990; Portela e cols., 1996; Goijman e Stoppani, 1985; Docampo e cols., 1979; Docampo e cols., 1979; Chau e cols., 1998; Liu e cols., 2002)., principalmente contra parasitos como *Trypanosoma cruzi* (Boveris e cols., 1978), em células leucêmicas (Chau e cols., 1998), causando danos ao DNA. Em nível mais amplo, há ainda controvérsia na literatura sobre se quinonas atuam como geradoras ou seqüestradoras de ERO em células (Afanas'ev e cols., 1990).

A investigação ultramicroeletroquímica de sua atuação em células vivas torna-se, portanto, relevante, com obtenção de informações eventualmente esclarecedoras, portanto, úteis e complementares na definição de seu mecanismo de ação biológica. Entre as células disponíveis, a escolha recaiu sobre macrófagos.

Poucos estudos foram feitos sobre a ação da beta-lapachona em macrófagos (Liu e cols., 1999; Tzeng e cols., 2003; Moon e cols., 2007). O presente trabalho é o primeiro que relata a detecção, quantificação e discriminação das espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio ( $NO_2^-$ ,  $NO^{\bullet}$ ,  $ONOO^-$ ,  $O_2^{\bullet}$  e  $H_2O_2$ ) liberadas nessa linhagem celular, após incubação com alfa- e beta-lapachonas, por meio da amperometria, usando o ultramicroeletrodo de fibra de carbono platinizada como detector. Essa técnica é rápida, direta e confiável e facilmente acoplada à visualização celular com microscópio invertido (Amatore e cols., 2006; Arbault e cols., 1995).

Os efeitos de várias concentrações das alfa- e beta-lapachonas no surto oxidativo liberado por macrófagos e o estudo cinético dessa liberação foram investigados. A resposta celular foi detectada em potencial de +850 mV vs. eletrodo saturado de calomelano (ESC). Este potencial permite a oxidação de várias ERON ( $O_2^{\bullet}$ ,  $ONOO^-$ ,  $NO^{\bullet}$ ,  $NO_2^-$  e  $H_2O_2$ ) fornecendo, simultaneamente e quantitativamente, informações sobre as mesmas, quando liberadas durante o surto oxidativo. Após a quantificação de espécies totais, para a beta-lapachona, diferentes potenciais foram aplicados para o estudo, em separado, das mesmas.

Os macrófagos RAW 264.7 isolados, em placa de Petri, são estimulados por despolarização membranar com um microcapilar. Este processo induz, em curto período de tempo (< 1 segundo), respostas ativas de oxidases (NADPH oxidase) e NO sintase, presentes na membrana celular (Amatore e *col/s.*, 2006; Verchier e *col/s.*, 2007).

Devido à variabilidade celular, cada resultado apresentado nos gráficos representa uma média de pelo menos 20 medidas individuais realizadas nas células.

Como resultado desse tratamento, 3 situações podem ser observadas:

- Ausência de efeito
- Diminuição do fluxo de liberação de ERON. Por razões de facilitação da redação, essa situação será denominada anti-oxidante, apesar de problemas conceituais ainda não resolvidos na literatura. O uso dessa palavra está relacionado à atenuação da liberação de ERON.
- Aumento do fluxo de liberação de ERON. Nessa situação, será utilizado o termo pró-oxidante.

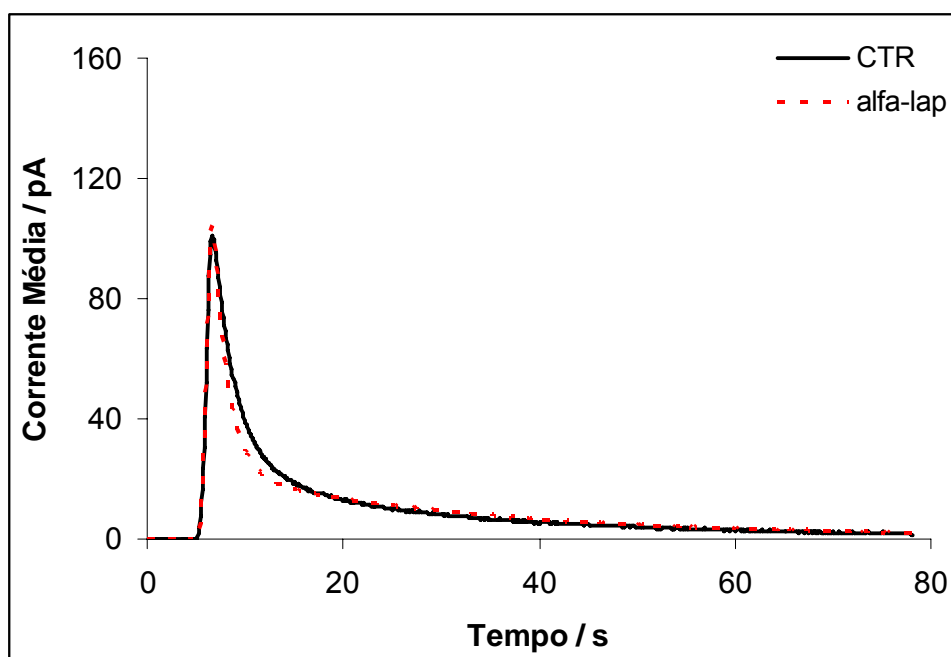
#### **4.1.1 O Efeito da concentração da alfa- e beta-lapachonas em macrófagos (RAW-264.7)**

Os resultados obtidos, após incubação de macrófagos, em soluções de alfa e beta-lapachonas são mostrados nas Figuras 32A e 32B, respectivamente, que comparam os picos oxidativos obtidos a partir da estimulação dos macrófagos na ausência (controle, CTR) e presença das substâncias, nas condições abaixo. A partir da área do voltamograma, obtém-se a carga (pC) - corrente (pA) *versus* tempo (s) – Esses valores relacionam-se à quantidade total de espécies liberadas pelas células.

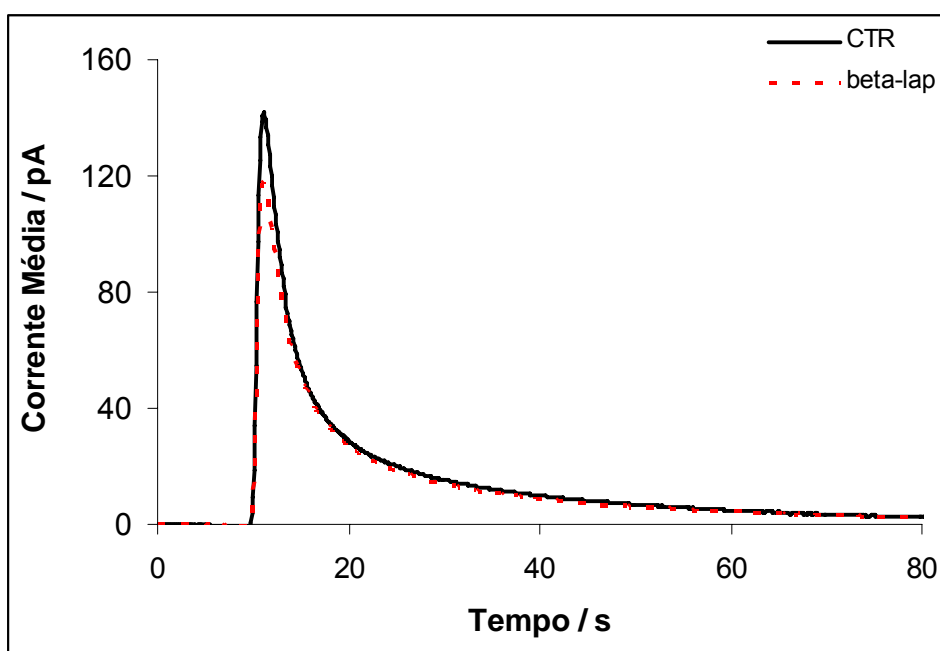
- Concentração de 1  $\mu\text{M}$ , durante 1 hora de incubação a 37°C em atmosfera de 5 % de  $\text{CO}_2$ , executado amperometricamente com microeletrodo de fibra de carbono platinizada estabilizado em +850 mV vs. ECSS.

A Figura 32A mostra que, em relação à corrente do controle (CTR), a resposta oxidativa referente à ação da alfa-lapachona não apresenta diferença, não sendo observado efeito significativo no surto oxidativo dos macrófagos. Já, na Figura 32B, referente aos resultados da beta-lapachona, observa-se uma corrente menor do que a corrente do controle (CTR). Isto indica que há diminuição na quantidade total de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio ( $\text{O}_2^\bullet$ ,  $\text{ONOO}^-$ ,  $\text{NO}^\bullet$ ,  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), quantificadas no potencial utilizado.

Após resultados iniciais (Figuras 32A e 32B), seguiu-se o estudo do efeito da concentração sobre os macrófagos. Para a beta-lapachona, foram utilizadas as seguintes concentrações: 0,01; 0,1; 1; 10 e 100  $\mu\text{M}$  e para alfa-lapachona: 10 e 100  $\mu\text{M}$ , com tempo de incubação de 1 hora, sob as mesmas condições anteriores. Por meio da integração dos voltamogramas (obtidos para cada concentração) de corrente *versus* tempo, obteve-se a carga, segundo a lei de Faraday (Bard and Faulkner, 2001).



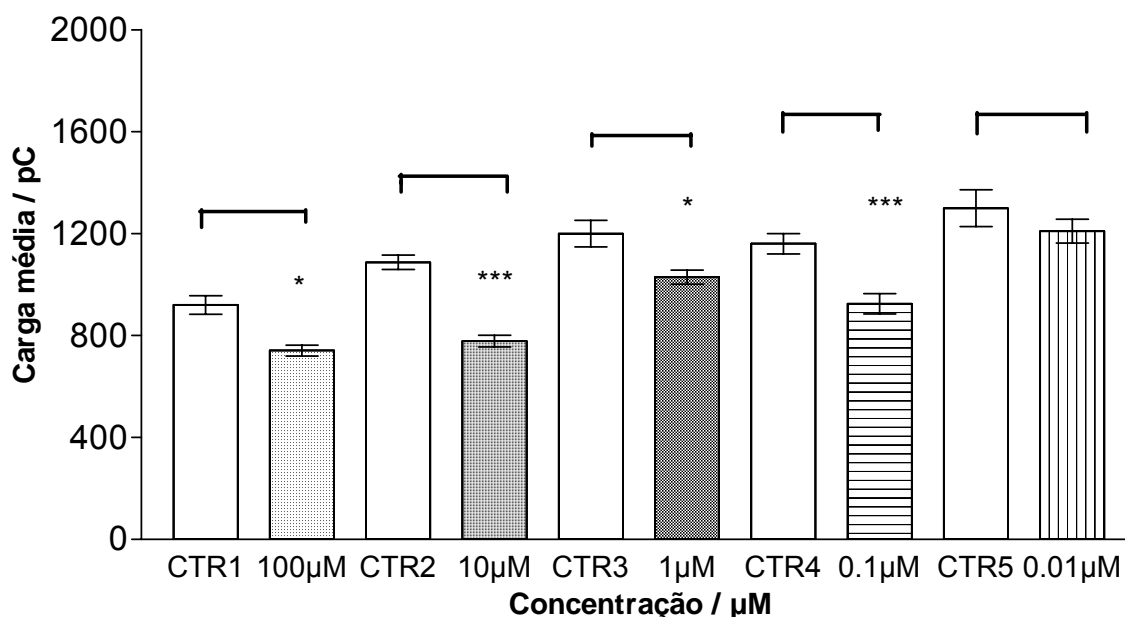
(A)



(B)

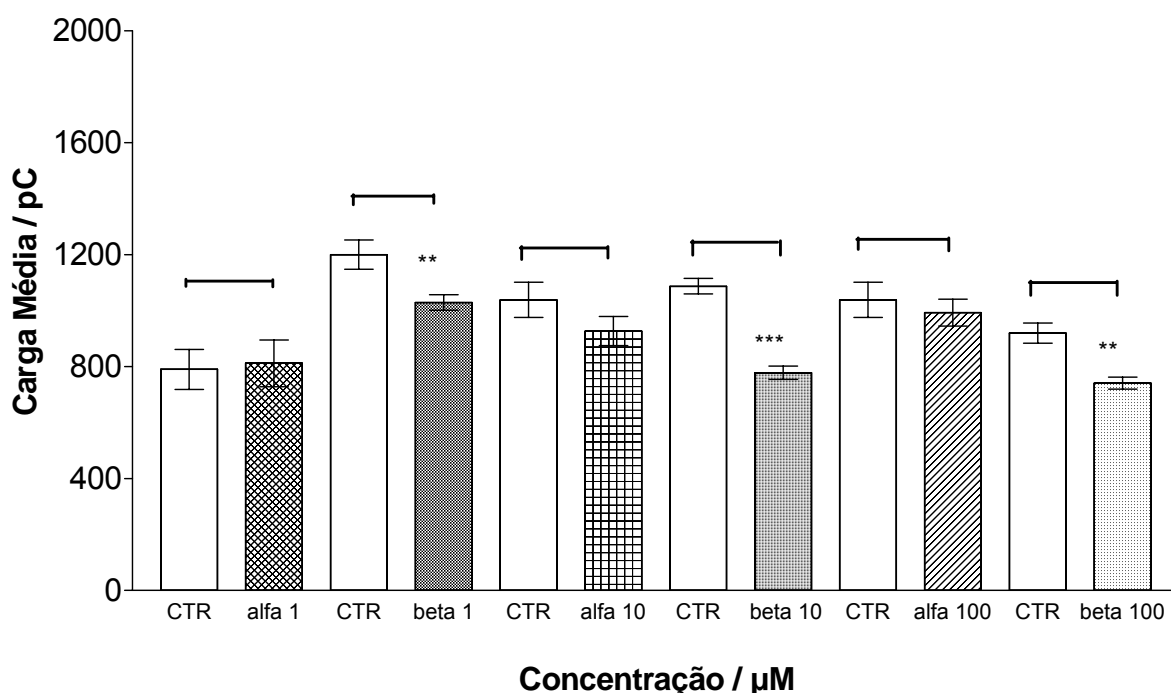
**Figura 32:** Corrente amperométrica média do surto oxidativo em macrófagos em condição controle (CTR) e após incubação com lapachonas ( $c = 1 \mu\text{M}$ ), durante 1 hora com alfa- (A) e beta-lapachona (B). Microeletrodo de fibra de carbono platinizada como eletrodo de trabalho e ECSS como referência. Tampão fosfato PBS ( $\text{pH} = 7,4$ ).  $E = +850 \text{ mV}$ . Cada curva representa a leitura de, no mínimo, 20 células.

A Figura 33, referente ao tratamento com a beta-lapachona, mostra a diminuição da quantidade total das espécies ERO e/ou ERN em relação ao controle para todas as concentrações, exceto para a concentração de 0,01  $\mu\text{M}$ , onde não houve diferença significativa. Isso indica que, para tempos curtos de incubação, a beta-lapachona provoca diminuição na liberação de ERON.



**Figura 33:** Liberação de ERON: gráfico comparativo do efeito da concentração de beta-lapachona, após incubação de 1 hora. Microeletrodo de fibra de carbono platinizada como eletrodo de trabalho e ECSS como referência em tampão fosfato PBS (pH = 7.4).  $E = 850 \text{ mV}$ . Cada curva representa a leitura mínima de 20 células. Os valores significativos em relação ao controle (CTR) são representados por (\*) para  $p < 0,05$  e (\*\*\*) para  $p < 0,001$ .

A Figura 34 mostra o efeito da concentração da alfa-lapachona em comparação ao da beta-lapachona nas condições já citadas acima. O gráfico mostra a carga média (pC) que está relacionada à quantidade das espécies liberadas, como já relatado. A alfa-lapachona não provoca alteração significativa nas respostas macrofágicas, após tratamento, em todas as concentrações estudadas. Com base nos resultados, pode ser considerada inativa em relação à alteração das respostas oxidativas das células RAW 264.7. Estudos da alfa-lapachona em menores concentrações (0,01 e 0,1  $\mu\text{M}$ ) não foram efetuados, já que a mesma se mostrou inativa em maiores concentrações (1  $\mu\text{M}$ ).



**Figura 34:** Liberação de ERON: gráfico comparativo do efeito da concentração da alfa e beta-lapachona, após incubação de 1 hora. Eletrodo de trabalho: microeletrodo de fibra de carbono platinizada; Eletrodo de referência: ECSS. Tampão PBS (pH = 7,4).  $E = +850$  mV. Cada curva representa a leitura mínima de 20 células. Os valores significativos em relação ao controle (CTR) são representados por (\*) para  $p < 0,05$ , (\*\*) para  $p < 0,01$  e (\*\*\*) para  $p < 0,001$ . Alfa 1 e beta 1:  $c = 1$   $\mu\text{M}$ ; alfa 10 e beta 10:  $c = 10$   $\mu\text{M}$ ; alfa 100 e beta 100:  $c = 100$   $\mu\text{M}$ .

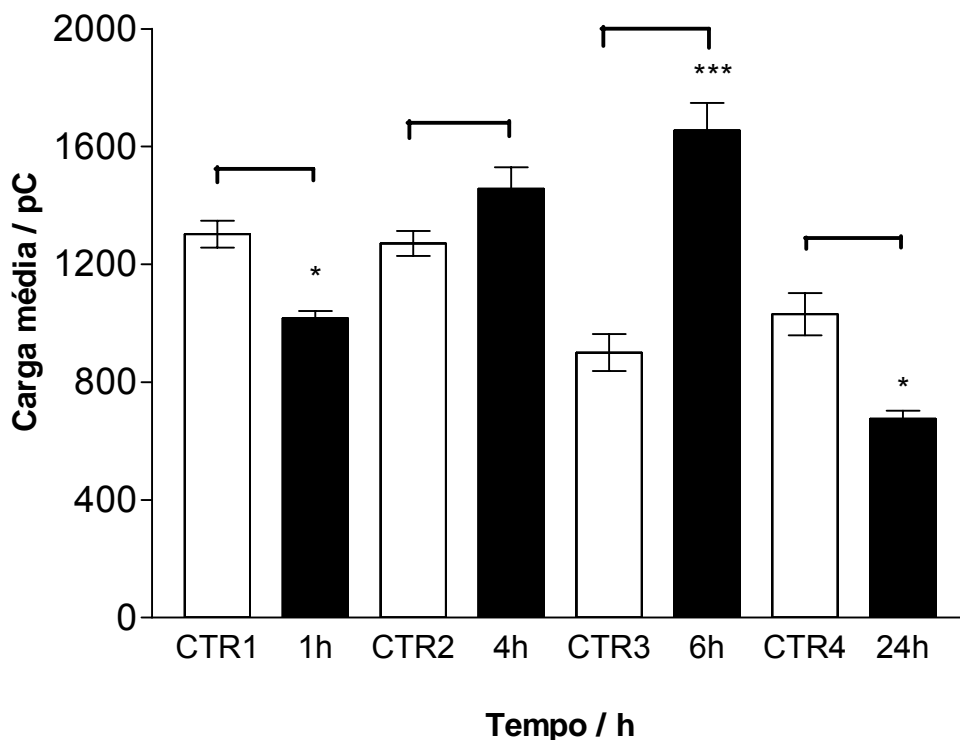
#### 4.1.2 Estudo cinético dos efeitos de alfa e beta-lapachona em macrófagos (RAW-264.7)

Após a análise da dependência da concentração, foram iniciados os estudos cinéticos para a beta-lapachona. Estes foram executados nas concentrações de 0,1 e 1  $\mu\text{M}$  nos tempos de 1, 4, 6 e 24 horas.

A Figura 35 mostra os resultados das medidas amperométricas relativas à liberação de ERON, em função do tempo de incubação com macrófagos, utilizando-se beta-lapachona ( $c = 1$   $\mu\text{M}$ ). As análises, nessa concentração, mostraram comportamento variável em relação ao tempo. Em todos os tempos analisados, houve variação da carga total. Em relação ao controle, em potencial de 850 mV, a carga média, nos tempos de incubação de 1 e 24 horas foi menor, já nos tratamentos de 4 e 6 horas, a carga média apresentou-se maior (Figura 35). Os resultados são indicativos de modificação da tendência anti-oxidante para pró-

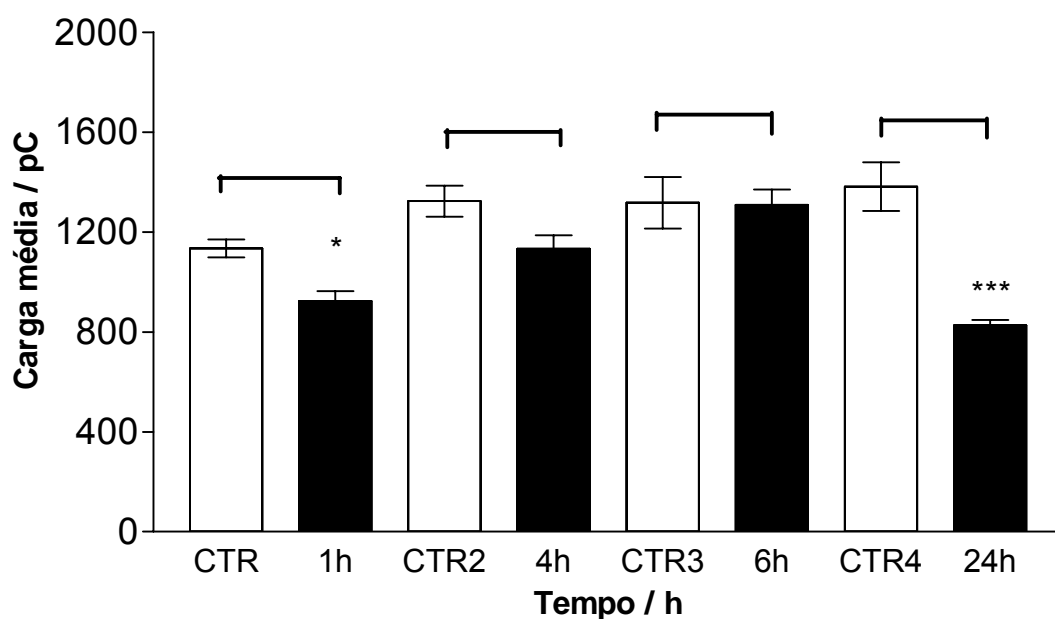


oxidante, com o aumento do tempo de incubação, com exceção dos experimentos com 24 horas (Figura 35).



**Figura 35:** Liberação de ERON: gráfico comparativo do efeito do intervalo de incubação de macrófagos com beta-lapachona ( $c = 1 \mu\text{M}$ ). Microeletrodo de fibra de carbono platinizada como eletrodo de trabalho e ECSS como referência. Tampão fosfato ( $\text{pH} = 7,4$ ).  $E = 850 \text{ mV}$ . Cada curva representa a leitura de, no mínimo, 20 células. Os valores significativos em relação ao controle (CTR) são representados por (\*) para  $p < 0,05$ , (\*\*) para  $p < 0,01$  e (\*\*\*) para  $p < 0,001$ . CTR1, CTR2, CTR3 e CTR4 representam os controles, com tempos de incubação de 1 h, 4 h, 6 h e 24 h, respectivamente.

A Figura 36 apresenta o efeito cinético, a partir de incubação com  $0,1 \mu\text{M}$ , nos períodos de 1, 4, 6 e 24 horas. Houve redução de ERON em relação ao controle, sendo os dados significativos nos intervalos de 1 e 24 horas. Já, no tratamento com 4 e 6 horas, não houve variação na resposta oxidativa dos macrófagos.

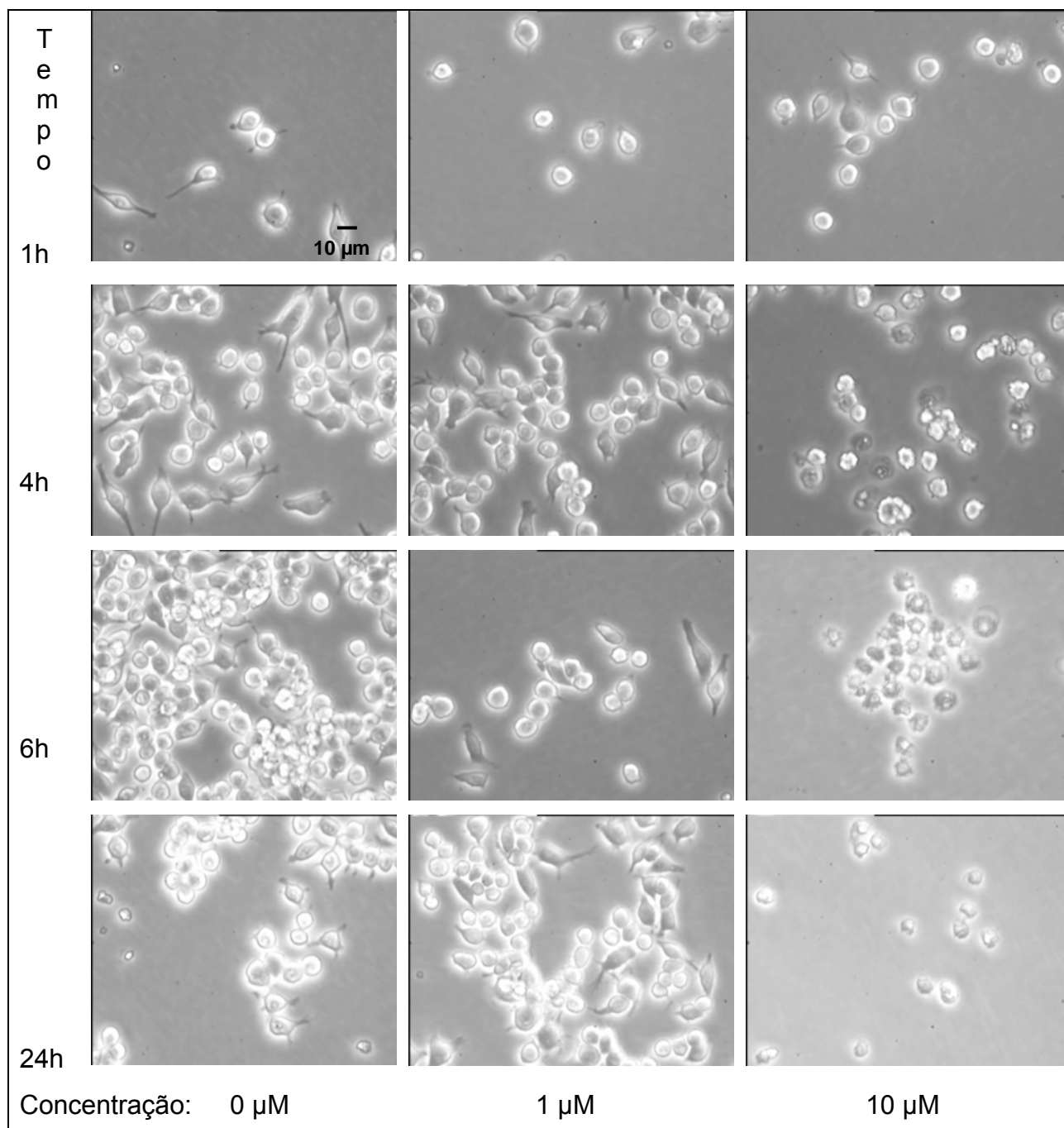


**Figura 36:** Liberação de ERO: gráfico comparativo do efeito do intervalo de incubação de macrófagos com beta-lapachona ( $c = 0,1 \mu\text{M}$ ). Microeletrodo de fibra de carbono platinizada como eletrodo de trabalho e ECSS como referência. Tampão fosfato ( $\text{pH} = 7,4$ ).  $E = 850 \text{ mV}$ . Cada curva representa a leitura no mínimo 20 células. Os valores significativos em relação ao controle (CTR) são representados por (\*) para  $p < 0,05$ , (\*\*) para  $p < 0,01$  e (\*\*\*) para  $p < 0,001$ . CTR1, CTR2, CTR3 e CTR4 representam os controles, com tempos de incubação de 1 h, 4 h, 6 h e 24 h, respectivamente.

As Figuras 35 e 36 mostram, ainda, que a beta-lapachona, em células RAW 264.7, nas concentrações de  $0,1$  e  $1 \mu\text{M}$ , causa a diminuição significativa de ERO, após 24 horas de incubação. Apesar dessa diminuição acentuada na resposta oxidativa das células, não se observou, visualmente, qualquer mudança na morfologia das células estudadas.

A Figura 37 refere-se às micrografias, com objetiva de  $40 \times$ , dos macrófagos nas seguintes condições: controle (CTR) e após incubação com  $1$  e  $10 \mu\text{M}$  de beta-lapachona, em tempos de 1, 4, 6 e 24 horas. O tratamento com  $1 \mu\text{M}$  (segunda coluna) não provocou qualquer alteração nas características dos macrófagos, RAW 264.7, em quaisquer dos tempos observados, em relação ao controle. Com concentração superior a  $10 \mu\text{M}$  e tempo de incubação acima de 4 horas, os macrófagos passaram a apresentar morfologia diferente, em forma de roseta, com enrugamento de sua membrana celular, assim como descolamento das células do fundo da placa de Petri, características de apoptose, indicando que a beta-

lapachona apresenta citotoxicidade após este tempo de incubação e nesta concentração para os macrófagos estudados.

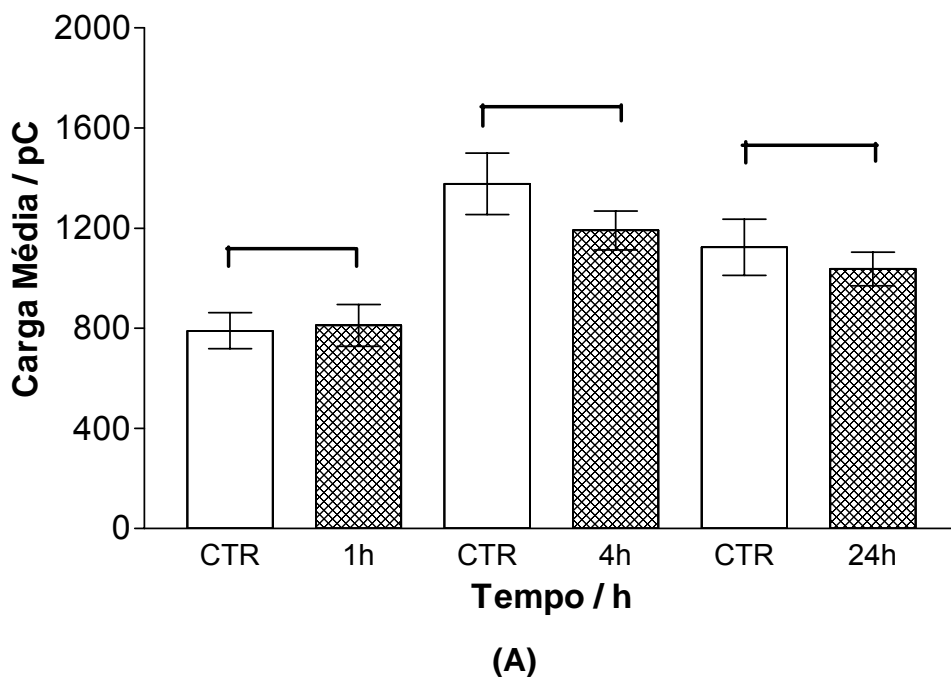


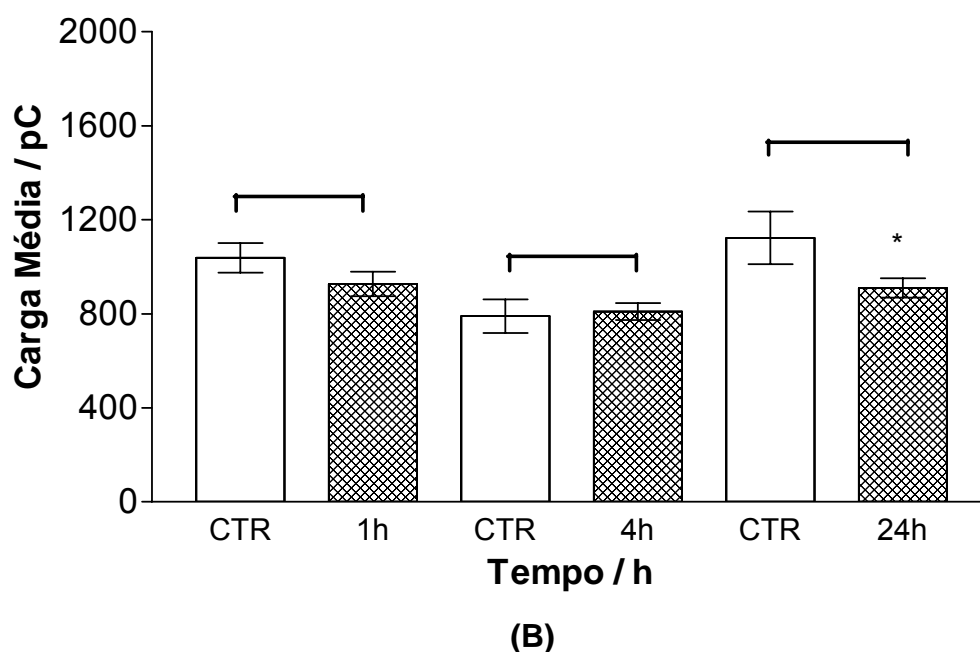
**Figura 37:** Micrografias dos macrófagos controle (CTR – 0 μM) e dos macrófagos incubados com beta-lapachona (c = 1 e 10 μM), nos intervalos de tempo de 1, 4, 6 e 24 horas. Microscópio óptico invertido com objetiva de 40 X – contraste de fase.

Assim como investigado para a beta-lapachona, foi realizado o estudo cinético da ação da alfa-lapachona sobre macrófagos, nas seguintes condições:

concentrações de 1 e 10  $\mu\text{M}$ , nos tempos de 1, 4 e 24 horas. As Figuras 38 A e B mostram o efeito do tempo de incubação dos macrófagos com a alfa-lapachona, cada teste analisado em relação ao seu respectivo controle. É possível observar que em ambas as concentrações, não houve modificação significativa na liberação de ERON para os intervalos de tempo examinados. Esses resultados são diferenciados dos obtidos para a beta-lapachona.

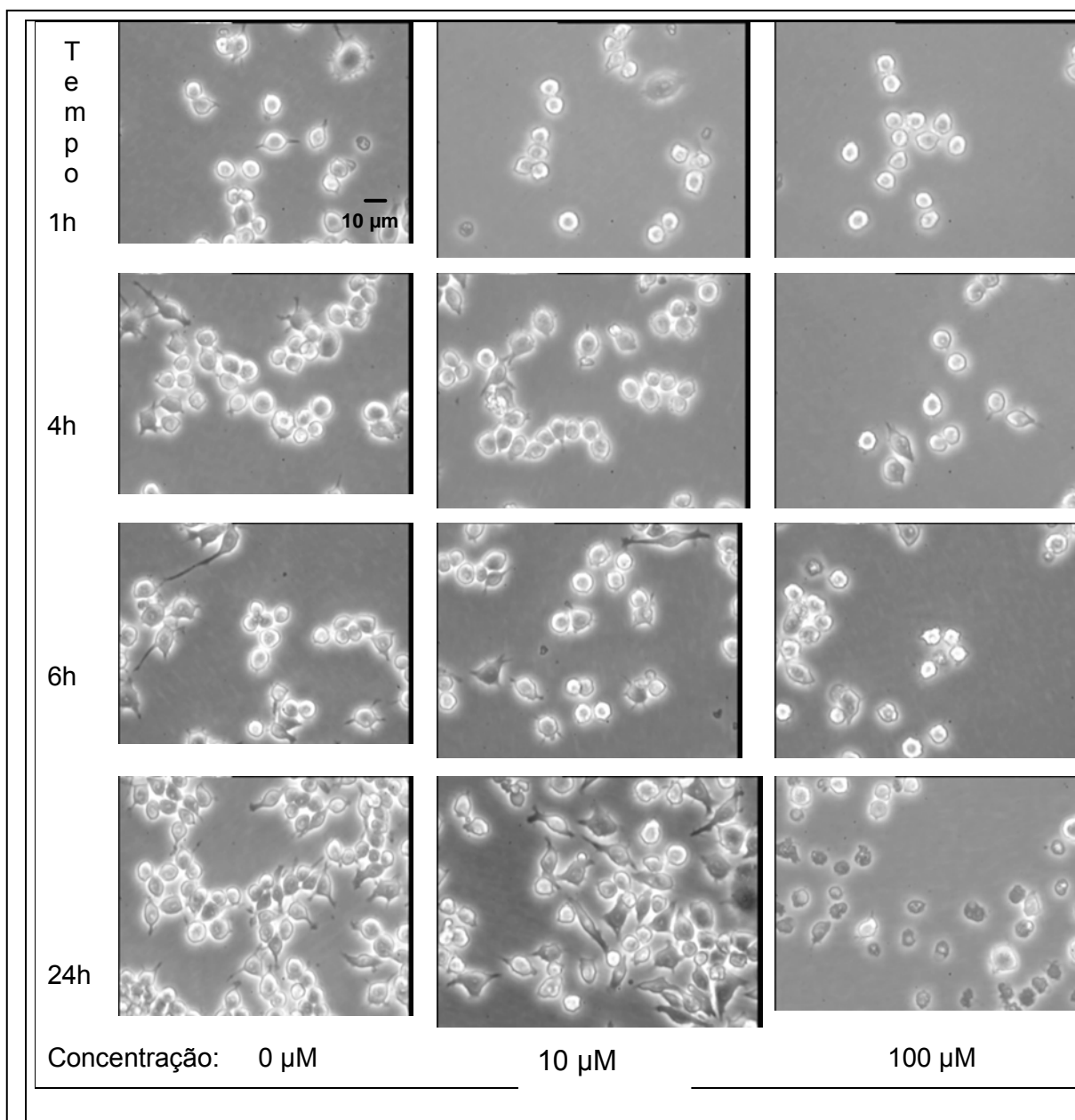
Ainda na Figura 38 B, foi observada modificação significativa apenas nos testes realizados na concentração de 10  $\mu\text{M}$  com 24 horas de incubação, onde se obteve diminuição de aproximadamente 20 % da liberação da quantidade total de ERON.





**Figura 38:** Liberação de ERON: gráfico comparativo do efeito da concentração de alfa-lapachona **(A)**  $c = 1 \mu\text{M}$  e **(B)**  $c = 10 \mu\text{M}$ , nos intervalos de 1, 4 e 24 horas. Eletrodo de trabalho: Microeletrodo de fibra de carbono platinizada; Eletrodo de referência: ECSS. Tampão fosfato PBS ( $\text{pH} = 7,4$ ).  $E = 850 \text{ mV}$ . Os valores significativos em relação ao controle (CTR) são representados por (\*) para  $p < 0,05$ .

A Figura 39 refere-se às fotografias, com objetiva de 40 X, dos macrófagos nas seguintes condições: controle (CTR) e após incubação com 10 e 100  $\mu\text{M}$  de alfa-lapachona, em tempos de 1, 4, 6 e 24 horas. As células observadas com tratamento de 10  $\mu\text{M}$  (segunda coluna) não apresentaram anormalidades em relação ao controle, concentração 0, situado na primeira coluna. Na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , após incubação acima de 4 horas, a alfa-lapachona provocou citotoxicidade nos macrófagos. Estes passaram a apresentar enrugamento da membrana celular, com forma de roseta e também o desprendimento das células da placa de Petri (Figura 39). Essa situação indica que a partir dessas condições de incubação, a alfa-lapachona apresenta citotoxicidade frente aos macrófagos RAW 264.7., concentração essa, dez vezes maior do que a concentração citotóxica da beta-lapachona.



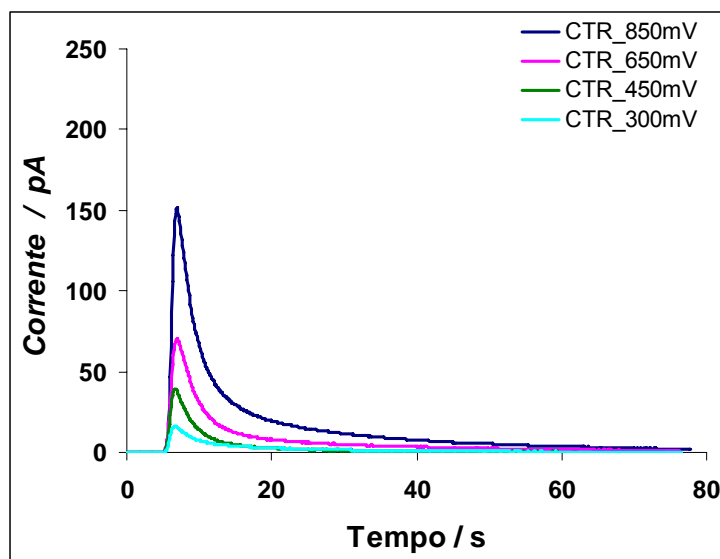
**Figura 39:** Micrografias dos macrófagos controle (CTR – 0 μM) e dos macrófagos incubados com alfa-lapachona ( $c = 10$  e  $100 \mu\text{M}$ ), nos intervalos de tempo de 1, 4, 6 e 24 horas. Microscópio óptico invertido com objetiva de 40 X – contraste de fase.

#### 4.1.3 Determinação da natureza das diferentes espécies liberadas por macrófagos RAW 264.7 durante a manifestação do estresse oxidativo após incubação com beta-lapachona

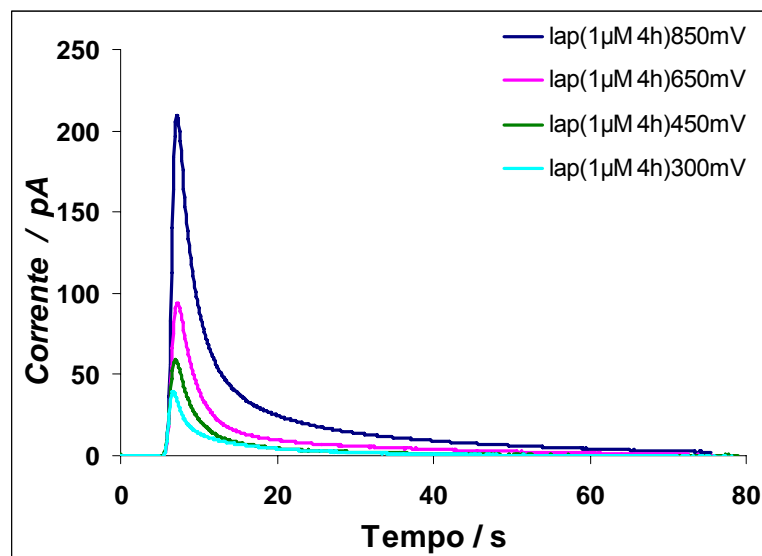
Os resultados, citados anteriormente, foram obtidos em potencial de +850 mV *versus* ECSS e estão relacionados ao fluxo total de ERON liberadas, sob condição de controle e após incubação com beta-lapachona. Como essa se mostrou ativa em relação à resposta oxidativa com as células estudadas, surgiu o interesse na

determinação e quantificação das espécies responsáveis por essa variação. A quantificação das espécies individuais é possível pelo ajuste do potencial desejado para o microeletrodo de fibra de carbono platinizada, eletrodo de trabalho (Amatore e Arbault, 2007), conforme mostrado na introdução.

A Figura 40A mostra o surto oxidativo em macrófagos-controle, após despolarização da membrana, representado pela corrente média em diferentes potenciais (850, 650, 450 e 300 mV) e a Figura 40B mostra o resultado em termos do surto oxidativo, após incubação por 4 horas, com beta-lapachona ( $c = 1 \mu\text{M}$ ). Esta condição foi escolhida, em vista do efeito observado para a beta-lapachona em  $E = 850 \text{ mV}$ , quando se verificou maior liberação de ERON, em relação ao controle, ou seja, quando a quinona apresentava um caráter pró-oxidante. As análises das espécies reativas individuais nos potenciais de 300, 450, 650 e 850 mV mostraram que nas células tratadas, todos os picos amperométricos foram superiores em relação ao controle (CTR), para todos os potenciais estudados (Figuras 40 A e B). Isto indica que a mudança nas respostas reflete-se na produção de todas as ERON investigadas.



(A)



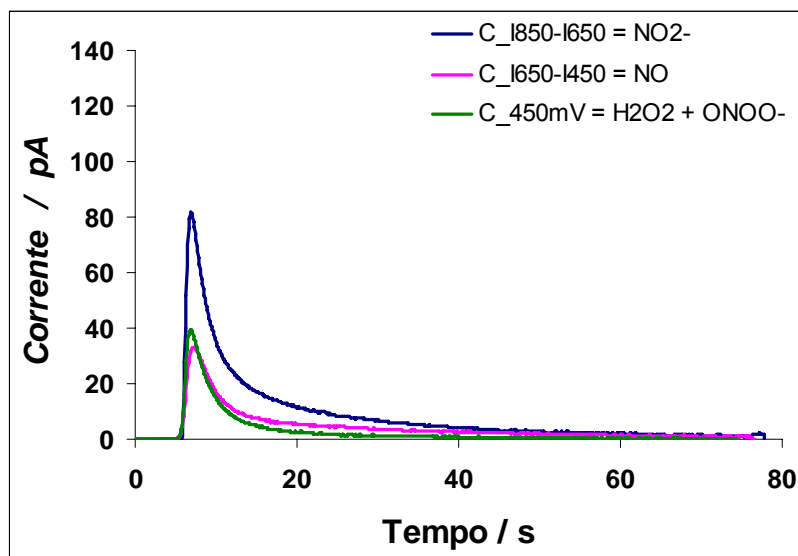
(B)

**Figura 40:** Picos amperométricos, em diferentes potenciais aplicados, relativos aos surtos oxidativos de macrófagos em condição controle (A) e após 4 horas de incubação com beta-lapachona ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) (B). Eletrodo de trabalho: Microeletrodo de fibra de carbono platinizada e Eletrodo de referência: ECSS. Tampão fosfato PBS ( $\text{pH} = 7,4$ ).  $E = 850, 650, 450$  e  $300 \text{ mV}$ . Cada curva representa a leitura de, no mínimo, 20 células.

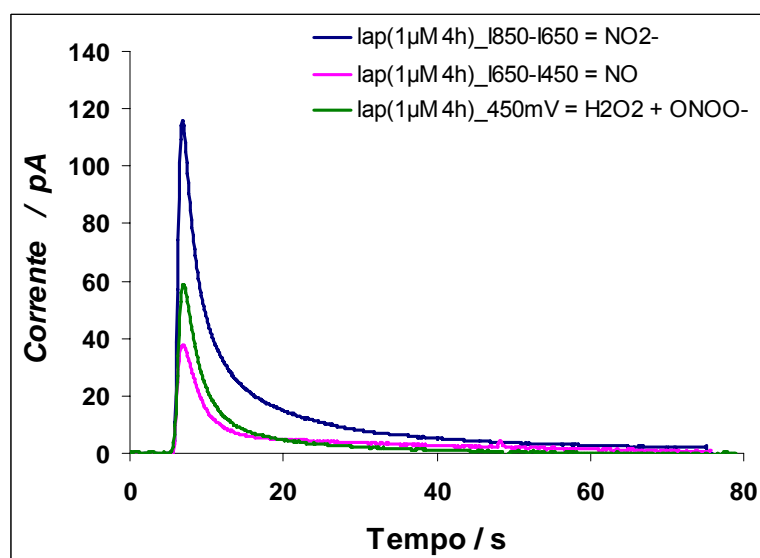
As Figuras 41A e B mostram as correntes médias residuais correspondentes aos picos, quando da subtração entre elas, nos potenciais entre 850 e 650 mV, entre 650 e 450 e a curva em 450 mV, relacionadas, respectivamente, às curvas de  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}^\bullet$  e  $\text{ONOO}^-$  com  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Os gráficos relativos aos processos de subtração mostram que as correntes correspondentes ao nitrito e à mistura de peroxinitrito e peróxido de hidrogênio são maiores do que aquelas do controle. Porém, não foi observada qualquer variação na altura de corrente relativa ao óxido de nitrogênio.





(A)



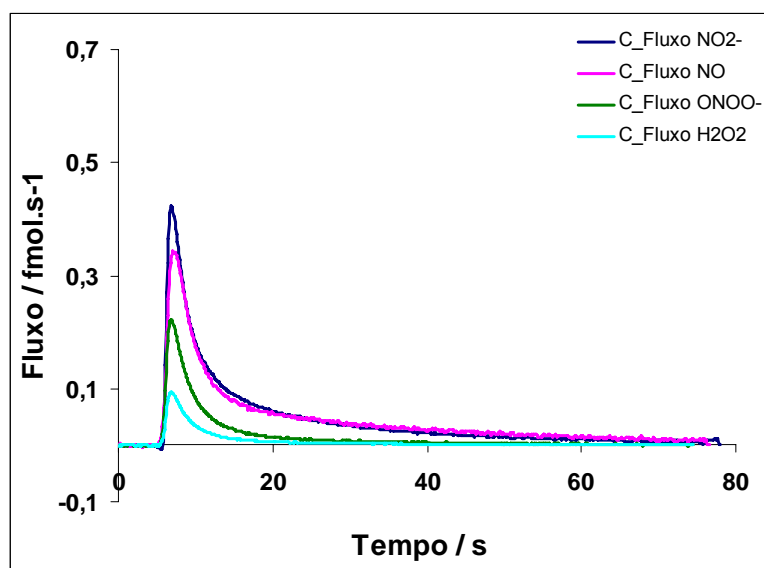
(B)

**Figura 41:** Resposta amperométrica em +450 mV *versus* ECSS e as curvas representativas da contribuição de  $\text{NO}_2^-$  ( $I^{850 \text{ mV}} - I^{650 \text{ mV}}$ ) e  $\text{NO}^\bullet$  ( $I^{650 \text{ mV}} - I^{450 \text{ mV}}$ ), a partir dos picos amperométricos relativos ao surto oxidativo detectado em macrófagos, em condição controle (A) e após incubação com beta-lapachona ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) por 4 horas (B).

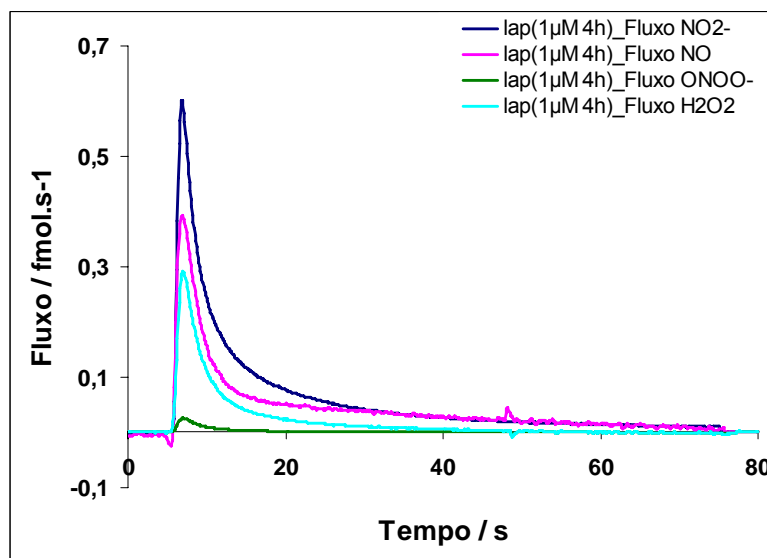
Como já relatado na introdução, utilizam-se as fórmulas relativas ao cálculo do fluxo das espécies, onde o fluxo ( $\Phi$ ) de emissão de cada espécie pode ser calculado a partir das respectivas intensidades de correntes obtidas, usando a equação de Faraday:

$$\Phi_{\text{espécie}} = I_{\text{espécies}} / (n_{\text{espécies}} \times F)$$

A partir desses dados, os fluxos obtidos são:



(A)

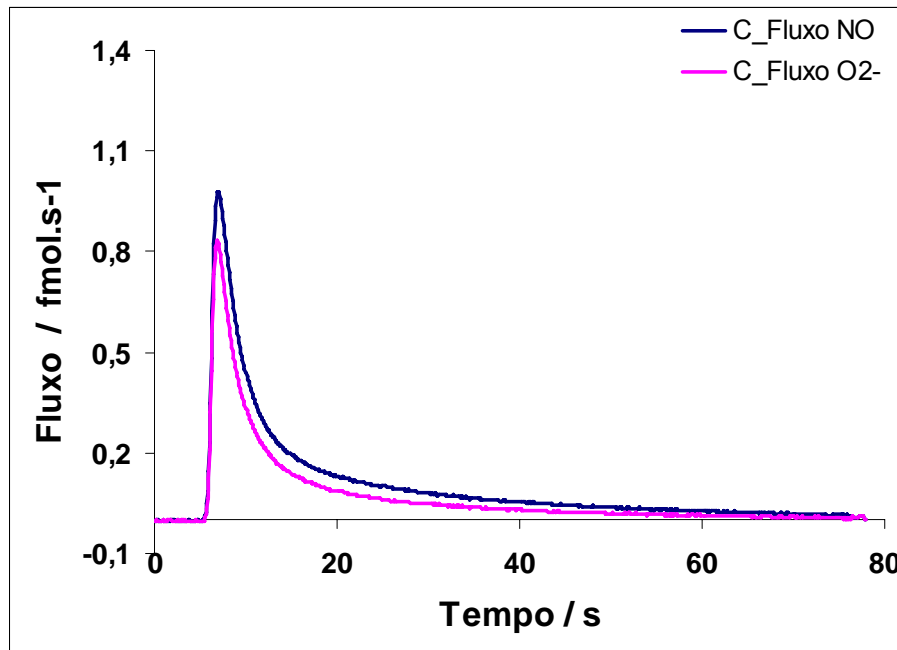


(B)

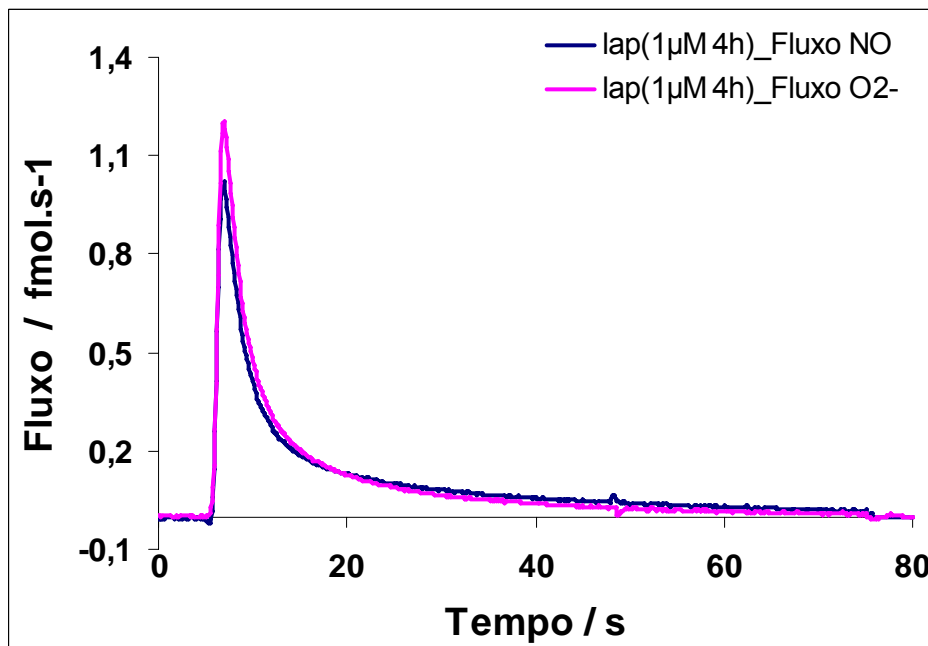
**Figura 42:** Variações temporais dos fluxos individuais para as diferentes espécies emitidas pelos macrófagos em controle (A) e após incubação, por 4 horas, com beta-lapachona ( $c = 1 \mu\text{M}$ ). Os fluxos foram determinados de acordo com a lei de Faraday por subtração de curvas para  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}^\bullet$  e da corrente em  $+450 \text{ mV}$  para  $\text{ONOO}^-$  com  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Os dados estequiométricos descritos acima permitem a reconstrução dos fluxos primários de  $\text{O}_2^\bullet$  e  $\text{NO}^\bullet$  (Figuras 43 A e B) baseado no fluxo das espécies individuais detectadas nos macrófagos de acordo com as equações abaixo (Amatore e cols., 2006):

$$\begin{aligned}(\Phi_{O_2^{\bullet-}})^{prod} &= 2(\Phi_{H_2O_2})^{med} + (\Phi_{ONOO^-})^{med} + (\Phi_{NO_2^-})^{med} \\ (\Phi_{NO^{\bullet}})^{prod} &= (\Phi_{NO^{\bullet}})^{med} + (\Phi_{ONOO^-})^{med} + (\Phi_{NO_2^-})^{med}\end{aligned}$$



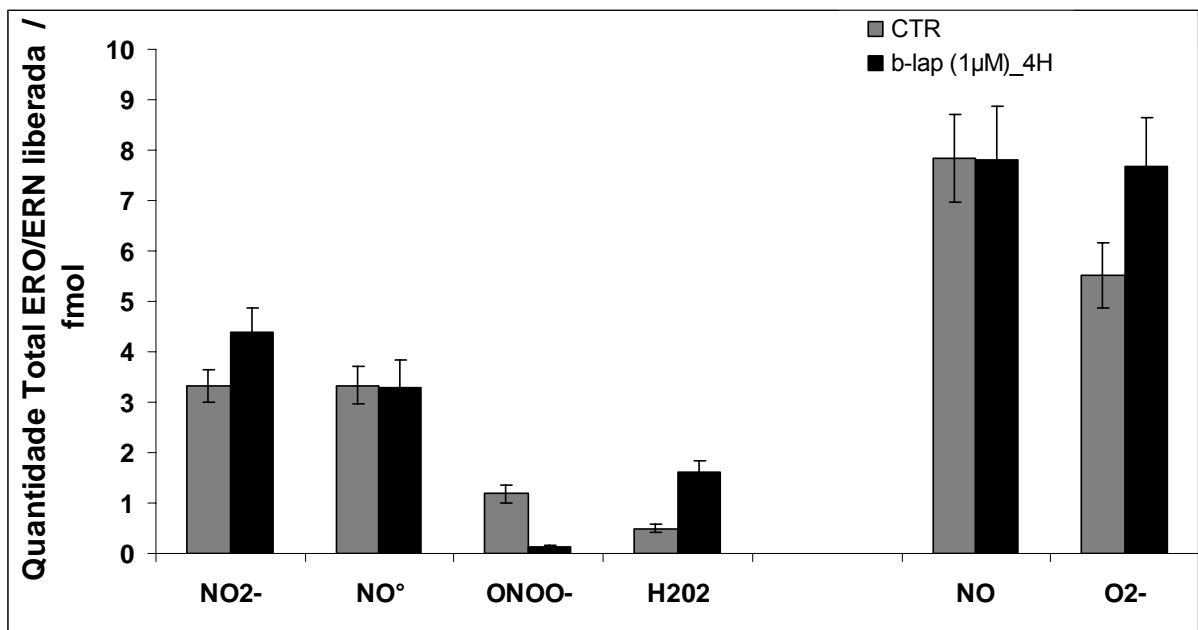
(A)



(B)

**Figura 43:** Fluxos das espécies primárias  $O_2^{\bullet-}$  e  $NO^{\bullet}$  que são responsáveis pelo coquetel final de espécies no surto oxidativo dos macrófagos. (A) controle e (B) incubação por 4 horas com beta-lapachona ( $c = 1 \mu M$ ).

A integração das curvas relativas ao fluxo das espécies reativas nas Figuras 42 e 43 A e B fornece a medida quantitativa das quantidades totais de  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}^\bullet$ ,  $\text{ONOO}^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e  $\text{O}_2^\bullet$  produzidos pelos macrófagos no surto oxidativo. A quantidade relativa a essas espécies está representada na Figura 44, que mostra que, em relação ao controle, houve aumento nas respostas do nitrito, peróxido de hidrogênio e na espécie primária, ânion radical superóxido. Ao contrário, houve diminuição acentuada do peroxinitrito. Porém, não houve variação no óxido de nitrogênio medido ou reconstituído. Ao representar as ERON em termos das espécies primárias (processo reconstutivo), nota-se uma significativa predominância, em termos de  $\text{O}_2^\bullet$  e similaridade em termos de NO.

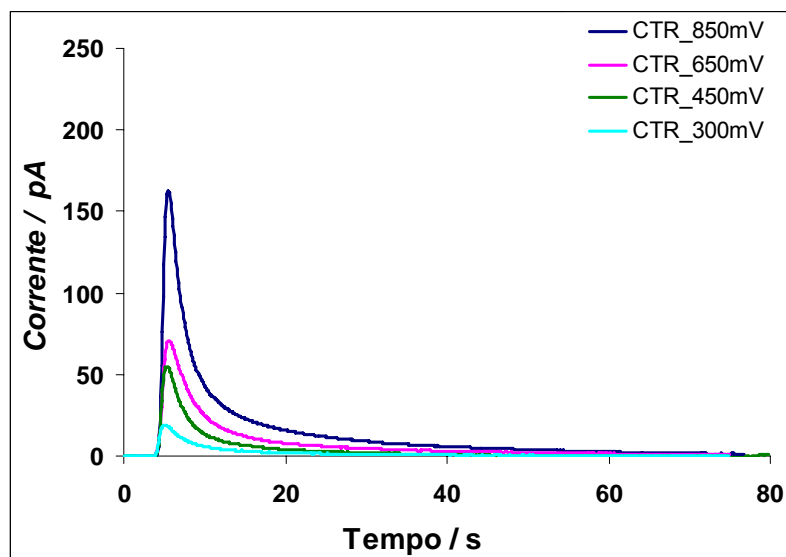


**Figura 44:** Quantidade total de ERON liberadas por macrófagos RAW 264.7 em situação controle e após incubação, durante 4 horas, com beta-lapachona ( $c = 1 \mu\text{M}$ ).

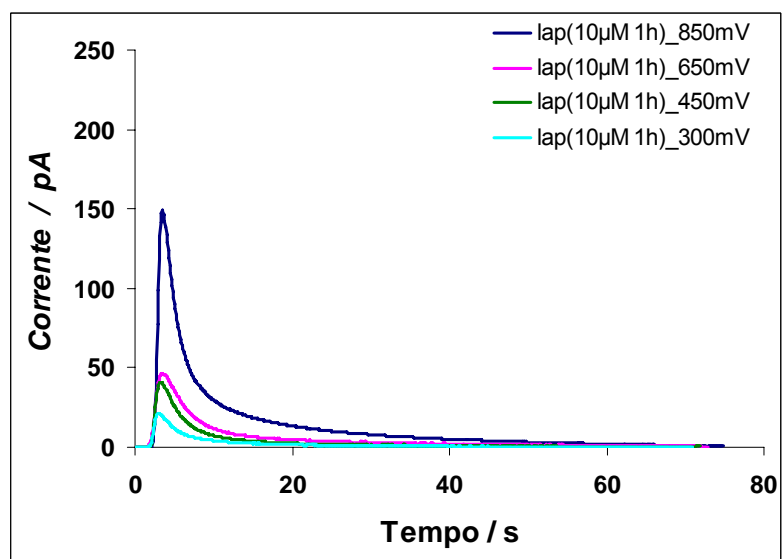
Estudo quantitativo semelhante em relação à liberação de ERON foi realizado em macrófagos, após incubação, por 1 hora, com beta-lapachona ( $c = 10 \mu\text{M}$ ). Neste caso, a beta-lapachona atenuou a liberação das espécies reativas totais nos estudos em potencial de +850 mV, ou seja, havia um indicativo de característica antioxidante.

A Figura 45A mostra o resultado da corrente média dos macrófagos controle em diferentes potenciais (850, 650, 450 e 300 mV) e a Figura 45B mostra o resultado do estudo com beta-lapachona ( $c = 10 \mu\text{M}$ ), após 1 hora de incubação. As

análises das espécies reativas individuais nos potenciais de 300, 450, 650 e 850 mV mostraram que nas células tratadas, todas as respostas de correntes foram inferiores em relação ao controle (CTR) para todos os potenciais estudados (Figura 45 A e B). Isto indica que houve mudança na liberação de ERON produzidas e liberadas pelos macrófagos.



(A)

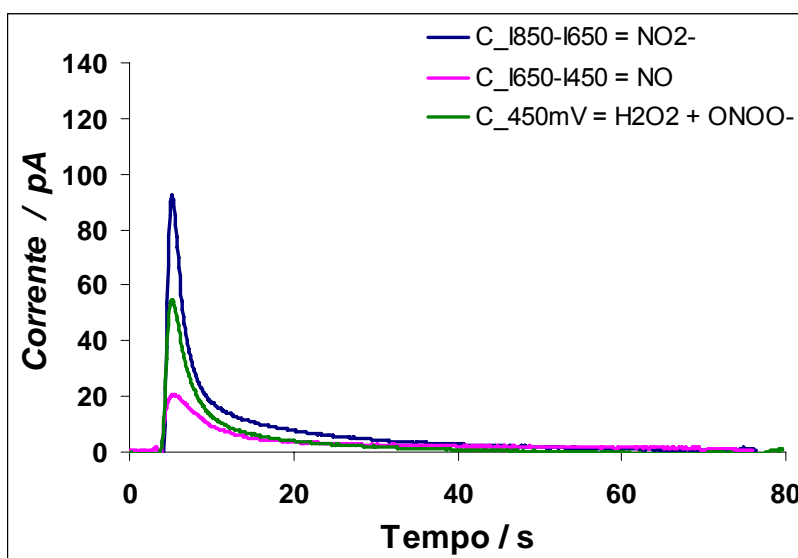


(B)

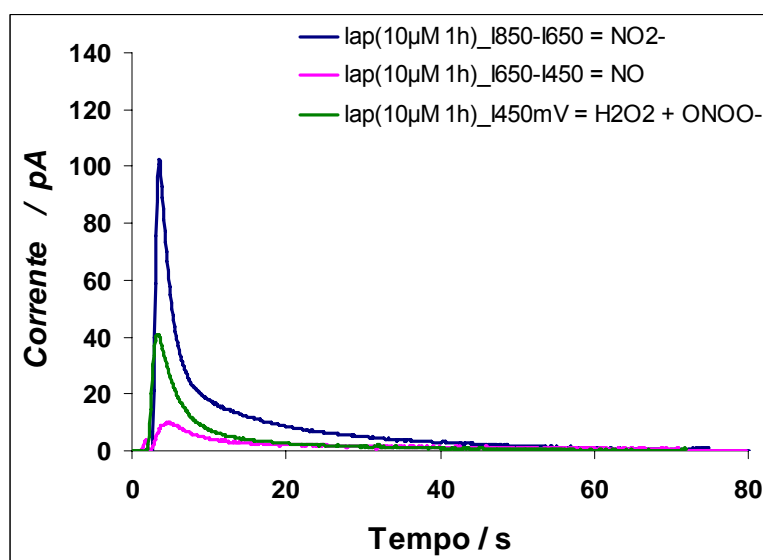
**Figura 45:** Picos amperométricos, em diferentes potenciais, relativos ao surto oxidativo dos macrófagos em condições controle (A) e após incubação com beta-lapachona ( $c = 10 \mu\text{M}$ ), por 1 hora (B). Eletrodo de trabalho: Microeletrodo de fibra de carbono platinizada e Eletrodo de referência: ECSS. Tampão fosfato PBS ( $\text{pH} = 7,4$ ).  $E = 850, 650, 450$  e  $300$  mV. Cada curva representa a leitura de, no mínimo, 20 células.

As Figuras 46A e B mostram as correntes médias residuais correspondentes aos picos, quando da subtração entre elas, nos potenciais entre 850 e 650 mV, entre 650 e 450 mV e a curva em 450 mV, relacionadas, respectivamente, às curvas de  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}^*$  e  $\text{ONOO}^-$  com  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Os gráficos abaixo relativos ao tratamento com a beta-lapachona mostram que a corrente correspondente ao nitrito é ligeiramente maior do que a do controle. Ao contrário, as curvas correspondentes às correntes da mistura de peroxinitrito e peróxido de hidrogênio e óxido de nitrogênio são menores do que aquela do controle.



(A)

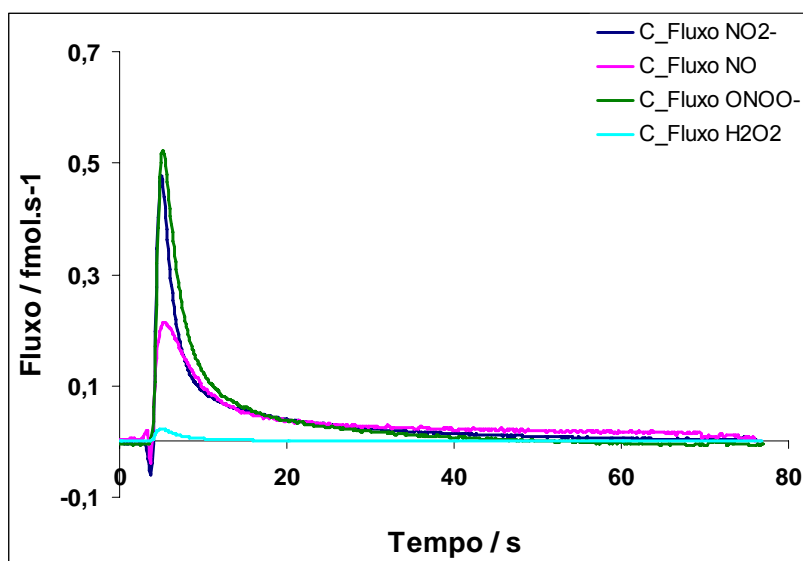


(B)

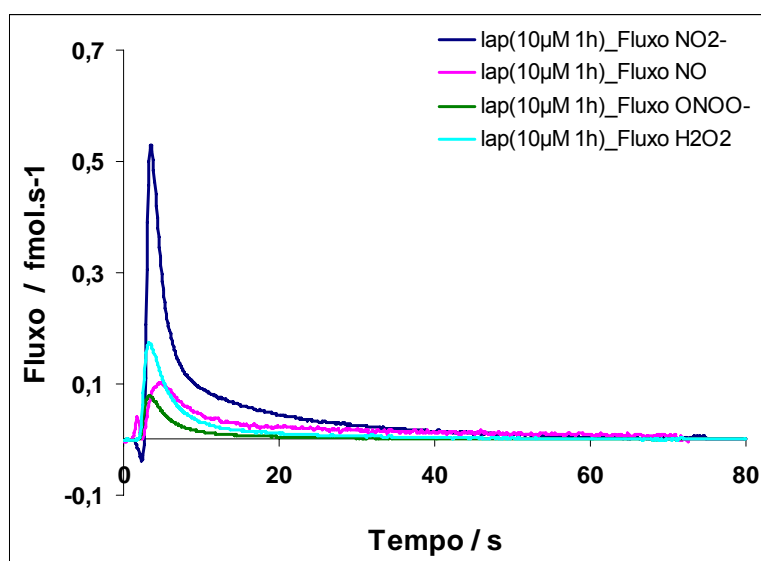
**Figura 46:** Resposta amperométrica em +450 mV versus ECSS e as curvas representativas da contribuição de  $\text{NO}_2^-$  ( $I^{850 \text{ mV}} - I^{650 \text{ mV}}$ ) e  $\text{NO}^*$  ( $I^{650 \text{ mV}} - I^{450 \text{ mV}}$ ) no

surto oxidativo detectado em macrófagos, em condições-controle (A) e após incubação com beta-lapachona ( $c = 10 \mu\text{M}$ ), durante 1 hora (B).

Utilizando-se as equações, já descritas anteriormente, relativas ao cálculo do fluxo das espécies, obtém-se os parâmetros das curvas de corrente nos diferentes potenciais estudados. Para o controle:  $a = 0,042$ ;  $b = 0,958$  e  $n_{e-}^t = 1,042$ ; e para  $c = 10 \mu\text{M}$  em  $t = 1$  hora:  $a = 0,688$ ;  $b = 0,312$  e  $n_{e-}^t = 1,688$ . Os gráficos relativos ao fluxo das espécies são, então, obtidos (Figuras 47 A e B).



(A)

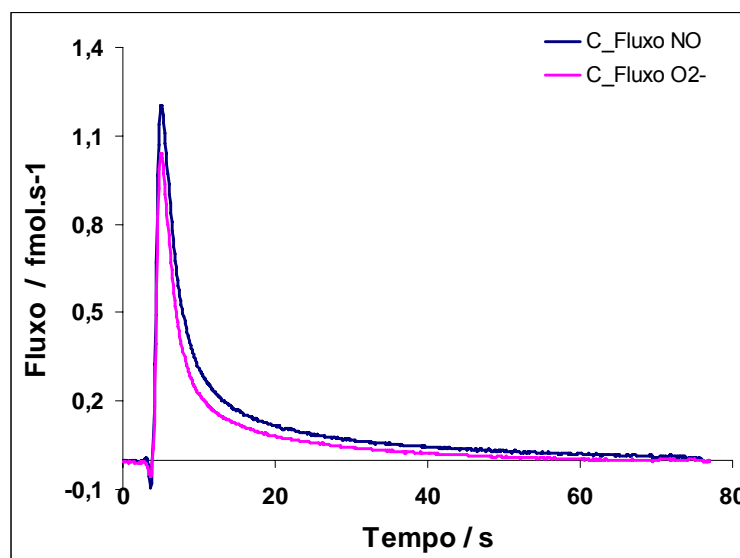


(B)

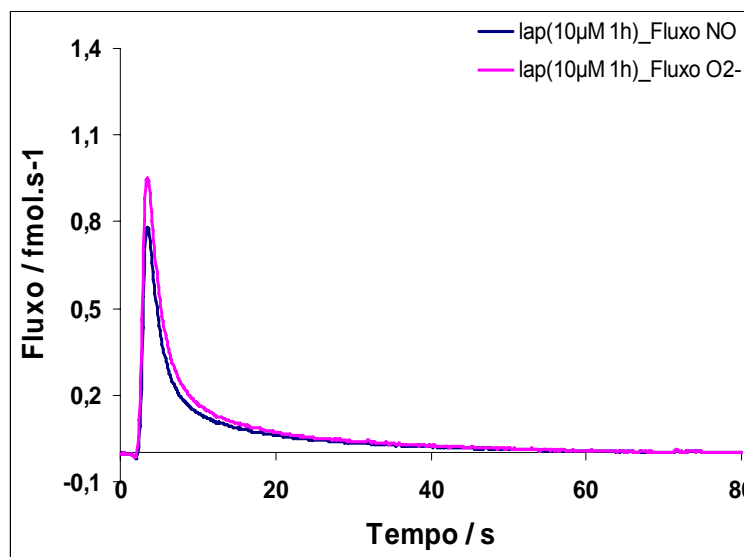
**Figura 47:** Variações temporais dos fluxos individuais para as diferentes espécies emitidas pelos macrófagos em controle (A) e com beta-lapachona ( $c = 10 \mu\text{M}$ ), após incubação por 1 hora (B). Os fluxos foram determinados de acordo com a lei de

Faraday das curvas subtraídas para  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}^\bullet$  e da corrente em +450 mV para  $\text{ONOO}^-$  com  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Com os dados das Figuras 47A e B, as curvas da reconstrução dos fluxos primários de  $\text{O}_2^\bullet$  e  $\text{NO}^\bullet$  são obtidas (Figuras 48 A e B).



(A)



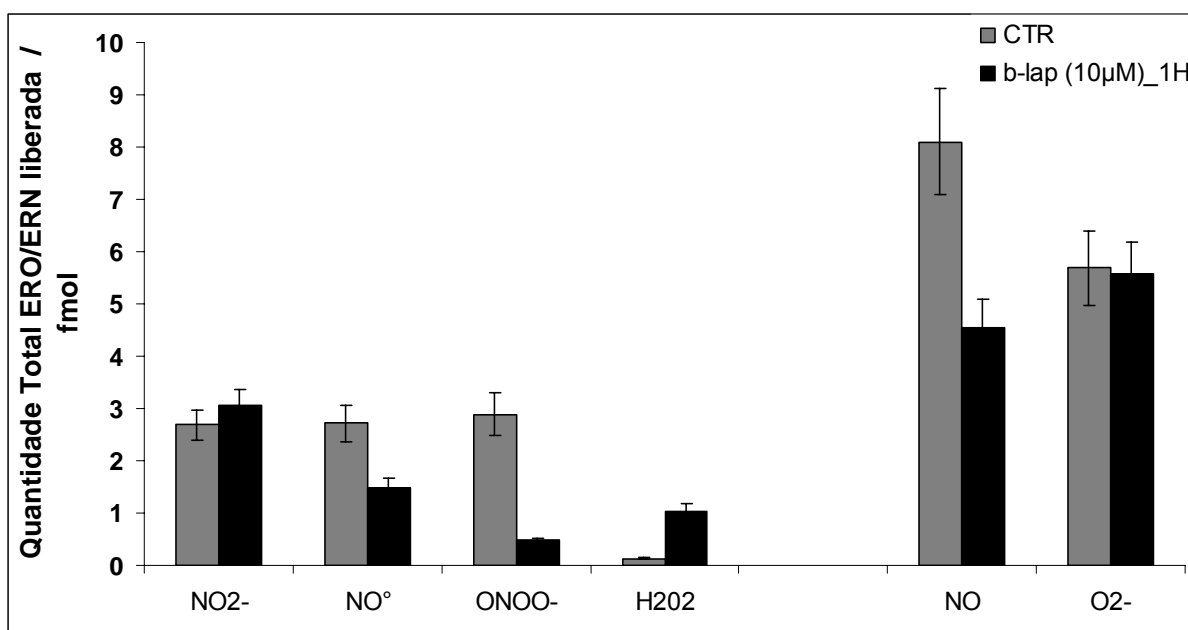
(B)

**Figura 48:** Fluxos das espécies primárias  $\text{O}_2^\bullet$  e  $\text{NO}^\bullet$ , responsáveis pelo coquetel final de espécies no surto oxidativo dos macrófagos. (A) controle e (B) após incubação com beta-lapachona ( $c = 10 \mu\text{M}$ ), por 1 hora.

A integração das curvas relativas ao fluxo das espécies reativas nas Figuras 47 e 48 A e B fornece as quantidades totais de  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}^\bullet$ ,  $\text{ONOO}^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e  $\text{O}_2^\bullet$



produzidas pelos macrófagos, no surto oxidativo. A quantidade relativa a essas espécies está representada na Figura 49, que mostra que, em relação ao controle, houve diminuição nas respostas do óxido de nitrogênio, do peroxinitrito e no óxido de nitrogênio primário. Ao contrário, houve aumento do peróxido de hidrogênio. Porém, não houve praticamente variação na quantidade do íon nitrito e do ânion radical superóxido. Ao representar as ERON em termos das espécies primárias, nota-se a equivalência em termos de  $O_2^{\bullet-}$  e um decréscimo significativo de  $NO^{\bullet}$ .



**Figura 49:** Quantidade total de ERON liberadas por macrófagos RAW 264.7 em situação controle e após incubação, durante 1 hora, com beta-lapachona ( $c = 10 \mu M$ ).

#### 4.1.4 Sumário de resultados

Os resultados das medidas amperométricas da liberação de ERO/ERN por RAW 264.7 foram apresentados em termos de correntes detectadas, no tratamento com a beta-lapachona, por um período de 4 horas com concentração de  $1 \mu M$  (Figuras 40A e B) e de 1 hora para o tratamento com  $10 \mu M$  (Figuras 45A e B). Em resumo, para o primeiro caso, em todos os potenciais, as medidas de corrente nos diferentes potenciais, que estão relacionadas diretamente à quantidade de espécies liberadas, como já citado anteriormente, foram maiores para as células tratadas do que para as células controle. Resultado contrário foi observado para o segundo tratamento, ou seja, houve a diminuição das respostas de corrente média em todos os potenciais, exceto aquele de  $+300 mV$  (Figuras 45A e B). Esses resultados são

evidências diretas que o tratamento com beta-lapachona influencia significativamente a liberação de espécies ERO/ERN nos macrófagos.

Os fluxos de emissão de cada espécie foram calculados como descrito na Introdução. As quantidades efetivas de cada espécie foram obtidas por meio de integração dos gráficos de fluxos pelo tempo de duração da medida (aproximadamente 80 segundos). As quantidades totais liberadas, em média, para 1  $\mu\text{M}$  em 4 horas, estão apresentadas na Figura 44 e para o tratamento com 10  $\mu\text{M}$  com 1 hora de incubação na Figura 49.

Observou-se, após estudo individual das espécies reativas nos potenciais com diferentes concentrações e tempos de incubação, que o fluxo de peróxido de hidrogênio esteve, sempre, significativamente maior do que nos respectivos controles. Similarmente, houve aumento na liberação do íon nitrito em ambos os tratamentos, porém, em menor proporção, para o tratamento com maior concentração da beta-lapachona. Sob as mesmas condições, nos dois casos, o peroxinitrito diminuiu. Já o ânion radical superóxido, aumentou apenas para o tratamento com 1  $\mu\text{M}$  (Figuras 44 e 49).

Em relação ao  $\text{NO}^\bullet$ , observamos que as respostas foram diferentes para os tratamentos escolhidos. Não houve diferença significativa da liberação de  $\text{NO}^\bullet$  pelos macrófagos com 1  $\mu\text{M}$ , após incubação de 4 horas. Já, na condição de 10  $\mu\text{M}$  e 1 hora de incubação, houve decréscimo, seja por inibição da produção de  $\text{NO}^\bullet$  ou por sua captura via reações rápidas, sem, no entanto, evidência de efeito citotóxico, nas células.

#### 4.1.5 Discussão dos resultados da alfa e beta-lapachona

Os experimentos com a beta-lapachona mostraram que essa quinona influenciou o processo de liberação de ERO e ERN nos macrófagos RAW 264.7. A manifestação oxidativa resulta da ativação de sistemas enzimáticos geradores de superóxido e/ou óxido nítrico e seus derivados. Em células sanguíneas mononucleares isto é normalmente conseguido por agentes bioquímicos atuando por meio de mecanismos indutores ou na junção de enzimas, como a nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidase (NADPH oxidase) e as NO sintases constitutivas, geradoras de ânion radical superóxido e óxido de nitrogênio, para formar um estado ativo (Verchier e cols., 2007).

Os efeitos apresentados foram dependentes da concentração e também do tempo do tratamento, no caso, a incubação das células na presença da quinona. As análises amperométricas ( $E = +850$  mV, onde a resposta da corrente é relativa a todas as espécies reativas estudadas,  $I_{850mV} = I_{H_2O_2} + I_{ONOO^-} + I_{NO} + I_{NO_2^-}$  [Amatore e cols., 2006]) realizadas, em período de tempo, 1 hora, com beta-lapachona nas concentrações de 0,1 a 100  $\mu$ M, evidenciaram que a mesma provoca diminuição da liberação de ERON pelos macrófagos (Figura 33, pág. 64). Resultados semelhantes foram obtidos após 24 horas de incubação para tratamentos com beta-lapachona ( $c = 0,1$  e 1  $\mu$ M) (Figura 35 e 36). Sob as condições de 1  $\mu$ M, mas com incubação de 4 e 6 horas, houve aumento acentuado da liberação dessas espécies reativas (Figura 35, pág. 66), portanto, com comportamento pró-oxidante. Contudo, não se observou qualquer alteração na membrana celular ou desprendimento das células da placa de Petri.

Como um primeiro resultado, em resposta à questão inicial sobre a real natureza das quinonas, se pró- ou antioxidante (pág. 60), fica claro, que o processo é dependente da concentração e do tempo de incubação. Há variação do comportamento, daí, não há uma resposta precisa para a questão. Como se verá a seguir (tópico 4.3), a ação de substâncias biologicamente ativas depende da natureza das células. O mecanismo de defesa celular varia de acordo com sua característica e patogenicidade. Por exemplo, células cerebrais saudáveis possuem alta concentração de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (Schulz e cols., 2000). Apesar da dissimilaridade entre as células, é possível traçar um paralelo entre elas.

Pardee e colaboradores (2002) mostraram que a beta-lapachona foi aplicada a variadas culturas de células, a grande maioria, cancerígenas. As concentrações letais variaram de 1 a 30  $\mu\text{M}$  para diferentes células (Tabela 1, págs 38-42). A diferença na quantidade de NQO1 (pág 44 e 45) parece ser o fator principal na ação da substância, assim como a glutathiona e todo o maquinário anti-oxidante. Reinicke e colaboradores (2005) perceberam que alta concentração de NQO1 é o fator intracelular determinante da citotoxicidade da beta-lapachona nas células estudadas por seu grupo.

Análise da literatura permitiu associar esses resultados a uma série de fatos, embora com restrições, uma vez que as células usadas foram diferentes, com conseqüências importantes relacionadas a um diferente maquinário enzimático. Em experimentos de eletroforese, com linfócitos normais, foi observado que a beta-lapachona ( $c \leq 4 \mu\text{M}$ ), após incubação por intervalo de tempo de 8 horas, não provocou fragmentação de DNA ou apresentou características de apoptose (Chau e *cols.*, 1998). Entretanto, nesse mesmo estudo, em células leucêmicas HL-60, submetidas à ação de beta-lapachona, após incubação de 1  $\mu\text{M}$ , durante 4 horas, foram observadas mudanças morfológicas apoptóticas, como condensação nuclear e formação de corpo apoptótico.

Em relação a apoptose, Wuerzberger e colaboradores (1998) observam por meio da fluorescência do DNA e condensação nuclear, usando citômetro de fluxo, a morte exclusiva por apoptose de células de câncer de mama, causada por beta-lapachona na concentração de 5  $\mu\text{M}$  após 24 h de tratamento. Adicionalmente, Shiah e colaboradores (1999) apresentam a primeira evidência de que a beta-lapachona,  $c = 1 \mu\text{M}$ , induz apoptose em células leucêmicas humanas por meio da ativação da quinase c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal (JNK), que é responsável por uma variedade de stress. A ativação de JNK demonstra que a beta-lapachona induz um programa de apoptose dependente de ERO.

Assim como os nossos resultados, Liu e colaboradores (1999) mostram que os estudos em macrófagos alveolares de ratos tratados com beta-lapachona nas concentrações de 1 e 3  $\mu\text{M}$ , com  $t = 4$  horas, não induziu efeito na concentração de NO<sup>•</sup>. Liu e colaboradores (1999) observaram também que não houve indução na expressão de iNOS. Seus resultados foram obtidos por medidas indiretas, método colorimétrico, no qual assumiu-se que toda a produção de nitrito é derivada da oxidação de NO<sup>•</sup>.

Por meio de análise direta e em tempo real, via eletroquímica com microeletrodo, nossos resultados mostram que a beta-lapachona, em  $c = 10 \mu\text{M}$ , em tempo de 1 hora, inibiu a liberação de  $\text{NO}^*$  pelos macrófagos, apesar dos macrófagos RAW 264,7 utilizados em nossos experimentos não terem sido submetidos a qualquer estimulação bioquímica, com, por exemplo, à ação do lipopolissacarídeo (LPS). Entretanto, por meio de medidas indiretas, com o reagente de Griess, Liu e colaboradores (1999) observaram que a beta-lapachona inibiu a liberação de  $\text{NO}^*$ , apenas quando os macrófagos foram estimulados por lipopolissacarídeos (LPS). O efeito foi dose e tempo dependente e os resultados observados aconteceram somente quando os reagentes (LPS + beta-lapachona) foram co-incubados. Como já dito anteriormente, o método de Griess é indireto e dependente do tempo.

O LPS é liberado durante a infecção bacteriana e é um potente ativador de monócitos e macrófagos; induz a síntese da óxido nítrico sintase induzida (iNOS), que é responsável pela produção de  $\text{NO}^*$ , aciona a produção de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, como o fator- $\alpha$  de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), com aumento significativo da quantidade de  $\text{NO}^*$ , que tem um papel importante na resposta inflamatória e imune (Mackman, 2000).

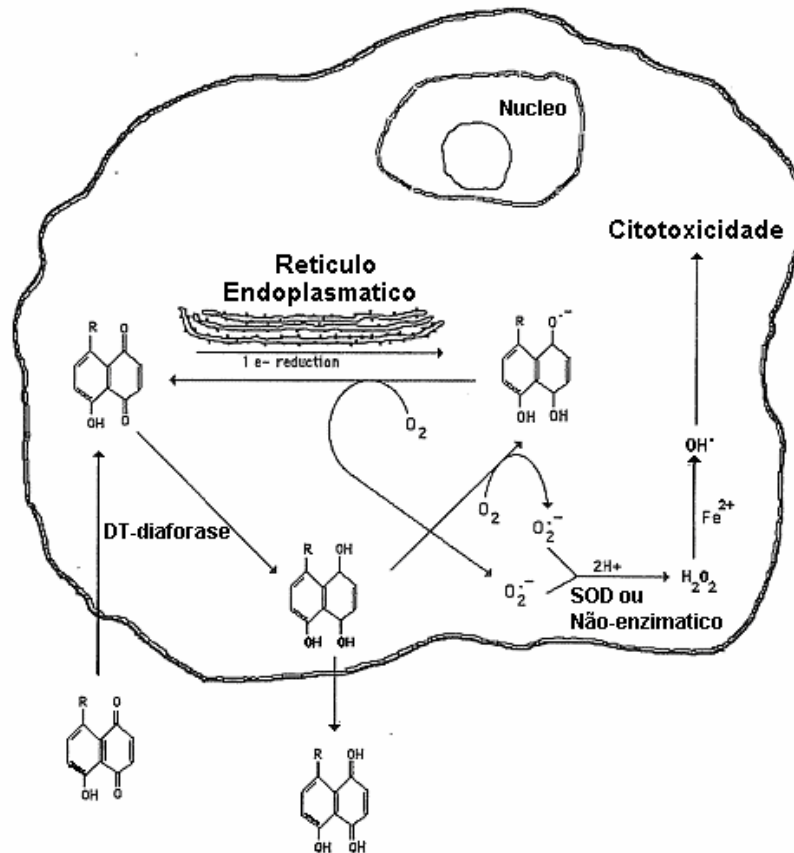
Moon e *co/s.* (2007) observaram que, mesmo em concentração de  $1 \mu\text{M}$ , com tratamento de 1 hora, a beta-lapachona foi capaz de diminuir de maneira significativa em células estimuladas por LPS, os níveis da produção de NO em Microglia. Estas células fazem parte de uma população de células do cérebro responsáveis pelo sistema imune inato que se acredita, exerçam o papel principal na defesa e na reparação de tecido do sistema nervoso central. O efeito inibidor também foi dose dependente.

O óxido nítrico ( $\text{NO}^*$ ), como já dito anteriormente, é reconhecido como um mensageiro do sistema cardiovascular, muscular e regulador do sistema imune (James, 1995). Assim, a inibição de  $\text{NO}^*$  pela beta-lapachona indica que essa o-quinona pode possuir potencial atividade anti-inflamatória. Contudo, estudos futuros são necessários, sob as mesmas condições desse trabalho, com análises diretas de  $\text{NO}^*$ , para determinar o mecanismo pelo qual a beta-lapachona inibe ou ativa a produção do  $\text{NO}^*$  em macrófagos da linha RAW 264.7 pré-estimulados, por exemplo, com LPS.

Em relação ao peroxinitrito, um potente agente oxidante e nitrante (Amatore e *cols.*, 2008), os resultados com a beta-lapachona, nas duas condições estudadas mostram que houve inibição acentuada da formação e liberação do mesmo (Figuras 44 e 49, págs. 78 e 83), seja pelo consumo da espécie formada ou mesmo pelo consumo e/ou inibição das espécies geradoras ( $\text{NO}^\bullet$  e  $\text{O}_2^\bullet$ ) do peroxinitrito. Esses resultados sugerem também que a beta-lapachona atua como um agente antioxidante.

Como já relatado e mostrado nas Figuras 33 e 35, os resultados observados no potencial de 850 mV, para a beta-lapachona, mostram tendências opostas quanto à liberação total de ERO e ERN, ou seja, há a indicação de caráter anti e pró-oxidante, a depender do tempo de incubação e da concentração, o que explicaria resultados controversos na literatura. Não há na literatura, relatos sobre o estudo da detecção e quantificação de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), por meio de amperometria, com utilização de microeletrodo, em macrófagos tratados com a beta-lapachona. Assim, quando as análises foram feitas em potenciais específicos para detectar o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (nos potenciais de 300 e 450 mV), observou-se o aumento sistemático dessa espécie (Figuras 44 e 49). Esse fato sugere que a beta-lapachona pode ser enzimaticamente reduzida por transferência de um elétron, ou de dois elétrons, resultando na formação da semiquinona ou da hidroquinona, respectivamente. Essa semiquinona ou a hidroquinona reagiriam, por transferência de elétrons com o oxigênio molecular formando  $\text{O}_2^\bullet$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Havendo um mecanismo eficiente para a reconversão da quinona à semiquinona, em presença de oxigênio, ocorre um ciclo redox. O resultado deste ciclo redox é o desbalanço redox (Foppoli e *cols.*, 2005; Liu e *cols.*, 1999; Chau e *cols.*, 1998; Don e *cols.*, 2001; Monks e *cols.*, 1992; Docampo e *cols.*, 1979), com conseqüências deletérias às células (Figura 50).

## Efeitos de Quinonas em Células



**Figura 50:** Possível mecanismo do efeito citotóxico de quinonas em células (Segura-Aguilar e cols., 1992).

A formação intracelular de ânion radical superóxido e peróxido de hidrogênio, pode ser considerada como a causa da toxicidade da beta-lapachona contra células tumorais (Williams e cols., 2001; Shiah e cols., 1999; Liu e cols., 1999; Docampo e cols., 1979). Além disso, as células tumorais têm baixa atividade de superóxido dismutase, comparada com as células de tecidos normais. A quantidade desta enzima pode ser insuficiente, para destoxificar altas concentrações de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, já que o ânion radical superóxido é convertido espontaneamente no peróxido de hidrogênio. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode ser realmente mais importante em termos da toxicidade do tumor, especialmente em tumores com baixa expressão da catalase (Thorpe e cols., 2004; Valko e cols., 2004).

Estudos com outras linhagens de célula e utilizando outro método de detecção do peróxido de hidrogênio, como a microscopia de fluorescência que usa o reagente DCFH, mostram que, a beta-lapachona, em células leucêmicas, provocou o aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Liu e cols., 1999). Docampo e colaboradores (1979)

evidenciaram que a beta-lapachona causou o aumento na geração de peróxido de hidrogênio, ânion radical superóxido e na peroxidação lipídica, em células tumorais de sarcoma 180. Assim também, Boveris e colaboradores (1978) observaram mudanças estruturais em mitocôndrias isoladas e produção de grandes quantidades de peróxido de hidrogênio.

Em relação aos resultados com a alfa-lapachona, foi obtido que a substância não foi hábil para produzir a liberação significativa das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio totais nos macrófagos,  $E = 850$  mV, em contraste com os efeitos obtidos pela beta-lapachona. Esses resultados concordam com a observação da falta de efeito da alfa-lapachona na estimulação de  $O_2^{\bullet}$  e  $H_2O_2$  em *Trypanosoma cruzi* (Boveris e cols., 1978; Boveris e Docampo, 1978).

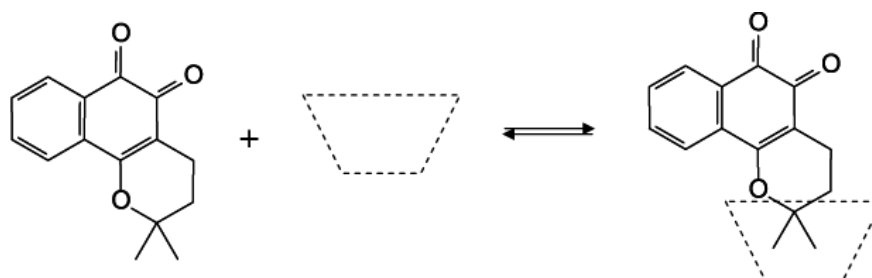
Uma hipótese para a diferença de reatividade entre as duas quinonas isoméricas, a *orto*-quinona fortemente ativa e a *para*-quinona, praticamente inativa em termos de geração de ERON, seria a possível complexação com o cálcio intracelular, que necessariamente, induziria modificações nas enzimas dependentes de cálcio, como a NO sintase constitutiva e a NADPH oxidase. Foi observado por Tagliarino e cols., (2001) que a beta-lapachona causou morte, por apoptose, em células humanas de câncer de mama (MCF-7), que expressam NQO1. Os dados obtidos nesse último trabalho sugerem que o aumento do nível de  $Ca^{+2}$  intracelular mostrou ser dependente da bioativação da beta-lapachona por NQO1, que foi responsável pelo processo apoptótico ocorrido nessas células.

Estudos, para observar o efeito do íon cálcio em relação a alfa e beta-lapachonas se encontram em realização, na tentativa de confirmar diferentes hipóteses.



## 4.2 Formação de complexo de inclusão da beta-lapachona e beta-ciclodextrina

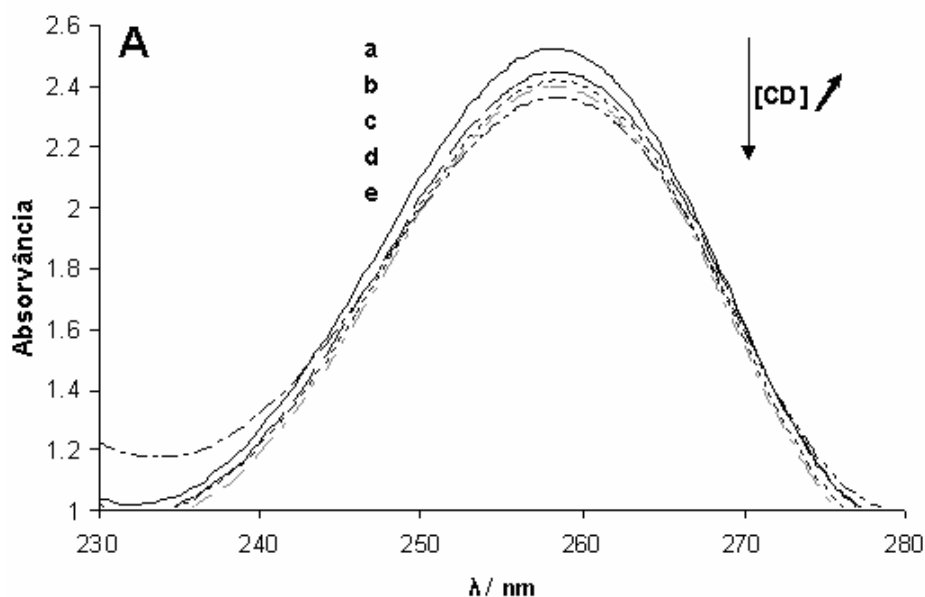
A despeito da potência e seletividade da beta-lapachona nas inúmeras atividades biológicas e, principalmente, na sua ação sobre células cancerosas, sua baixa solubilidade em água limita sua administração sistemática em aplicações clínicas (Nasongkla e cols., 2003). Para contornar esse problema, recentes estudos analisaram os complexos de inclusão entre a beta-lapachona e ciclodextrinas em solução aquosa, utilizando estudos de solubilidade de fase, fluorescência e espectroscopia de  $^1\text{H}$  NMR. A descrição do complexo de inclusão da beta-lapachona (b-lap) com a beta-ciclodextrina para sistemas de distribuição de droga é descrito em patentes e artigos (Boothman e cols., 2004; Jiang e cols., 2003; Nasongkla e cols., 2003). Assim, vislumbrando a aplicação de complexos de inclusão da beta-lapachona e a beta-ciclodextrina em células RAW 264.7 e a investigação de seu efeito nessas células e outras, foi investigado a formação do complexo de inclusão entre a beta-lapachona e a beta-ciclodextrina (Figura 51), para obtenção de dados sobre o aumento da solubilidade da quinona em solução aquosa, na presença de beta-ciclodextrina (beta-CD) e, o efeito competitivo da concentração do etanol na formação do complexo.



**Figura 51:** Esquema representativo da inclusão da beta-lapachona em solução aquosa contendo beta-ciclodextrina (beta-CD) (Nasongkla e cols., 2003).

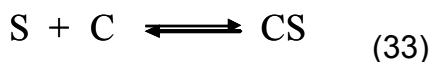
O fenômeno de inclusão da beta-lapachona com a cavidade da beta-ciclodextrina foi investigado por espectroscopia no UV/Vis.

A Figura 52 mostra o espectro de absorção (230 e 280 nm) obtido na presença de pequenas quantidades de etanol (5%), ilustrando o comportamento do substrato com o aumento da concentração da beta-ciclodextrina.



**Figura 52: A)** Espectros de absorção para a beta-lapachona (1 mM), em ausência e presença de beta-ciclodextrina (CD), em tampão fosfato (PBS, pH = 7,4) + EtOH (5%); caminho óptico ( $l$ ) = 1 cm; [CD] = 0 (a), 10 (b), 20 (c), 30 (d), and 50 mM (e).

A diminuição da absorção em 258 nm com o aumento da concentração da beta-ciclodextrina indica a efetividade da inclusão com o substrato com a cavidade do agente de inclusão, de acordo com a equação (Eq. 33):



S = beta-lapachona; C = beta-ciclodextrina; CS = complexo de inclusão

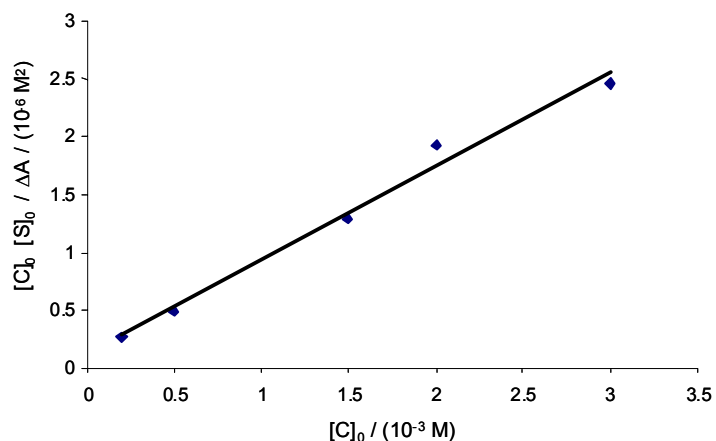
A estabilidade do complexo pode ser descrita em termos de suas constantes de formação ( $K_f$ ) ou dissociação ( $K_d$ ) (Eq. 34):

$$K_F = [CS] / [S] [C] \quad (34)$$

Se  $[C]_0$  e  $[S]_0$  são as concentrações iniciais de beta-ciclodextrina e do substrato, respectivamente, a constante de dissociação do complexo pode ser calculada de acordo com o método de Benesi-Hildebrand (Hernandez-Benito e cols., 1999) (Eq. 35):

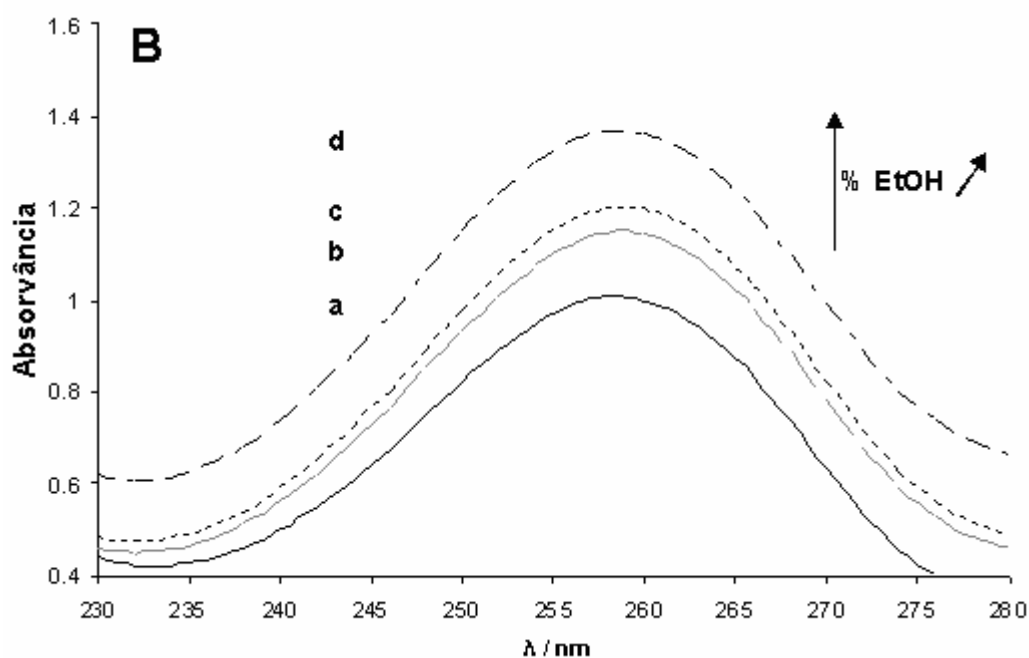
$$\frac{[C]_0 [S]_0}{\Delta A} = \frac{K_D}{\Delta \epsilon} + \frac{[C]_0}{\Delta \epsilon} \quad (35)$$

Onde, os valores de  $[C]_0 [S]_0 / \Delta A$  contra a concentração da beta-ciclodextrina  $[C]_0$  obtêm-se o gráfico (Figura 53), e é possível calcular o valor da constante de formação,  $K_f = 15 \pm 5 \text{ M}^{-1}$ , na presença de 5% de etanol. Esse resultado é 5 vezes menor do que o obtido em PBS, na ausência de etanol (Nasongkla e cols., 2003).



**Figura 53.** Gráfico para a determinação da constante de equilíbrio do complexo da beta-lapachona - beta-ciclodextrina de acordo com a equação de Benesi-Hildebrand à 258 nm (PBS + 5 % EtOH), a partir de dados na Figura 52.

Para ilustrar o papel do etanol na dissociação do complexo, o espectro de absorção da beta-lapachona foi estudado na presença de 10 equivalentes de CD em várias misturas de tampão e EtOH (Figura 54). O espectro do substrato pode ser facilmente obtido na ausência de etanol, já que, a beta-lapachona é totalmente solúvel num excesso de beta-ciclodextrina. O espectro mostra que o aumento da presença de quantidades de etanol leva ao aumento da absorbância à 258 nm, em concordância com a dissociação do complexo.



**Figura 54:** Espectro de absorção da beta-lapachona (0,046 mM) na presença de beta-ciclodextrina (0,46 mM) em várias misturas de PBS (pH = 7,4) + EtOH; EtOH = 0 (a), 5 (b), 10 (c), e 100% (d). Caminho óptico ( $l$ ) = 1 cm.

O aumento da absorvância indica que o equilíbrio entre a beta-lapachona livre e complexada é fortemente deslocado pela presença de 5% de etanol e explica a fraca constante de formação. A diferença na absorvância obtida na ausência e presença de etanol é duas vezes maior do que a absorvância obtida na ausência e presença de 10 vezes de beta-ciclodextrina em PBS + etanol (5 %) (Figuras 52 vs. 54). Assim, nestas condições, 40 equivalentes de beta-ciclodextrina são requeridas para obter a mesma diferença na absorvância. Este efeito indica que o substrato livre e complexado é deslocado no sentido da dissociação, na presença de 5 % de etanol e explica a fraca constante de associação termodinâmica, encontrada sob as condições em que o etanol está presente.

As investigações do complexo formado com as células macrofágicas não foram ainda realizadas. Essa etapa posterior poderá ser realizada em análises futuras.

### 4.3 Ácido Ascórbico (AA)

O fato dos efeitos benéficos bem estabelecidos ou amplamente divulgados do ácido ascórbico, em relação ao seu poder antioxidante, ter sido questionado em várias pesquisas (Rice, 2000; Rose e Bode, 1993; Otero e cols., 1997; Bode e cols., 1993; Griffiths e Lunec, 2001; Rivière e cols., 2006) e considerando que a investigação numa célula única com microeletrodo de fibra de carbono platinizada apresenta vantagens em relação ao monitoramento e à caracterização da resposta oxidativa celular, foram realizados estudos para examinar o efeito do ácido ascórbico *ex vivo*, em relação à natureza e intensidade da resposta do estresse oxidativo em duas linhagens de células: os macrófagos (RAW 264.7) e as células mielóides, PLB-985, pré-tratadas com PMA.

As investigações preliminares com o AA executadas independentemente com as células de macrófagos (RAW 264.7) e mielóides PLB-985 pré-tratadas com PMA mostraram que a incubação com concentrações  $\leq 1$  mM não apresentou efeitos detectáveis. As respostas em relação ao surto oxidativo, representadas pelos picos amperométricos, não foram significativas em relação ao controle, além de poderem ser confundidas pela variabilidade celular (Arbault e cols., 1995). Os efeitos do AA só puderam ser monitorados quando cada linhagem celular foi tratada com concentrações na ordem milimolar.

No primeiro momento, essas concentrações podem parecer excessivas comparadas às faixas usuais para a atividade da maioria dos agentes farmacológicos, na ordem de nano a micromolar. Entretanto, é preciso lembrar que em células vivas, os antioxidantes são espontaneamente concentrados para estarem presentes em altas concentrações, como é evidenciado pelo exemplo da concentração próxima à molar do AA mantida em permanência nas células do cérebro (Rice, 2000). Como será visto mais tarde, uma fração significativa de AA, inicialmente introduzida na preparação de soluções, reage espontaneamente com o oxigênio (0,23 mM em água saturada com ar). Assim, sob condições aeróbias *ex vivo*, as concentrações de AA abaixo de 1 mM rapidamente diminuem devido à reação com o oxigênio.

#### 4.3.1 Ácido ascórbico e seu efeito no fenômeno do estresse oxidativo

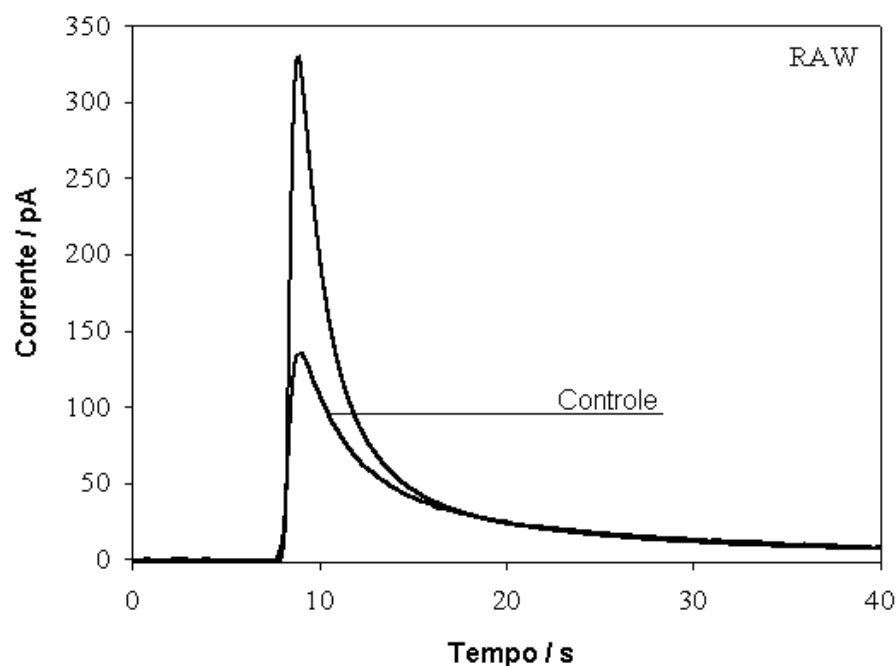
Os efeitos da solução 1 mM de AA em cada tipo de célula são mostrados nas Figuras 55 e 56. As células utilizadas foram:

- PLB-985 – são células mielóides capazes de se diferenciar em granulócitos (como neutrófilos) ou monócitos (como macrófagos), na presença de agentes indutores. PMA provoca sua maturação em granulócitos (Tucker e cols., 1987), induzindo a estimulação de um grupo de enzimas prontas a gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) (NO sintase e NAD(P)H oxidase);
- macrófagos (RAW 264.7).

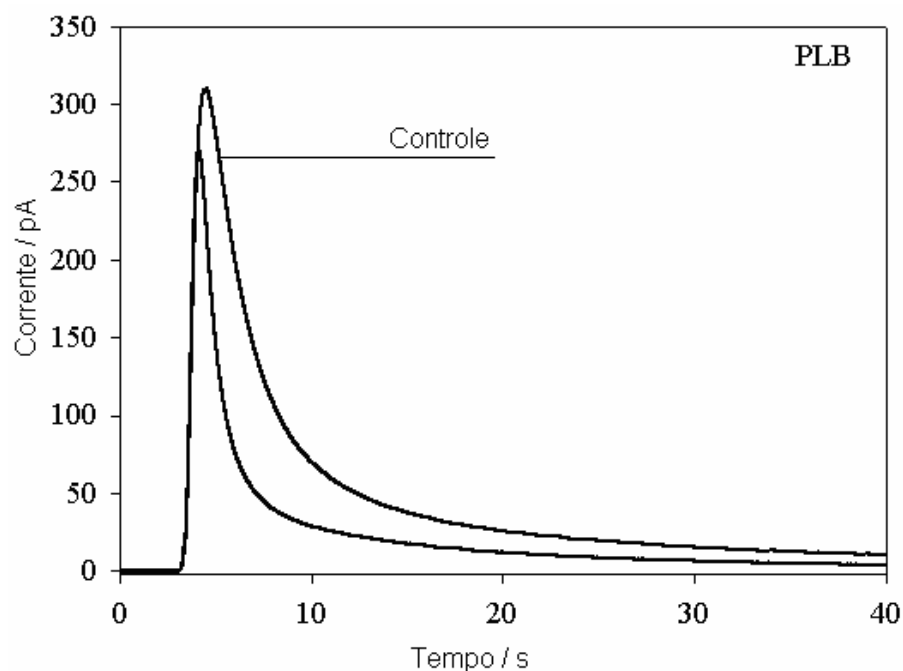
Nas Figuras 55 e 56 são comparadas, respectivamente, as respostas da média do surto oxidativo total dos macrófagos e das células mielóides com seus respectivos controles, com a média das respostas obtidas após as células serem tratadas com 1 mM de AA durante 1 hora a 37 °C. Em todos os experimentos, as células foram lavadas após sua incubação e, então, investigadas, em PBS, sem a presença de AA na solução de leitura.

Na Figura 55, são comparados os picos amperométricos obtidos com microeletrodo em potencial aplicado de +850 mV vs. ESC, em resposta ao AA, adicionado à cultura de macrófagos. Nesse potencial, como já citado anteriormente, ocorre a detecção simultânea das espécies  $O_2^{\bullet}$ ,  $ONOO^-$ ,  $NO^{\bullet}$ ,  $NO_2^-$  e  $H_2O_2$  (Figura 12). A magnitude relativa das respostas mostra um importante aumento na produção de ERO e ERN na presença de AA. Isto demonstra que, em tempo curto, o AA provoca um aumento na geração de ERO e/ou ERN em macrófagos, efeito denominado pró-oxidante, por razão de brevidade e para efeitos comparativos.

A Figura 56 mostra, contrariamente à figura 55, que, quando as células PLB-985 pré-tratadas com PMA foram tratadas com 1 mM de AA, durante 1 hora, a resposta amperométrica total diminuiu consideravelmente, mostrando que nesse caso, nessa linhagem celular, o AA atua na diminuição da liberação de ERON, ou seja, como um agente antioxidante. Além do mais, é notado que o sinal obtido na presença de AA diminui muito mais rapidamente ao nível base do que o controle, o que ilustra que não são somente as quantidade de ERO e ERN que diminuem.



**Figura 55:** Corrente amperométrica média do surto oxidativo de macrófagos (RAW 264.7), em condição controle e, após incubação com AA ( $c = 1 \text{ mM}$ ), durante 1 hora. Microeletrodo de fibra de carbono platinizada como eletrodo de trabalho e ECSS como referência. Tampão fosfato, PBS, ( $\text{pH} = 7,4$ ).  $E = 850 \text{ mV}$ .

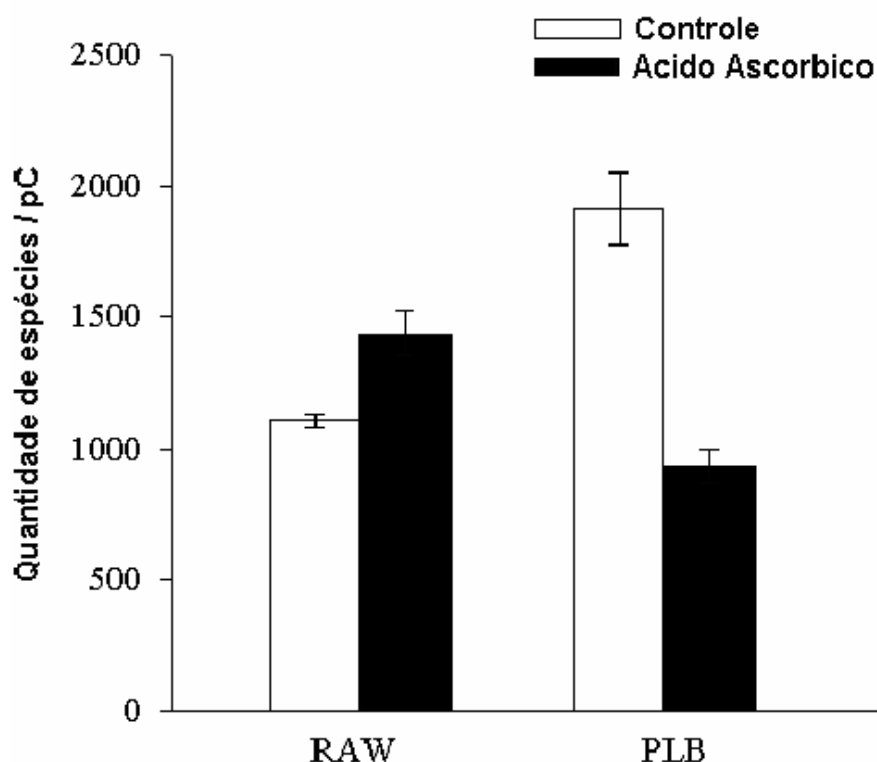


**Figura 56:** Corrente amperométrica média do surto oxidativo das células mielóides PLB-985, pré-tratadas com PMA, em condição controle e, após incubação com AA ( $c=1 \text{ mM}$ ), durante 1 hora. Microeletrodo de fibra de carbono platinizada como eletrodo de trabalho e ECSS como referência. Tampão fosfato, PBS, ( $\text{pH} = 7,4$ ).  $E = 850 \text{ mV}$ .

O resultado obtido acima estabelece que, em contradição com sua atividade antioxidante geralmente aceita, o AA provoca aumento do surto oxidativo em macrófagos RAW 264.7.

A Figura 57 mostra a quantidade total de espécies oxigenadas e nitrogenadas reativas geradas por cada tipo de célula, obtida pela integração da resposta corrente vs tempo. Como já relatado anteriormente, a carga (Q) calculada corresponde à eletrólise da quantidade total das espécies liberadas (Figura 57), segundo a lei de Faraday, que equipara a quantidade relativa de ERO e ERN liberadas pela população celular sob cada condição (Bard and Faulkner, 2001).

Para os macrófagos, a quantidade total de ERO e ERN liberada por cada população celular, durante o estresse oxidativo, aumentou cerca de 23 %, indicando que o AA atua na produção das espécies reativas nessas células, sob as condições do experimento. De maneira contrária, nas células mielóides pré-tratadas com PMA, a quantidade liberada de ERONs diminuiu cerca de 52% (Figura 57). Isso mostra que o AA atua como consumidor de espécies reativas nessas células. Os dados nas Figuras 55 e 56 estabelecem que o efeito completo do AA não é homogêneo e depende do tipo da célula estudada.



**Figura 57:** Comparação entre as quantidades totais de ERO e/ou ERN liberadas por RAW 264.7 (esquerda) e PLB-985 pré-tratado com PMA (direita) com e sem incubação com AA, após 1 hora, (c = 1 mM).



Para avaliar qual o limiar entre o efeito pró-oxidante e antioxidante na resposta total com os diferentes tipos celulares, foram realizados diversos experimentos com cada população celular em diferentes concentrações e seguiram-se os testes individuais.

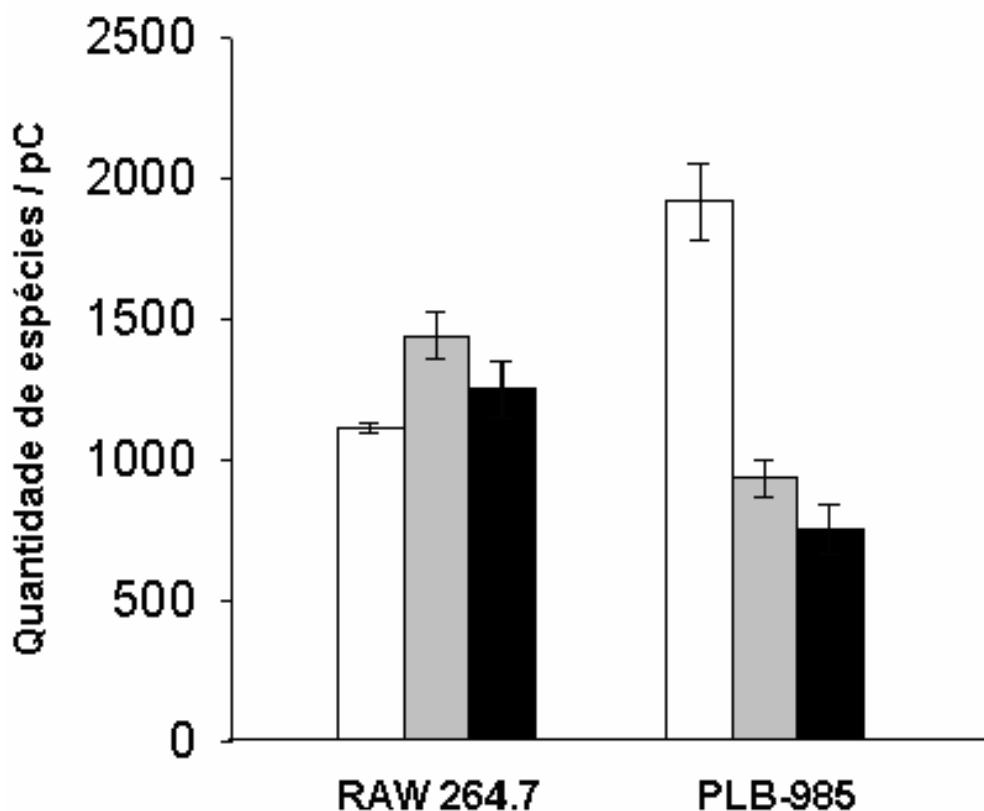
#### 4.3.2 Efeito da concentração do Ácido Ascórbico no surto oxidativo

Usando o mesmo procedimento de incubação, as células PLB-985 pré-tratadas com PMA e RAW 264.7 foram tratadas com várias concentrações de AA (1, 5 e 10 mM). Como ilustrado na Tabela 2, um aumento na concentração de AA induz a uma constante diminuição da resposta amperométrica (quantidade de moléculas liberadas) nas células mielóides. Entretanto, na concentração de 10 mM, os dados não puderam ser considerados, devido à mortalidade das células de PLB-985, isto é, a maioria delas se desprende da placa de Petri e sua membrana apresentou-se deformada, indicando que tal tratamento provoca a morte celular. Ainda, a Tabela 2 mostra que, para as células PLB-985, o aumento na concentração de AA conserva o efeito antioxidante, observado com 1 mM, embora em menor proporção.

**Tabela 2:** Efeito da concentração de AA na média da produção total de ERO e/ou ERN produzida pelo surto oxidativo de células RAW 264.7 e mielóides pré-tratadas com PMA, em função da incubação por 1 hora. Cerca de 30 células em cada caso.

	<b>Carga (RAW 264.7)</b>	<b>Carga (PLB-985)</b>
Controle	1110 ± 22 pC	1915 ± 134 pC
AA (1 mM)	1439 ± 86 pC	932 ± 65 pC
AA (5 mM)	1250 ± 100 pC	755 ± 88 pC

Por outro lado, como mostram a Tabela 2 e Figura 58, em todos os experimentos relacionados com os macrófagos, nas diferentes concentrações testadas de AA, houve um aumento na liberação de ERO e ERN quando comparado ao controle. Entretanto, com 5 mM, o aumento da resposta foi relativamente menor que observado na concentração de 1 mM. Estas observações sugerem mais uma vez que o AA aumenta a produção de ERO e ERN nos macrófagos, mas de forma não dependente da concentração.



**Figure 58:** Cargas totais detectadas em potencial de +850 mV vs. ESC durante a oxidação amperométrica de ERO e ERN liberadas por RAW 264.7 (esquerda) e por PLB-985, pré-tratadas com PMA (direita), em solução de PBS (pH 7,4), (controle, branco) ou após incubação, por 1 hora, com AA,  $c = 1$  mM (cinza) ou  $c = 5$  mM (preto). Cada curva representa a média dos sinais de, no mínimo, 20 diferentes respostas individuais celulares.

Todos os experimentos demonstram que o AA pode atuar como um composto pró e anti-oxidante. Assim, o AA diminui a liberação de ERO e ERN total das células de PLB-985 pré-tratadas com PMA, enquanto estimula a liberação de ERO e ERN em células RAW 264,7.

Para continuar e determinar a natureza real de ERO e ERN liberadas na resposta celular na presença e ausência de AA, realizaram-se experimentos em diferentes potenciais, visto que, como descrito anteriormente (Amatore e cols., 2006) (tópico 1.5, pág. 23-26), a depender do potencial aplicado, o microeletrodo de fibra de carbono platinizada é seletivo para as espécies oxigenadas e nitrogenadas. Esses experimentos permitiram quantificar a contribuição de cada espécie ( $H_2O_2$ ,  $ONOO^-$ ,  $NO^\bullet$ ,  $NO_2^-$ ) no surto oxidativo celular.

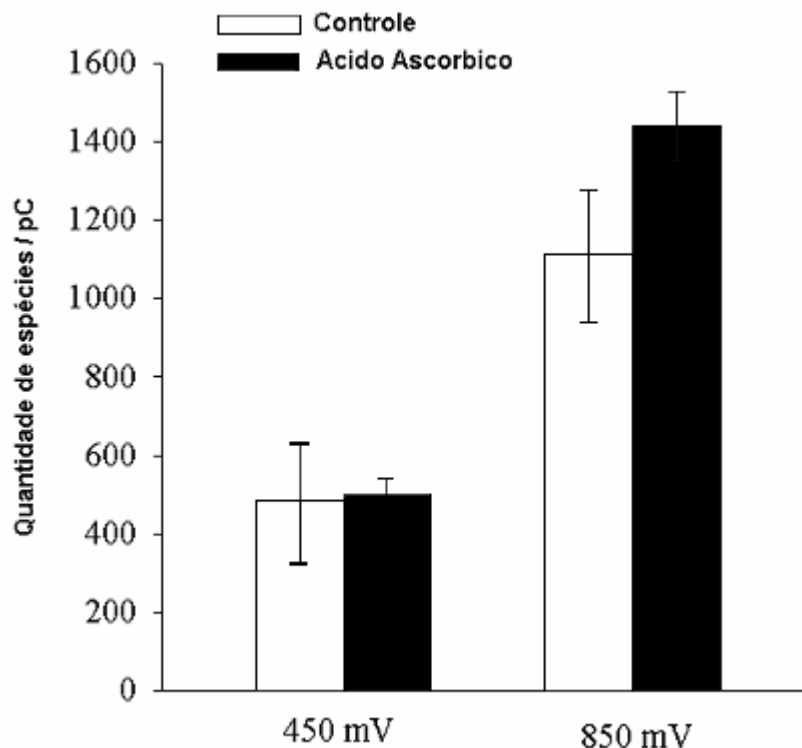
### 4.3.3 A natureza das diferentes espécies liberadas por RAW 264.7 e pelas células PLB-985 pré-tratadas com PMA

Os resultados mostrados nas Figuras 55-58 foram obtidos em potencial de +850 mV vs. ESC são referentes ao fluxo total de ERO e ERN liberados pelas células em condições de controle ou após incubação com 1 e 5 mM de AA. Nesta fase do trabalho, serão focalizadas as mudanças provocadas por AA na produção primária de  $O_2^\bullet$  e  $NO^\bullet$  pelas células, em potenciais adequados, de acordo com a situação específica.

A determinação da natureza das espécies reativas liberadas pelos macrófagos tratados com AA foi conseguida pela realização das medidas do estresse oxidativo em dois diferentes potenciais: +450 e +850 mV vs ESC. No potencial máximo de 850 mV, todas as espécies oxigenadas e nitrogenadas foram detectadas simultaneamente, enquanto em +450 mV, apenas o peróxido de hidrogênio e peroxinitrito foram coletados.

Como mostrado na Figura 59, quando as medidas foram efetuadas em potencial de +450 mV, com 1 mM de AA, a quantidade liberada das ERON, ou seja o fluxo total de peroxinitrito e peróxido de hidrogênio não se mostrou significativo em relação ao controle. Isto indica que o aumento observado no potencial de +850 mV relaciona-se a uma maior produção de ERN, ainda que  $ONOO^-$  (resultante da reação dos radicais  $O_2^\bullet$  e  $NO^\bullet$ ) não tenha mudado.

Uma vez que  $NO_2^-$  é um produto resultante de  $ONOO^-$ , pode-se, seguramente, concluir que o fluxo primário de espécies nitrogenadas reativas afetado pelo AA é o  $NO^\bullet$ . Observa-se que sob condições químicas, o  $NO_3^-$  é o produto final de  $ONOO^-$ , mas sob as condições executadas em nossos experimentos, com curto período de tempo e para a faixa de concentração de  $ONOO^-$  liberada pelas células isoladas, o principal produto de decomposição de  $ONOO^-$  é o  $NO_2^-$  (Amatore e cols., 2001).

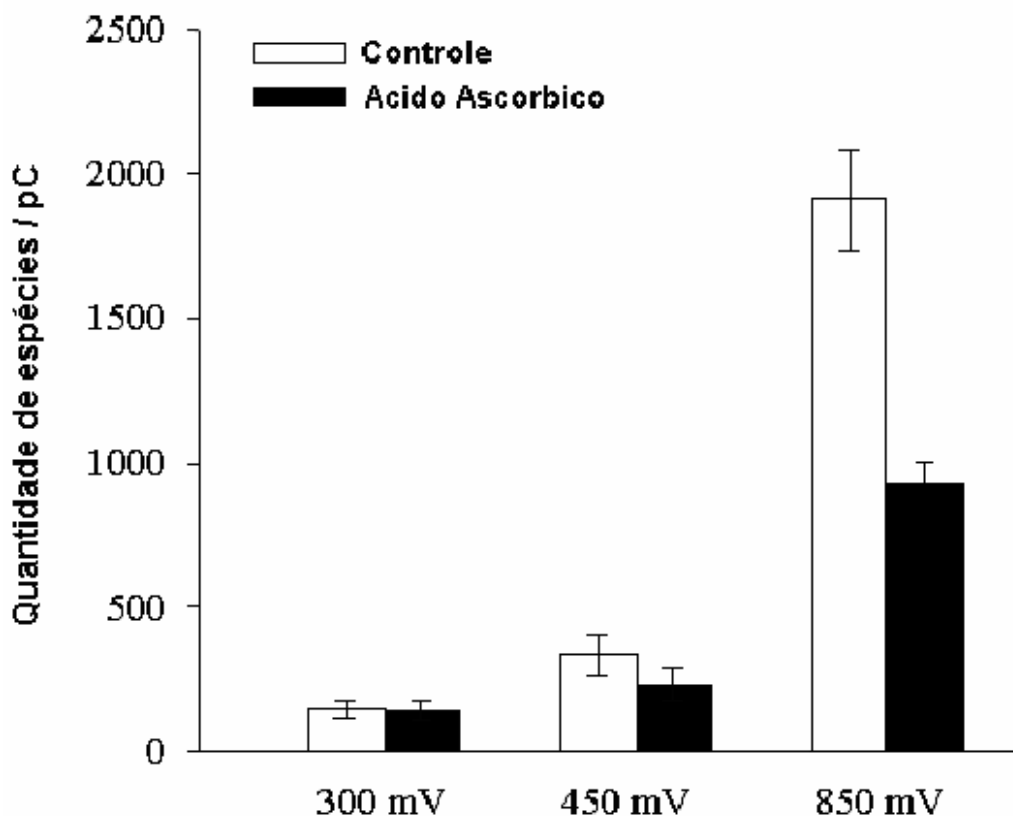


**Figura 59:** Quantidade média de ERO e/ou ENR liberadas pelos macrófagos RAW 264.7 detectada por microeletrodo de fibra de carbono platinizada em 850 mV ou 450 mV vs. ECSS em PBS (pH = 7,4). c = 1 mM.

Em relação ao estudo com as células mielóides pré-tratadas com PMA, a Figura 60 mostra que ocorreu uma diminuição da carga (quantidade de espécies) quando o potencial do eletrodo foi posicionado em +450 mV, após a incubação com 1 mM de AA, assim como observado em +850 mV. Este resultado significa que uma parte das espécies oxidadas no potencial específico (isto é,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e/ou  $\text{ONOO}^-$ ) é consumida na presença de AA. Desde que a diminuição observada em +850 mV é muito maior do que em +450 mV, isto indica que as ERN são definitivamente afetadas. A determinação individual do peróxido de hidrogênio pode ser conseguida por experimentos no potencial de +300 mV vs. ECSS.

Os resultados mostrados na Figura 60 indicam que a presença de 1 mM de AA não modifica significativamente a quantidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  liberado durante o processo de ativação das células PLB, visto que a resposta em potencial de 300 mV foi idêntico ao controle, indicando que a produção de peróxido de hidrogênio não foi afetada. Esse fato sugere que a diminuição observada em +450 mV é representada principalmente pela restrição na produção de peroxinitrito, e que em +850 mV, uma diminuição de  $\text{NO}^\bullet$  e  $\text{NO}_2^-$  é muito mais importante. Novamente, uma vez que  $\text{NO}_2^-$  é o produto final de  $\text{ONOO}^-$  (e então de  $\text{NO}^\bullet$ ), sob as condições do experimento, isso

sugere que a espécie principal que foi afetada pela incubação com o AA foi novamente o  $\text{NO}^*$ , embora tenha havido também um pequeno efeito na produção de  $\text{ONOO}^-$ .

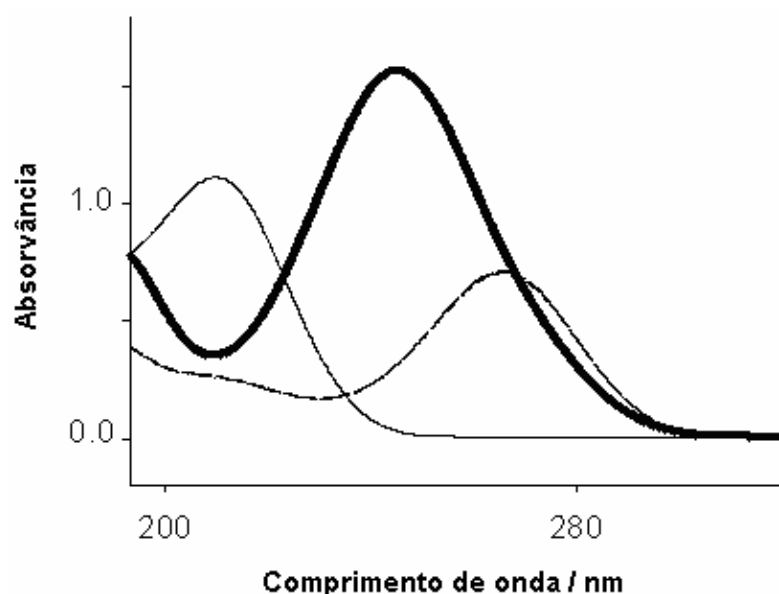


**Figura 60:** Quantidade média de ERO e/ou ENS liberadas por PLB-985 em presença de 1 mM de AA detectada por microeletrodo de fibra de carbono platinizada em +850 mV, +450 mV e +300 mV vs. ECSS, em PBS (pH = 7,4).

Esses resultados mostram que o AA, após incubação com cada tipo celular, parece ser ativo, essencialmente, na produção das espécies primárias de ERN, no caso,  $\text{NO}^*$ . Investigações espectrofotométricas no UV, *in vitro*, foram realizadas para verificar a reação do AA e ERN.

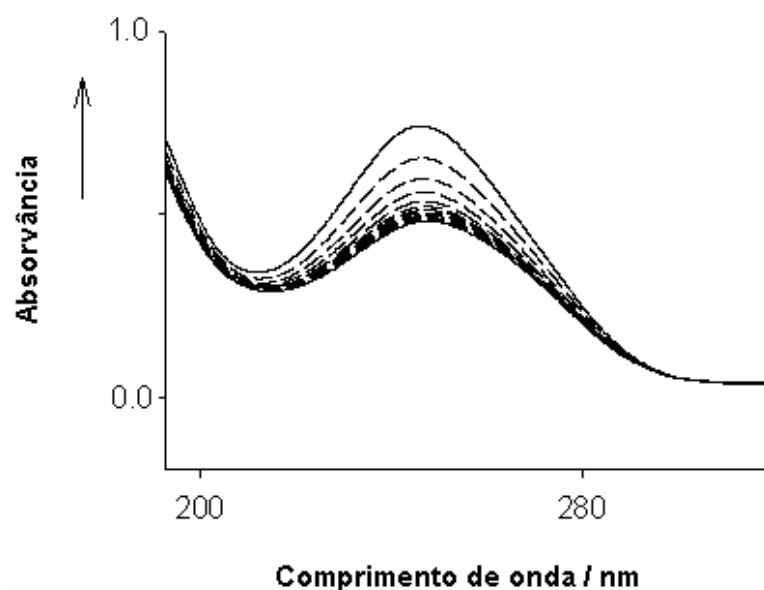
#### 4.3.4 Estudos de Espectrofotometria no UV de ERN consumidas pelo AA

Soluções de AA são normalmente conhecidas por sua instabilidade, sob condições aeróbias, sendo oxidadas pelo oxigênio atmosférico. A Figura 61 representa a sobreposição do espectro de UV do AA, 1 mM, mostrando que sua banda característica é 245 nm, e do desidroascorbato (AAox), 1 mM, seu produto de oxidação bi-eletrônica, apresenta banda característica em 265 nm (Toth e cols., 2002)



**Figura 61:** Espectros no UV de soluções puras de 1 mM de AA (linha grossa), 1 mM de íons nitrito (linha fina) e 1 mM do desidroascorbato (linha fina tracejada).

A oxidação espontânea do AA em solução aquosa saturada de oxigênio (ar) foi confirmada por experimentos na cubeta de quartzo, não desaerada. A banda característica do AA, em 245 nm (1 mM, Figura 62), diminui espontaneamente com 20 minutos, embora esta diminuição cesse após, aproximadamente,  $0,30 \pm 0,05$  mM de AA tenha sido consumido. Isto indica que o conteúdo de oxigênio inicialmente presente nas soluções saturadas de ar (isto é,  $0,23$  mM de  $O_2$ ) é reduzido a água pelo AA, para formar o desidroascorbato. O espectro mostrado na Figura 61 correlaciona-se com a sobreposição de AA, cerca de  $0,70 \pm 0,05$  mM e desidroascorbato, cerca de  $0,30 \pm 0,05$  mM.



**Figura 62:** Evolução com o tempo da absorvância de UV de uma solução de AA, 1 mM, em uma cubeta saturada inicialmente com ar (cada curva representa o tempo de 3 minutos).

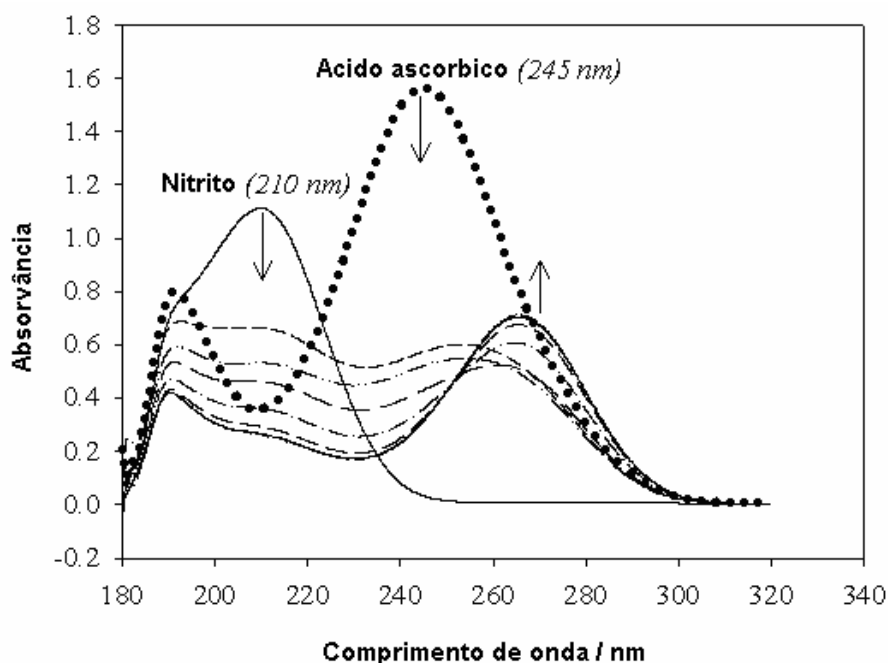
O mesmo ocorre, necessariamente, para as soluções usadas para a incubação das células, o que explica a razão das concentrações iniciais nessas soluções serem maiores que 0,70 mM para produzir algum efeito. Ainda mais, as concentrações finais serão menores do que sua análise formal, já que enquanto as incubações estão ocorrendo, é difícil quantificar a concentração de AA, uma vez que as placas de Petri, em que as células estão sendo incubadas, oferecem uma grande superfície exposta ao ar. Então, o oxigênio pode se misturar nas soluções durante o tempo de incubação de 1 hora, fazendo com que a concentração de AA varie durante o período de incubação, sendo muito menor do que a inicial. É possível que esse fato seja a principal razão para a inatividade aparente de AA, quando as células foram incubadas com soluções abaixo de 1 mM.

A reatividade de AA com peróxido de hidrogênio, 1 mM, (o principal produto de ERO liberado pelas células investigadas, exceto para o  $\text{ONOO}^-$  que é tanto ERO quanto ERN) foi monitorada mas não houve mudança significativa frente à reação em solução saturada com ar.

Para estabelecer a facilidade da reação de AA com ERN, foi investigada a estabilidade de suas soluções na presença de íons nitrito (1 mM). O íon  $\text{NO}_2^-$  foi escolhido, já que é uma espécie nitrogenada estável, ou seja, o menos reativo de todas as ERN sob as condições do sistema utilizado (Amatore e cols., 2000). Assim,

qualquer reatividade de  $\text{NO}_2^-$  com AA constituiria uma evidência própria que AA sofreria reação com todas as espécies nitrogenadas reativas.

Essa hipótese foi testada pela mistura da solução de  $\text{NO}_2^-$  com a de AA, antes de sua lenta oxidação pelo ar. A Figura 61 representa a sobreposição do espectro independente no UV de  $\text{NO}_2^-$ , 1 mM, e de AA, 1 mM, evidenciando a absorção característica de íons nitrito em 210 nm e de AA em 245 nm. A Figura 63 mostra o tempo de evolução (a cada 3 minutos) do espectro da mistura de AA com  $\text{NO}_2^-$ . As bandas de absorção de  $\text{NO}_2^-$  e AA em 210 e 245 nm, respectivamente, diminuem rapidamente enquanto uma nova banda aparece em 265 nm, caracterizando a absorvância do produto final da reação (cerca de 30 minutos). Nota-se que as bandas em 210 e 245 nm diminuem rapidamente ( $t_{1/2} \sim 3$  minutos) e poderiam não ser observadas no final da reação. Isto mostra que a maioria do  $\text{NO}_2^-$  foi consumido ao longo de sua reação com AA. Assim, uma eficiente reação estequiométrica 1:1 entre AA e  $\text{NO}_2^-$  (observe que AA reage em paralelo com o oxigênio dissolvido na solução) (Figura 62) é obtida. O produto final, caracterizado por sua absorção em 265 nm (Figura 63 vs. Figura 61) foi novamente o desidroascorbato, o produto da oxidação bieletrônica do AA.

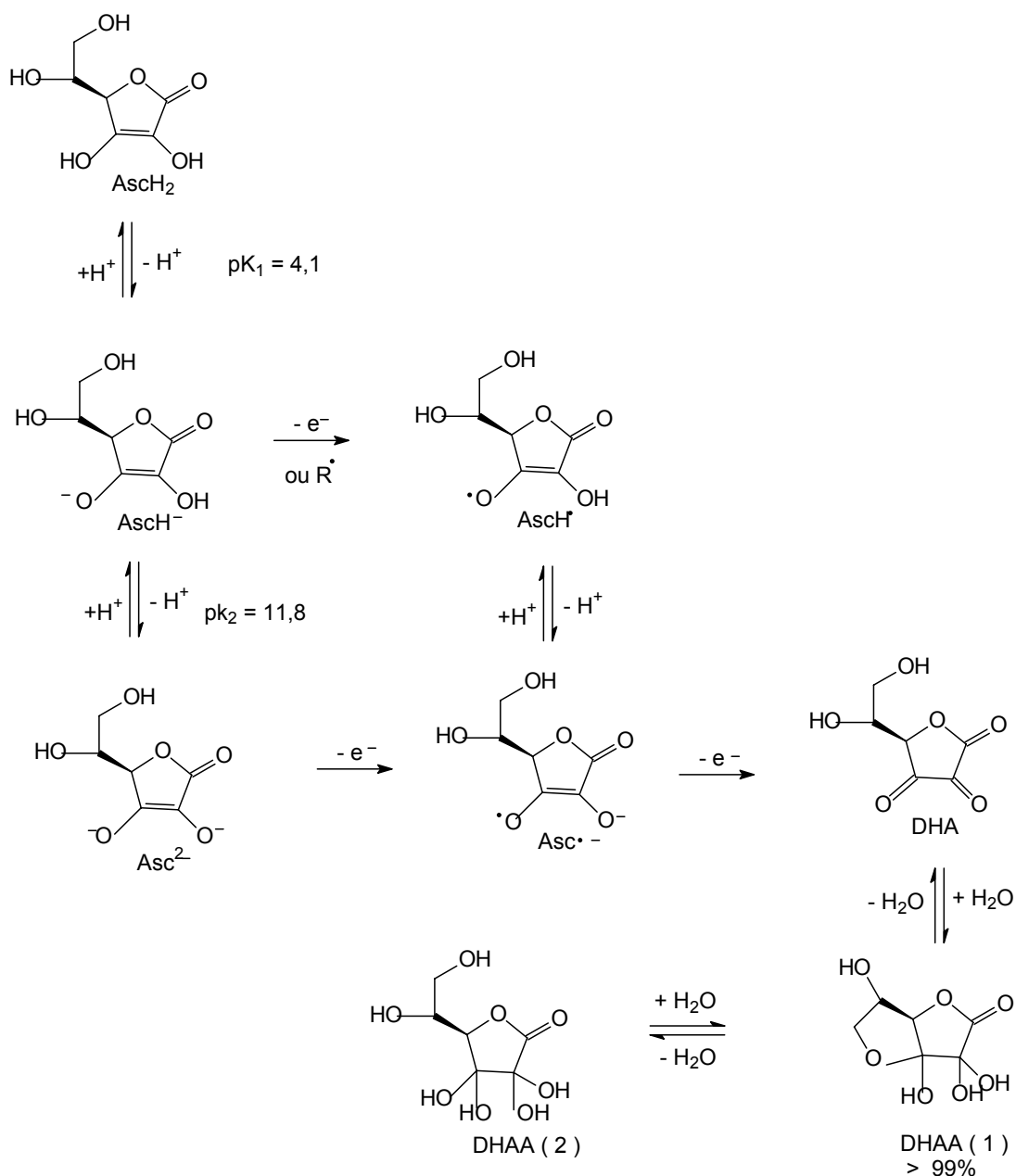


**Figura 63:** Espectro no UV de uma solução pura de AA (1 mM;  $\lambda_{\text{max}} = 245$  nm; curva pontilhada) e íons nitrito (1 mM;  $\lambda_{\text{max}} = 210$  nm; curva com linha fina cheia). A formação do desidroascorbato é vista na evolução após a mistura das soluções, em  $\lambda_{\text{max}} = 265$  nm (linha mais grossa). As varreduras foram executadas em intervalo de 3 minutos.



### 4.3.5 Discussão dos resultados do AA

As espécies reativas de oxigênio oxidam o AA via um processo total ( $2e^-/2H^+$ ) produzindo o desidroascorbato, que não provoca dano celular (Figura 64).



**Figura 64:** Estrutura Química do AA sob a forma de ascorbato (Asch<sup>-</sup>). Formas encontradas do AA em pH fisiológico (7,4): 99,95% na forma Asch<sup>-</sup>, 0,05% na forma protonada de AA (Asch<sub>2</sub>) e 0,004% como diânion desidroascorbato (Asc<sup>2-</sup>). O ascorbato atua como anti-oxidante ao doar um átomo de hidrogênio (H<sup>•</sup> ou H<sup>+</sup> + e<sup>-</sup>), formando o ânion-radical ascorbila (Asc<sup>•-</sup>). Adaptado de [www.medicine.uiowa.edu/FRRB/virtualschool/virtual.html](http://www.medicine.uiowa.edu/FRRB/virtualschool/virtual.html).

Esse fato explica as propriedades antioxidantes do AA (Barone e cols., 2003; Kurs e cols., 2003). Embora todas as ERO possam oxidar AA, este resultado mostra que ou o tempo de reação correspondente é muito maior do que foi possível testar nesses experimentos ou sob condições fisiológicas, a reação entre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e AA não é direta, mas catalisada pelas enzimas locais.

As medidas amperométricas das células PLB-985 pré-tratadas com PMA e dos macrófagos RAW-264.7 tratados com diferentes concentrações de AA revelaram propriedades cinéticas e quantitativas, com efeitos pró e antioxidantes. Os resultados amperométricos mostram que o AA, nas células PLB-985 pré-tratadas com PMA, age como antioxidante. Já nas células RAW 264.7, ele promove a produção de espécies nitrogenadas reativas durante o surto oxidativo, embora seu efeito não seja linear com o aumento da concentração. Para PLB-985, o caráter antioxidante é aumentado com o aumento da concentração de AA (Tabela 2), fato observado na faixa de 1 a 5 mM de AA. Além disso, os resultados amperométricos realizados em potenciais selecionados (Figuras 59 e 60), estabeleceram que a produção de ERN (ONOO<sup>-</sup>, NO<sup>•</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) é a mais afetada, desde que o fluxo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aparece relativamente mais constante, em relação ao controle. Este resultado foi posteriormente confirmado, *in vitro*, com a espectrofotometria no UV. A reação entre o AA e o oxigênio é rápida e irreversível conforme confirmado espectrometricamente pelo monitoramento da oxidação de AA, 1 mM, em desidroascorbato, em uma solução saturada de ar. O mesmo tipo de experimento realizado com NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 1 mM, evidenciou que mesmo a espécie menos reativa da família de ERN reage em poucos minutos ( $t_{1/2} \sim 3$  min) para produzir o derivado desidroascorbato.

Numa interpretação alternativa, pode-se pensar que o AA reage com algum cofator da reação enzimática produtora de ERN. Na depleção de algum cofator é esperado, de fato, induzir a diminuição da atividade cinética da iNOS, tendo por consequência, uma diminuição específica de ERN liberada durante o surto oxidativo, monitorada após pré-incubação com o AA. Esta hipótese pode ser consistente com o fato de que após a incubação com o AA, houve a diminuição da intensidade do surto oxidativo e também da taxa de produção do nitrito (Figura 60).

Por outro lado, o estudo cinético e quantitativo demonstrou que o AA provocou aumento não linear, na produção de ERN em célula RAW 264.7, uma vez que o aumento da concentração de AA no meio de incubação não foi seguido pelo aumento do efeito pró-oxidante. De fato, o surto oxidativo, após incubação com 5

mM de AA, ficou limitado entre os valores observados para as células tratadas com 1 mM e o controle (Figura 58). Este estudo e outros com células endoteliais (Huang e cols., 2000) sugerem que, dependendo da concentração ou do tempo de incubação, a atividade do AA pode mudar o comportamento entre pró e antioxidante.

Embora a análise de um efeito proeminentemente antioxidante, relacionado a maiores concentrações de AA (10 mM), tivesse sido prejudicada nos experimentos com a linhagem de células PLB-985, devido à mortalidade das células, há uma clara evidência que nessas células, o AA atua de duas maneiras, uma pró-oxidante em concentrações menores e uma antioxidante, em maiores concentrações, embora o efeito pró-oxidante predomine na faixa de concentração disponível para estudo.

As medidas amperométricas nas células estudadas incubadas previamente em diferentes concentrações de AA estabeleceram que tanto as ações cinética e quantitativa diferiram, em relação à natureza das células estudadas. Uma vez que as células foram lavadas após a incubação e as propriedades investigadas do estresse oxidativo foram realizadas em solução nova de PBS, os efeitos observados não podem ser relacionados aos interferentes extracelulares com o AA. Então, as mudanças observadas foram caracterizadas por sua reatividade com as células durante o período de tratamento.

Este experimento *in vitro* auxilia na comprovação da hipótese, de que o AA reage com o íon nitrito, numa escala de tempo de segundos, e foi confirmado em experimentos independentes. Realmente,  $\text{NO}_2^-$  é certamente menos reativo do que os íons peroxinitrito, seu parente com tempo de vida mais curto. A mesma série de experimentos foi realizada com peróxido de hidrogênio e íons nitrito, mostrando que a absorvância do AA (245 nm) permanece constante na sua presença. Então, isto confirma que o AA consome, preferencialmente, ERN em células PLB-985 pré-tratadas com PMA. Para as células RAW 264.7, os resultados amperométricos mostram que o AA aumenta a produção de ERN.

## 5. CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou que a liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pode ser detectada e quantificada por amperometria, com potenciais pré-determinados, utilizando microeletrodo de fibra de carbono platinizada a distâncias micrométricas de células individuais. Assim também, pode-se detectar o efeito direto de compostos farmacologicamente ativos na produção de ERO e ERN em experimentos seqüenciais, sem adição de inibidores ou outros artifícios bioquímicos e farmacológicos.

O efeito da beta-lapachona em macrófagos é dependente da concentração e do tempo de incubação. Observou-se, principalmente, o aumento da liberação de peróxido de hidrogênio nos tratamentos utilizados. Apesar do mecanismo de ação biológico da beta-lapachona ser ainda inconcluso, é possível que o aumento da geração do peróxido de hidrogênio causado pela presença dessa quinona em macrófagos possa ser estendido para outras células e seja possível considerar como a causa de sua toxicidade em células cancerosas, desde que tais intermediários são tóxicos ao sistema biológico. Ao mesmo tempo, o decréscimo de  $\text{NO}^*$ , evidenciado nos macrófagos, permite considerar a beta-lapachona, uma potencial candidata a agente anti-inflamatório.

Em relação à formação do complexo de inclusão entre a beta-lapachona e a beta-ciclodextrina, foi observado por espectrometria de UV/Vis a formação do complexo beta-lapachona-beta-ciclodextrina e aumento da solubilidade da beta-lapachona em tampão fosfato. Foi possível verificar também que a presença de etanol diminui a estabilidade do complexo.

As medidas amperométricas, em tempo real, executadas nas diferentes linhagens de células confirmaram o paradoxo relacionado às propriedades antioxidante/pró-oxidante aceitas universalmente para o ácido ascórbico. O ácido ascórbico influencia o surto oxidativo em células, afetando a produção primária de  $\text{NO}^*$ . A vitamina C atua exclusivamente como um anti-oxidante (reduz o fluxo das espécies primárias de  $\text{NO}^*$ ) nas células PLB pré-tratadas com PMA, diminuindo, assim, a quantidade de ERN liberadas. Já, nas células RAW 264.7, o ácido ascórbico aumenta a liberação de espécies nitrogenadas reativas (aumenta o fluxo de  $\text{NO}^*$ ).

## 6. PERSPECTIVAS

1. Realizar estudos da alfa e beta-lapachonas em macrófagos e quantificar o cálcio intra e extracelular.
2. Realizar testes enzimáticos com a beta-lapachona e iNOS.
3. Investigar o complexo beta-lapachona-beta-ciclodextrina formado em células macrofágicas.
4. Estudos eletroquímicos utilizando microeletrodos para a detecção de ERO/ERN em células cancerosas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afanas'ev I. B.; Korkina L. G.; Suslova T. B.; Soodaeva, S. K. Are quinones producers or scavengers of superoxide ion in cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 281(2), 243-250, 1990.

Alcaín F. J and Villalba J. M. NQO1-directed antitumour quinones. *Expert Opin. Ther. Patents*. 17(6), 1-17, 2007.

Amatore C. and Arbault S. Oxidative stress at the Single Cell Level, in: A. Sydney; A. L. Miguel and M. D. Nicolelis (Eds). *Electrochemical Methods for Neuroscience*, CRC Press, 261-283, 2007.

Amatore C. and Maisonhaute E. When Voltammetry Reaches Nanoseconds. *Analytical Chemistry*. American Chemical Society. 303-311, 1, 2005.

Amatore C. Electrochemistry at ultramicroelectrodes. In *Physical electrochemistry: principles, methods and applications.*, Rubinstein, Ed. Marcel Dekker: New York, pp 131-208, 1995.

Amatore, C.; Arbault, S.; Bruce, D.; de Oliveira, P.; Erard, M. and Vuillaume, M. Analysis of individual biochemical events based on artificial synapses using ultramicroelectrodes: cellular oxidative burst. *Faraday Discuss*. 116, 319-333, 2000.

Amatore, C.; Arbault, S.; Bouton, C.; Coffi, K.; Drapier, J. C.; Ghandour, H. and Tong, Y. H. Monitoring in real-time with microelectrodes the release of reactive oxygen and nitrogen species by a single macrophage. *Chem. Bio. Chem*. 7, 653-661, 2006.

Amatore, C.; Arbault, S.; Bruce, D.; de Oliveira, P.; Erard, L. M. and Vuillaume, M. Characterization of the Electrochemical Oxidation of Peroxynitrite in Relevance with Oxidative Stress Bursts Measured at the Single Cell Level. *Chem. Eur. J*. 7, 4171-4179, 2001.

Amatore C.; Kelly R. S.; Kristensen E. W.; Kuhr W. G. and Wightman R. J. Effects of restricted diffusion at ultramicroelectrodes in brain tissue. The pool model: theory and experiment for chronoamperometry. *Electroanal. Chem*. 213, 31-42, 1986.

Amatore, C., Arbault, S., Bonifas, I., Bouret, Y., Erard, M., Ewing, A. G., Sombers, L. A. Correlation between vesicle quantal size and fusion pore release in chromaffin cell exocytosis. *Biophysical Journal*. 88, 4411-4422, 2005.

Amatore, C. and Fosset, B., Equivalence between microelectrodes of different shapes: between myth and reality. *Anal. Chem*. 68(24), 4377-4388, 1996.

Arbault S.; Edeas M.; Legrand-Poels S.; Sojic N.; Amatore C.; Piette J.; Best-Belpomme M.; Lindenbaum A. and Vuillaume M. Phenylarsine oxide inhibits ex vivo HIV-1 expression. *Biomed & Pharmacother*. 51, 430-438, 1997.

Arbault S.; Pantano P.; Jankowski J. A.; Vuillaume M. and Amatore C. Monitoring an Single Human Oxidative Stress Mechanism at a Fibroblast. *Anal. Chem.* 67, 3382-3390, 1995.

Arbault, S., Pantano, P., Sojic, N., Amatore, C., Best-Belpomme, M., C., Sarasin, A., Vuillaume, M. Activation of the NADPH oxidase in human fibroblasts by mechanical intrusion of a single cell with an ultramicroelectrode. *Carcinogenesis*. 18 (3), 569-574, 1997.

Arbault, S., Sojic, N., Bruce, D., Amatore, C., Sarasin, A., Vuillaume, M. Oxidative stress in cancer prone xeroderma pigmentosum fibroblasts. Real-time and single cell monitoring of superoxide and nitric oxide production with microelectrodes. *Carcinogenesis*. 25 (4), 509-515, 2004.

Babior B. M. Superoxide: a two-edged sword. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. Biological Research. 30, 141-155, 1997.

Bailly, C. Topoisomerase I Poisons and Suppressors as Anticancer Drugs. *Curr. Med. Chem.* 7, 39-58, 2000.

Bard, A. J. and Faulkner, L. R. *ELECTROCHEMICAL METHODS: Fundamentals and Applications*. SECOND EDITION. John Wiley & Sons, Inc. United States. 2001.

Barone, M. C.; Darley-Usmar, V. M. and Brookes, P.S. Reversible Inhibition of Cytochrome c Oxidase by Peroxynitrite Proceeds through Ascorbate-dependent Generation of Nitric Oxide. *J. Biol. Chem.* 278, 27520–27524, 2003.

Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M. and David, J. P. Estresse Oxidativo: Relação Entre Geração de Espécies Reativas e Defesa do Organismo. *Química Nova*. 29(1), 113-123, 2006

Bartosz, G. Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species. *Clinica Chimica Acta*. 368, 53 – 76, 2006.

Barzilai, A. and Yamamoto, K-I. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA repair*. 3, 1109-1115, 2004.

Benhar, M., Engelberg, D., Levitzki, A. ROS, stress-activated kinases and stress signalling in cancer. *European Molecular Biology Organization*. 3 (5), 420-425, 2002.

Bode A. M.; Green E.; Yavarow C. R.; Wheeldon S. L.; Bolken S.; Gomez Y.; Rose R. C. Ascorbic acid regeneration by bovine iris-ciliary body. *Current Eye Research*. 12, 593-601, 1993.

Bolton, J. L.; Trush, M.A.; Penning T. M.; Dryhurst, G.; Monks, T. *Chem. Res. Toxicol.* 13(3), 136-158, 2000.

Borgmann, S.; Radtke, I.; Erichsen, T.; Blöchl, A.; Heumann, R. and Schuhmann, W. Electrochemical High-Content Screening of Nitric Oxide Release from Endothelial Cells. *ChemBioChem*. 7, 662 – 668, 2006.

Boothman, D.; Gao, J.; Nasongkla, N. et al., Drug delivery system useful for inhibiting proliferation of cancerous cell comprises lapachone or its prodrug incorporated in biocompatible polymer, US2004001871-A1, WO2003090710-A1, WO2003090710-A, 2004.

Boveris, A.; Docampo, R.; Turrens, J. F. and Stoppani, A. O. M. Effect of  $\beta$ -lapachone on Superoxide Anion and Hydrogen Peroxide Production in *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical Journal*. 175, 431-439, 1978.

Buettner, G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipidic peroxidation,  $\alpha$ -tocopherol, and ascorbate. *Archives Biochemistry and Biophysics*. 300(2), 535-543, 1993.

Cahill, P. S.; Walker, Q. D.; Finnegan, J. M.; Mickelson, G. E.; Travis, E. R. and Wightman, R. M. Microelectrodes for the Measurement of Catecholamines in Biological Systems. *Anal. Chem.*, 68, 3180-3186, 1996.

Campbell, J. D.; Cole, M.; Bunditruvorn, B. and Vella, A. T. Ascorbic Acid Is A Potent Inhibitor of Various Forms of T Cell Apoptosis. *Cell. Immunol*. 194, 1-5, 1999.

Carvalho, C. E. M.; Ferreira, V. F.; Pinto, A. V.; Pinto, M. C. F. R.; Harrison, William. Heterocyclic derivatives from natural occurring naphthoquinones: synthesis, characterization and X-ray structure of beta-lapachone hydrazo compounds. *Dyes and Pigments*. 52(3), 209-214. 2002.

Cash, T. P.; Pan, Y. and Simon, C. Reactive Oxygen Species and Cellular Oxygen Sensing. *Free Radical Biology & Medicine*. 43, 1219-1225, 2007.

Chau, Y.-P.; Shiah, S.-G.; Don, M.-J. and Kuo, M.-L. Involvement of Hydrogen Peroxide in Topoisomerase Inhibitor beta-Lapachone-Induced Apoptosis and Differentiation in Human Leukemia Cells. *Free Radical Biology & Medicine*. 24 (4), 660-670, 1998.

Chen, B.; Keshive, M. and Deen, W. M. Diffusion and Reaction of Nitric Oxide in Suspension Cell Cultures. *Biophysical Journal*. 75, 745-754, 1998.

Chen, Y.-P.; Liu, S.-Y. and Yu, H.-Q. A simple and rapid method for measuring dissolved oxygen in waters with gold microelectrode. *Analytica Chimica Acta*. 598, 249-253, 2007.

Chesis, P. L.; Levin, D. E.; Smith, M. T.; Ernster, L. and Ames, B. N. Mutagenicity of Quinones: Pathways of Metabolic Activation and Detoxification. *PNAS*. 81, 1696-1700, 1984.

Choi, Y. H.; Kim, M. J.; Lee, S. Y.; Lee, Y.-N.; Chi, G. Y.; Eom, N. D. And Choi, B. T. Phosphorylation of p53, induction of Bax and activation of caspases during  $\beta$ -lapachone-mediated apoptosis in human prostate epithelial cells. *International Journal of Oncology*. 21, 1293-1299, 2002.



Correia, A. N.; Mascaro, L. H.; Machado, S. A. S.; Mazo, L. H. and Avaca L. A. Ultramicroeletrodos. Parte I: Revisão Teórica e Perspectivas. *Química Nova*. 18 (5), 475-480, 1995.

Crow, J. P. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide*. 1(2), 145-157, 1997.

de Carvalho R. M; Kubota L. T. and Rohwedder J. J. Fibras de carbono: aplicações em eletroanalítica como material eletródico. *Química Nova*. 22 (4), 591-599, 1999.

Docampo, R.; Cruz, F. S.; Boveris, A.; Muniz, R. P. A. and Esquivel, D. M. S.  $\beta$ -lapachone enhancement of lipid peroxidation and superoxide anion and hydrogen peroxide formation by sarcoma 180 ascites tumor cells. *Biochemical Pharmacology*. 28, 723-728, 1979.

Don M-J.; Chang Y-H.; Chen K-K.; Ho L-K. and Chau, Y-P. Induction of CKD inhibitors (p21<sup>WAF1</sup> and p27<sup>Kip1</sup>) and bak in the  $\beta$ -lapachone-induced apoptosis of human prostate cancer cells. *Molecular Pharmacology*. 59 (4), 784-794, 2001.

Dubin, M.; Fernandez, V. S. H. and Stoppani, A. O.; Inhibition of microsomal lipid peroxidation and cytochrome P-450-catalyzed reactions by beta-lapachone and related naphthoquinones. *Biochem. Pharmacol.* 39, 1151-1160, 1990.

Edmonds, T. E. Electroanalytical applications of carbon fibre electrodes. *Anal. Chim. Acta* 175, 1-22, 1985.

Espey, M.G.; Miranda, K.M.; Feelisch, M.; Thomas, D. D.; Xavier, S. A.; Citrin, D.; Vitek, M. P. And Wink, D. A. Mechanisms of cell death governed by the balance between nitrosative and oxidative stress. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 899: 209–221, 2000.

Fialkow, L.; Wang, Y. and Downey, G. P. Reactive Oxygen and Nitrogen Species as Signaling Molecules Regulating Neutrophil Function. *Free Radical Biology & Medicine*. 42, 153-164, 2007.

Frank, J.; Flaccus, A.; Schwarz, C.; Lambert, C. and Biesalski, H. K. Ascorbic acid suppresses cell death in rat DS-sarcoma cancer cells induced by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Free Radical Biology & Medicine*. 40, 827–836, 2006.

Frydman, B.; Marton, L. J.; Sun, J. S.; Neder, K.; Witiak, D. T.; Liu, A. A.; Wang, H. M.; Mao, Y.; Wu, H. Y.; Sanders, M. M. and Liu, L. F. Induction of DNA topoisomerase II – mediated DNA cleavage by  $\beta$ -lapachone and related naphthoquinones. *Cancer Research*. 57, 620-627, 1997.

Gaikwad, N. W.; Rogan, E. G. and Cavalieri, E. L. Evidence from ESI-MS for NQO1-catalyzed Reduction of Estrogen ortho-quinones. *Free Radical Biology & Medicine*. 43, 1289-1298, 2007.

Genestra, M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular Signalling*. 19, 1807–1819, 2007.

Goijman S. G. and Stoppani A. O. Effects of beta-lapachone, a peroxide-generating quinone, on macromolecule synthesis and degradation in *Trypanosoma cruzi*. *Arch. Biochem. Biophys.* 240, 273-280, 1985.

Gomes, A.; Fernandes, E. and Lima, J. Use of Fluorescence Probes for Detection of Reactive Nitrogen Species: A Review. *J. Fluorescence*. 16, 119-139, 2006.

Griendling, K. K. and FitzGerald, G. A. Monitoring of ROS Oxidative Stress and Cardiovascular Injury: Part I: Basic Mechanisms and In Vivo. *Circulation*. 108, 1912-1916, 2003

Griffiths, H. R. and Lunec J. Ascorbic acid in the 21st century - more than a simple antioxidant. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 10(4), 173-182, 2001.

Grow, A. J. and Ischiropoulos, H. J. Nitric oxide chemistry and cellular signalling. *J. Cell. Physiol*. 187, 277-282, 2001.

Haile, L. G. and Flaherty J. F. Atovaquone: a review. *The Annals of Pharmacotherapy*. 27(12), 1488-1494, 1993

Halliwell, B and Gutteridge J. M. C. *Free Radical in Biology and Medicine*. 4. ed. Oxford: Oxford University Press, p851, 2007.

Halliwell, B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem. J.* 401, 1–11, 2007.

Halliwell, B. and M. Whiteman. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *Brit. J. Pharmacol.* 2004, 142, 231-255.

Ham, S. W.; Park, J.; Lee, S. J.; Kim, W.; Kang, K.; Choi, K. H. Naphthoquinone analogs as inactivators of cdc25 phosphatase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8(18), 2507-10, 1998.

Hamre, K.; Waagbo, R.; Berge, R.; Lie, O. Vitamins C and E interact in juvenile atlantic salmon. *Free Radical in Biology and Medicine*. 22(1 e 2), 137-149, 1997.

Hernandez-Benito, J.; Gonzalez-Mancebo S.; Calle E.; Garcia-Santos M. P. and Casado J. A Practical Integrated Approach to Supramolecular Chemistry. I. Equilibria in Inclusion Phenomena. *J. Chem. Educ.* 76, 419–421, 1999.

Hillard, A. E.; , De Abreu, F. C.; Ferreira, D. C. M.; Jaouen, G.; Goulart, M. O. F. And Amatore C. *Electrochemical Parameters and Techniques In Drug Development. Emphasis on Quinones and Related Compounds.* Chem. Comm. 2008.

Holley, A. E. and Cheeseman K. H. Measuring free radical reactions *in vivo*. *Br Med Bull.* 49, 494–505, 1993.

Huang, A.; Vita, J. A.; Venema, R. C. and Keaney, J. F. Ascorbic Acid Enhances Endothelial Nitric-oxide Synthase Activity by Increasing Intracellular Tetrahydrobiopterin. *J. Biol. Chem.* 275, 17399–17406, 2000.

Irons, R. D. and Sawahata, T. In: *Bioactivation of Foreign Compounds*. M. W. Anders, Ed. Academic Press, New York, cap. 9, 1985.

Ischiropoulos, H.; Zhu, L. and Beckman, J. S. Peroxynitrite Formation from Macrophage-Derived Nitric Oxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 298(2), 446-451, 1992.

Jacq, J.: Reactions chimiques et électrochimiques couplées en régime stationnaire .2. Systèmes redox consécutifs. *Electrochim. Acta.* 12, 1345, 1967.

James, S. L. Role of Nitric Oxide in Parasitic Infections. *Microbiological Reviews*. 59(4), 533–547, 1995.

Jeffic, L., Manning, G. A survey on electrochemical reduction of quinones. *J. Electroanal. Chem.* 26, 195, 1970.

Jiang, Z.; Reddy, D. G. and D. Reddy, Pharmaceutical composition containing beta-lapachone, useful for treating tumors and dermatological disorders, includes a solubilizing carrier, US2004071775-A1, US2003091639-A1, WO2003011224-A2, 2003.

Kapadia, G. J.; Azuine, M. A.; Balasubramanian, V. and Sridhar, R. Aminonaphthoquinones—A Novel Class of Compounds With Potent Antimalarial Activity Against *Plasmodium Falciparum*. *Pharmacological Research*. 43(4), 363-367, 2001.

Koppenol, W. H., Moreno, J. J., Pryor, W. A., Ischiropoulos, H., and Beckman, J. S., Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide, *Chemical Research in Toxicology* 5, 834-842, 1992.

Koppenol, W. H., the basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite, *Free Radical Biology And Medicine* 25, 385-391, 1998.

Koppenol, W. H., Thermodynamics of reactions involving nitrogen-oxygen compounds, in *Nitric Oxide, Pt A - Sources And Detection Of NO; NO Synthase, Methods in enzymology*. 268, pp. 7-12, 1996.

Kounaves S. P.; Nadzhafova O. Y.; Tarasov V. and Tan S. H. Ultramicroelectrode Arrays Modified With Ionomer-Entrapped Silica Films as Potential Voltammetric Sensors for Copper, Lead and Selenium. *Analytical Sciences*. 17 Supplement, i1031-i1033, 2001.

Kovacic, P and Becvar, L. E. Mode of Action of Anti-Infective Agents: Focus on oxidative Stress and Eletron Transfer *Curr. Pharm. Des.* 5(7), 1-25, 1999.

Kumi-Daka, J. Chemosensitivity of human prostate cancer cells PC3 and LNCaP to genistein isoflavone and  $\beta$ -lapachone. *Biology of the Cell*. 94, 37-44, 2002.

Lenton, K. J.; Therriault, H.; Fulop, T.; Payette, H. and Wagner, J. R. Glutathione and ascorbate are negatively correlated with oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Carcinogenesis*. 20, 607–613; 1999.

Li C. J.; Averboukh L. and Pardee A. B.  $\beta$ -lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. *The journal of Biological Chemistry*. 268, 22463-22468, 1993.

Li, C. J.; Li, Y-Z.; Pinto, A. V.; Pardee, A. A. Potent inhibition of tumor survival in vivo by  $\beta$ -lapachone plus taxol: combining drugs imposes different artificial checkpoints. *PNAS*. 96 (23), 13369-13374, 1999.

Li, Y.; Sun, X.; Lamont, J. T.; Pardee, A. B.; Li, C. J. Selective killing of cancer cells by  $\beta$ -lapachone: direct checkpoint activation as a strategy against cancer. *PNAS*. 100(5), 2674-2678, 2003.

Liochev, S. I. and Fridovich, I. The effects of superoxide dismutase on  $H_2O_2$  formation. *Free Radical Biology & Medicine*. 42, 1465–1469, 2007.

Liu, S.-H.; Tzeng, H.-P.; Kuo, M.-L. and Lin-Shiau, S.-Y. Inhibition of inducible nitric oxide synthase by  $\beta$ -lapachone in rat alveolar macrophages and aorta. *British Journal of Pharmacology*. 126, 746 – 750, 1999.

Liu, T-J., Lin, S-Y., Chau, Y-P. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase activation attenuates  $\beta$ -Lapachone-induced necrotic cell death in human osteosarcoma cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 182, 116-125, 2002.

Lown J. W. Newer approaches to the study of the mechanisms of action of antitumor antibiotics. *Acc. Chem. Res*. 15(12), 381-7, 1982.

Machado, J. D.; Segura, F.; Brioso, M. A. and Borges, R. Nitric Oxide Modulates a Late Step of Exocytosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 275(27), 20274–20279, 2000.

Mackman N. Lipopolysaccharide Induction of Gene Expression in Human Monocytic Cells. *Immunol Res*. 21, 247-251, 2000.

Macmicking, J.; Xie, Q.-W. and Nathan, C. Nitric Oxide and Macrophage Function. *Annu. Rev. Immunol*. 15:323–50, 1997.

Malone, M. M.; Doherty, A. P.; Smyth, M. R. and Vos, J. G. Flow injection amperometric determination of nitrite at a carbon fibre electrode modified with the polymer  $[Os(bipy)_2(PVP)_{20}Cl]Cl$ . *Analyst*. 117, 1259, 1992.

Mans D. R. A.; Roch, A. B. And Schwartzmann. Anti-cancer Drug Discovery and Development in Brazil: Targeted Plant Collection as a Rational Strategy to Acquire Candidate Anti-Cancer Compounds. *The Oncologist*. 5, 185-198, 2000.

Meßmer U. K.; LAPETINA E. G. And BRÜNE B. Nitric Oxide-Induced Apoptosis in RAW 264.7 Macrophages Is Antagonized by Protein Kinase C- and Protein Kinase A- Activating Compounds. *Molecular Pharmacology*. 47, 757-765, 1995.

Misico, R. I. and Forzani, E. S. Measurement of hydrolysis decay time constants of monoarylimino derivatives of  $\beta$ -lapachone through cyclic voltammetry *Electrochem. Commu.*, 5(6), 449-454, 2003.

Monks, T. J. and Jones, D. C. The Metabolism and Toxicity of Quinones, Quinonimines, Quinone Methides, and Quinone-Thioethers. *Current Drug Metabolism*. 425 (3), 425-438, 2002.

Monks, T. J.; Hanzlik, P.; Cohen, G. M.; Ross, D.; Graham, D. G. Quinone chemistry and toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 112, 2-16, 1992.

Moon, D.-O.; Choi, Y. H.; Kim, N.-D.; Park, Y.-M. and Kim, G.-Y. Anti-inflammatory Effects of beta-lapachone in Lipopolysaccharide-stimulated BV2 Microglia. *International Immunopharmacology*. 7, 506-514, 2007.

Nasongkla N.; Wiedmann A. F.; Bruening A.; Beman M.; Ray D.; Bornmann W. G; Boothman D. A. and Gao J. Enhancement of Solubility and Bioavailability of beta-Lapachone Using Cyclodextrin Inclusion Complexes. *Pharmaceutical Research*. 20, 1626-1633, 2003.

Nohl, H.; Gille, L. and Kozlov, A. V. Antioxidant-derived prooxidant formation from ubiquinol. *Free Radical Biology & Medicine*. 25 (6), 666-675, 1998.

Olson, K. J.; Ahmadzadeh H. and Arriaga E. A. Within the cell: analytical techniques for subcellular analysis. *Analytical Bioanalytical Chemistry*. 382, 906-917, 2005.

Otero, P.; Viana, M.; Herrera, E. and Bonet, B. Antioxidant And Prooxidant Effects Of Ascorbic Acid, Dehydroascorbic Acid And Flavonoids On Ldl Submitted To Different Degrees Of Oxidation. *Free Rad. Res.* 619-626, 1997.

Ough, M.; Lewis, A.; Bey, E. A.; Gao, J.; Ritchie, J. M.; Bornmann, W.; Boothman, D. A.; Oberley, L. W.; Cullen, J. J. Efficacy of  $\beta$ -lapachone in pancreatic cancer treatment. *Cancer Biology & Therapy*. 4(1), 95-102, 2005.

Pardee A. B.; Li Y. Z. and Li C. J. Cancer Therapy with beta-lapachone. *Current Cancer Drug Therapy*. 2, 227-242, 2002.

Park, H. J.; Ahn, S. W.; Williams, B.; Kim, E. J.; Griffin, R.; Bey, E. A.; Bornmann, W. G.; Gao, J.; Park, H. J.; Boothman, D. A.; Song, C. W. Susceptibility of cancer cells to  $\beta$ -lapachone is enhanced by ionizing radiation. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 61 (1), 212-219, 2005.

Pereira A. C.; Santos A. S. and Kubota L. T. Tendência em Modificação de Eletrodos Amperométricos para Aplicações Eletroanalíticas. *Química Nova*. 25(6), 1012-1021, 2002.

Petrillo, G.; Mariggio, M. A.; Aiello, C.; Cordazzo, C.; Fenoglio, C.; Morganti, S.; Croce, M.; Rizzato, E.; Spinelli D.; Maccagno, M.; Bianchi, L.; Prevosto, C.; Tavana, C. and Vialec, M. Design, synthesis, and in vitro evaluation of new naphthylnitrobutadienes with potential antiproliferative activity: Toward a structure/activity correlation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 16, 240–247, 2008.

Pink, J. J.; Planchon S. M.; Tagliarino C.; Varnes M.; Siegel D.; Boothman D. A. NAD(P)H:Quinone oxidoreductase activity is the principal determinant of  $\beta$ -lapachone cytotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry*. 275(8), 5416-5424, 2000.

Planchon, S. M.; Pink, J. J., Tagliarino, C.; Bormann, W. G.; Varnes, M. E. and Boothman, D. A.  $\beta$ -lapachone-induced apoptosis in human prostate cancer cells involvement of nsol/xip3. *Exp. Cell. Res.* 267, 95-106, 2001.

Portela, M. M. P.; Villamil, F. S. H.; Perissinotti, L. J. and Stoppani, A. O. Redox cycling of o-naphthoquinones in trypanosomatids. Superoxide and hydrogen peroxide production. *Biochem. Pharmacol.* 52, 1875-1882, 1996.

Poulsen, H. E.; Weimann, A.; Salonen, J. T.; Nyssonen, K.; Loft S.; Cadet, J.; Douki, T. and Ravanat, J. Does vitamin C have a pro-oxidant effect? *Nature*. 395,231–232, 1998.

Powis, G.; Svingen, B. A. and Appel, P. Quinone-Stimulated Superoxide Formation by Subcellular Fractions, Isolated Hepatocytes, and Other Cells. *Molecular Pharmacology*. 20, 387-394, 1981.

Pryor, W. A.; Houk, K. N.; Foote, C. S.; Fukuto, J. M.; Ignarro, L. J.; Squadrito, G. L. and Davies, K. J. A. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am J Physiol Regul Integr Comp Physio.* 291, R491–R511, 2006.

Quijano, C.; Romero, N.; Radi, R. Tyrosine nitration by superoxide and nitric oxide fluxes in biological systems: Modeling the impact of superoxide dismutase and nitric Oxide Diffusion. *Free Radical Biology & Medicine*. 39, 728 – 741, 2005.

Ramos, L. A.; Cavalheiro, C. C. S. and Cavalheiro E. T. G. Determinação De Nitrito em Águas Utilizando Extrato de Flores. *Quimica Nova*. 29(5), 1114-1120, 2006.

Reinicke K. E.; Bey E. A.; Bentle M.; Pink J. J., Ingalls S. T.; Hoppel C. L.; Misico R. I.; Arzac G. M.; Burton G.; Bornmann W. G.; Sutton D.; Gao J.; Boothman D. A. Development of  $\beta$ -lapachone prodrugs for therapy against human cancer cells with elevated NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 levels. *Cancer Therapy: Preclinical*. 11(8), 3055-3064, 2005.

Rice, M. E. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci.* 23, 209-16, 2000.

Rivière, J.; Ravanat J.-L. and Wagner J. R. Ascorbate and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative DNA damage in Jurkat cells. *Free Radical Biology & Medicine*. 40, 2071–2079, 2006.

Rose R. C. and Bode A. M. Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. *Faseb Journal*. 7, 1135-1142, 1993.

Salas, C.; Tapia, R. A.; Ciudad, K.; Armstrong, V.; Orellana, M.; Kemmerling, U.; Ferreira, J.; Maya, J. D.; and Morello, A. *Trypanosoma cruzi*: Activities of lapachol and alpha- and beta-lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 668–674, 2008.

Schafer, F.Q. and Buettner, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biol. Med.* 30, 1191, 2001

Schroeder T. J.; Jankowski J. A; Kawagoe K T.; Wightman R M.; Lefrou C. and Amatore, C. Analysis of diffusional broadening of vesicular packets of catecholamines released from biological cells during exocytosis. *Anal. Chem.* 64, 3077-3083, 1992.

Schulz, J. B.; Lindenau, J.; Seyfried, J. and Dichgans, J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur. J. Biochem.* 267, 4904-4911, 2000.

Segura-Aguilar, J.; Jönsson, K.; Tidefelt, U. and Paul, C. The cytotoxic effects of 5-OH-1,4-naphthoquinone and 5,8-diOH-1,4-naphthoquinone on doxorubicin-resistant human leukemia cells (HL-60). *Leukemia Research*. 16(6-7), 631-637, 1992.

Shao, Y. and Mirkin, M. V. Nanometer-Sized Electrochemical Sensors. *Anal. Chem.* 69, 1627-1634, 1997.

Shi, M. M.; Godleski, J. J. and Paulauskis, J. D. Regulation of Macrophage Inflammatory Protein-1a mRNA by Oxidative Stress. *The Journal of Biological Chemistry*. 271(10), 5878–5883, 1996.

Shiah, S.-G.; Chuang, S.-E.; Chau, Y.-P.; Shen, S.-C. and Kuo, M.-L. Activation of c-Jun NH2-terminal Kinase and Subsequent CPP32/Yama during Topoisomerase Inhibitor b-Lapachone-induced Apoptosis through an Oxidation-dependent Pathway. *Cancer Research*. 59, 391–398, 1999.

Silva, S. M.; Alves C. R.; Martins A. N.; Nobre A. L. R.; Machado S. A. S.; Mazo L. H. and Avaca L. A. Ultramicroeletrodos. Parte II: Construção e Aplicações. *Quimica Nova*. 21(1), 78-84, 1998.

Silva, M. N.; Ferreira, V. F.; De Souza, M. C. B. V. Um Panorama Atual da Química e da Farmacologia de Naftoquinonas, com Ênfase na beta-Lapachona e Derivados. *Química Nova*. 26(3), 407-16, 2003.

Spitsin, S. V.; Scott, G. S.; Mikheeva, T.; Zborek, A.; Kean, R. B.; Brimer, C. M.; Koprowski, H. and Hooper, D. C. Comparison Of Uric Acid And Ascorbic Acid In Protection Against Eae. *Free Radical Biology & Medicine*. 33(10), 1363–1371, 2002.

Stryer, L. In: *Biochemistry*. 4 ed., W. H. Freeman, New York, 1995.

Sun, H.; Chen, W. and Kaifer, A. E. A Simple Method Based on NMR Spectroscopy and Ultramicroelectrode Voltammetry for the Determination of the Number of Electrons in Faradaic Processes. *Organometallics*. 25, 1828-1830, 2006.

Tagliarino, C.; Pink, J. J.; Dubyak, G. R.; Nieminen, A-L.; Boothman, D. A. Calcium is a key signalling molecule in  $\beta$ -lapachone-mediated cell death. *The Journal of Biological Chemistry*. 276 (1), 19150-19159, 2001.

Tarpey, M. M. and Fridovich, I. Methods of Detection of Vascular Reactive Species: Nitric Oxide, Superoxide, Hydrogen Peroxide, and Peroxynitrite. *Circ. Res.* 89, 224-236, 2001.

Terpstra M.; Tkac I.; Rao R. and Gruetter R. Quantification of vitamin C in the rat brain in vivo using short echo-time 1H MRS. *Magn. Reson. Med.* 55, 979-83, 2006.

Thannickal V. J. and Fanburg B. L. Reactive oxygen species in cell signalling. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 279, L1005–L1028, 2000.

Thornton, D. E.; Jones, K. H.; Jiang, Z.; Zhang, H.; Liu, G. and Cornwell, D. G. Antioxidant and Cytotoxic Tocopheryl Quinones In Normal and Cancer Cells. *Free Radical Biology & Medicine*. 18 (6), 963-976, 1995.

Thorpe G. W.; Fong C. S.; Alic N.; Higgins V. J. and Dawers I. W. Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: Oxidative-stress-response genes. *PNAS*. 101(17), 6564-6569, 2004.

Togashi H.; Shinzawa H.; Matsuo T., Y. Takeda, T. Takahashi, M. Aoyama, K. Oikawa And H. Kamada. Analysis of Hepatic Oxidative Stress Status by Electron Spin Resonance Spectroscopy and Imaging. *Free Radical Biology & Medicine*. 28(6), 846–853, 2000.

Tonholo, J.; Freitas, L. R.; De Abreu, F. C.; Azevedo, D. C.; Zani, C. L.; De Oliveira, A.B.; Goulart, M.O.F. J. Electrochemical Properties of BiologicallyActive Heterocyclic Naphthoquinones. *Braz. Chem. Soc.* 9(2), 163-9, 1998.

Toth, M.; Kukor, Z. and Valent, S. Chemical stabilization of tetrahydrobiopterin by L-ascorbic acid: contribution to placental endothelial nitric oxide synthase activity. *Mol. Hum. Reprod.* 8, 271– 280, 2002.

Tucker, K. A.; Lilly, M. B.; Heck, L. and Rado, T. A. Characterization of a new human diploid myeloid leukemia cell line (PLB- 985) with granulocytic and monocytic differentiating capacity. *Blood*. 70, 372– 378, 1987.

Tzeng, H-P.; Ho, F-M.; Chao, K-F.; Kuo, M-L.; Lin-Shiau, S-Y.; Liu, S-H.  $\beta$ -lapachone reduces endotoxin-induced macrophage activation and lung edema and mortality. *American Journal of respiratory and critical care medicine*. 168, 85-91, 2003.

Valko, M.; Izakovic, M.; Mazur, M.; Rhodes, C. J. and Telser, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 266, 37–56, 2004.



Valko M.; Rhodes C. J.; Moncola J.; Izakovic M.; Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 160, 1–40, 2006.

Vasconcelos S. M. L.; Goulart M. O. F.; Moura J. B. F.; Manfredini V.; Benfato M. Da S. And Kubota L. T.. Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores de Dano Oxidativo em Sangue Humano: Principais Métodos Analíticos para sua Determinação. *Química Nova*. 30(5), 1323-1338, 2007.

Vennerstrom, J. L. and Eaton, J. W. Oxidants, oxidant drugs, and malaria. *J. Med. Chem.* 31(7), 1269-77, 1988.

Verchier, Y.; Nguyen; M. V.; Morel C. F.; Arbault S. and Amatore C. Concerted Activities of Nitric Oxide Synthases and NADPH Oxidases in PLB-985 Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 361, 493-498, 2007.

Wang, H. and Joseph, J. A. Quantifying cellular oxidative stress by cichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biology & Medicine*. 27, 612-616, 1999.

Wang, X.; Thomas B.; Sachdeva R.; Arterburn L.; Frye L.; Hatcher P. G.; Cornwell D. G. and Ma J. Mechanism of arylating quinone toxicity involving Michal adduct formation and induction of endoplasmic reticulum stress. *PNAS*. 103 (10), 3604-3609, 2006.

Wardman, P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: Progress, pitfalls, and prospects. *Free Radical Biology & Medicine*. 43, 995–1022, 2007.

Williams, K. J; Cowen, R. L and Stratford, I. J. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer Tumour hypoxia — therapeutic considerations. *Breast Cancer Res*. 3, 328–331, 2001.

Witte, N. V.; Stoppani, A. O. M. and Dubin, M. 2-Phenyl- $\beta$ -lapachone can affect mitochondrial function by redox cycling mediated oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 432, 129-135, 2004.

Wuerzberger, S. M.; Pink, J. J.; Planchon, S. M.; Byers, K. L.; Bornmann, W. G. and Boothman, D. A. Induction of apoptosis in MCF-7-WS8 breast cancer cells by beta-lapachone. *Cancer Res*. 58, 1876–1885, 1998.

[www.medicine.uiowa.edu/FRRB/virtualschool/virtual.html](http://www.medicine.uiowa.edu/FRRB/virtualschool/virtual.html)

Xia, Y. and Zweier, J. L. Superoxide and Peroxynitrite Generation from Inducible Nitric Oxide Zweter Synthase in Macrophage. *PNAS*. 94, 6954-6958, 2007.

Yang, Z.; Lu, Y.; Zhao, J.; Gong, Q.; Yin, X. and Yang Z. Ultramicroelectrode Voltammetric Investigation of Intermicellar Interaction and Micellar Growth of Sodium

Dodecyl Sulfate in Aqueous NaCl Solutions. *J. Phys. Chem. B.* 108, 7523-7527, 2004.

Yasukawa T.; Glidle A.; Cooper J. M. and Matsue T. Electroanalysis of Metabolic Flux from Single Cells in Simple Picoliter-Volume Microsystems. *Anal. Chem.* 74, 5001-5008, 2002.

## 8. ANEXOS

### ARTIGOS

1. Fabiane C. de Abreu, **Danielle C. M. Ferreira**, Marília O. F. Goulart, Olivier Buriez, Christian Amatore. Electrochemical activation of  $\beta$ -lapachone in  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes and reactivity of its reduced form towards oxygen in aqueous solutions. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 608, 125–132, 2007.
2. Christian Amatore, Stéphane Arbault, **Danielle Cristhina Melo Ferreira**, Issa Tapsoba, Yann Verchier. Vitamin C stimulates or attenuates reactive oxygen and nitrogen species (ROS, RNS) production depending on cell state: Quantitative amperometric measurements of oxidative bursts at PLB-985 and RAW 264.7 at the single cell level. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 615, 34–44, 2008.
3. Abreu, F. C.; **Ferreira, D. C. M.**; Wadgawan, J.; Amatore, C.; Ferreira, V. F.; Silva, M. N.; Souza, M. C. B. V.; Gomes, T. S.; Ximenes, E. A.; Goulart, M. O. F. Electrochemistry of b-lapachone and its diazoderivative: relevance to their compared antimicrobial activities. *Electrochemistry Communications*. 7, 767-772, 2005.
4. F. C. de Abreu, F. S. de Paula, **D. C. M. Ferreira**, V. B. Nascimento, A. M. C. Santos, M. M. Santoro, C. E. Salas, J. C. D. Lopes and M. O. F. Goulart. The Application of DNA-Biosensors and Differential Scanning Calorimetry to the Study of the DNA-Binding Agent Berenil. *Sensors*. 8, 1519-1538, 2008.
5. Elizabeth Anne Hillard, Fabiane Caxico de Abreu, **Danielle Cristhina Melo Ferreira**, Gérard Jaouen, Marília Oliveira Fonseca Goulart, Christian Amatore. Electrochemical parameters and techniques in drug development, with an emphasis on quinones and related compounds. *Chemical Communications*. DOI: 10.1039/b718116g, 2008.

### CAPITULO DE LIVRO

Ferreira, D. C. M.; Goulart, M. O. F.; Tapsoba, I.; Arbault, S.; Amatore, C. Electrochemical Study of Pharmacological Activity at Single Cells: Beta-lapachone Effect on Oxidative Stress of Macrophages. In: *The Electrochemical Society. (Org.). Pharmacoelectrochemistry*. 29 ed. New Jersey: The Electrochemical Society Inc., 2007, v. 3, p. 3-12.

Fabiane C. de Abreu; Maria Aline F. B. de Moura; Danielle Cristhina M. Ferreira; Janesmar C. M. Cavalcanti; Marília O. F. Goulart\*. *A Importância de Parâmetros Eletroquímicos em Química Medicinal. QUÍMICA MEDICINAL. Métodos e fundamentos em planejamento de fármacos. Primeira Edição. Editado por Carlos A. Montanari. Editora UFV 2008. In press*

## PRÊMIO

Melhor Poster - Metrohm-Autolab-Pensalab, Autolab-Pensalab- SIBEE 2007, XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica.

Ferreira, D. C. M.; Goulart, M. O. F; Moreira, M. S.; Tapsoba, I.; Arbault, S.; Amatore, C. Estresse Oxidativo e beta-lapachona. Detecção de Espécies Oxigenadas e Nitrogenadas Reativas em Macrófagos, Via Ultramicroeletroquímica.

## TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

Ferreira, D. C. M. ; Goulart, M. O. F ; Moreira, M. S. ; Tapsoba, I. ; Arbault, S. ; Amatore, C. Estresse Oxidativo e beta-lapachona. Detecção de Espécies Oxigenadas e Nitrogenadas Reativas em Macrófagos, Via Ultramicroeletroquímica.

In: XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica -SIBEE, 2007, Aguas de Lindoia. XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica -SIBEE, 2007.

Abreu, F. C; Souza, A. A.; Ferreira, D. C. M.; Buriez, O.; Amatore, C.; Almeida, W. P.; Goulart, M. O. F. Comportamento Eletroquímico de Compostos Biologicamente Ativos com Glutathionas Reduzida E Oxidada.

In: XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica-SIBEE, 2007, Aguas de Lindoia. XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica-SIBEE, 2007.

Ferreira, D. C. M.; Goulart, M. O. F; Tapsoba, I.; Arbault, S.; Amatore, C. Comparative Electrochemical Studies of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Lapachones Effects on the Oxidative Stress of Single Macrophage.

In: The international symposium of the Bioelectrochemical Society (BES), 2007, Toulouse. Book of The international symposium of the Bioelectrochemical Society, 2007

Abreu, F. C; Ferreira, D. C. M.; Goulart, M. O. F; Buriez, O.; Amatore, C. Electrochemical studies of b-lapachone in the Presence of Oxygen and in b-Cyclodextrin Inclusion Complexes.

In: The international symposium of the Bioelectrochemical Society (BES), 2007, Toulouse. Book of The international symposium of the Bioelectrochemical Society, 2007

Goulart, M. O. F ; Abreu, F. C ; Reys, J. R. ; Ferreira, D. C. M. ; Brett, A. M. ; Tapsoba, I. ; Arbault, S. ; Amatore, C. Pharmacoelectrochemistry of Beta-Lapachone. Electrochemical Tools for Understanding the Mechanism of Biological Action.

In: 210th Meeting of The Electrochemical Society XXI Congreso de la Sociedad Mexicana de Electroquímica, 2006, Cancun. Book of Symposium "Pharmaco-Electrochemistry", 2006.

Danielle C. M. Ferreira, Marília O. F. Goulart, Issa Tapsoba, Stéphane Arbault, Christian Amatore;  $\beta$ -Lapachone Effects On Oxidative Stress Analyzed In Real Time And *In Vivo*, On Single Macrophages;

In: 210th Meeting of the Electrochemical Society XXI Congreso de la Sociedad Mexicana de Electroquímica, 2006, Cancun. Book of Symposium "Pharmaco-Electrochemistry", 2006.

Ferreira, D. C. M.; Paula, F. S.; Auad, J.; Abreu, F. C ; Goulart, M. O. F. Using DNA Biosensor for Elucidation of Biologic Mechanism of Action.

In: 2nd Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, 2004, Rio de Janeiro. The 2nd Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry - Current Trends in Drug Discovery and Development, 2004

Nascimento, G. S. ; Abreu, F. C ; Ferreira, D. C. M. ; Goulart, M. O. F ; Silva, M. N.; Ferreira, V. F. Estudo Eletroquímico de Hidrazonas derivadas da beta-Lapachona em meio aprótico.

In: XXVI Congresso Latinoamericano de Quimica 27<sup>a</sup> Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Quimica, 2004, Salvador. XXVI CLAQ/27<sup>a</sup> RASBQuimica. Salvador : Livro de Resumos da 27a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2004. v. 01. p. EQ119.

## 9. GLOSSÁRIO

1. Surto oxidativo – consiste na liberação rápida de espécies reativas de oxigênio (ERO) a partir de diferentes células. Tem papel fundamental no sistema imune, (macrófagos e neutrófilos), na destruição de microrganismos e partículas estranhas.
2. Aduto, em química, é uma molécula resultante, terminal ou mesmo final, AB, formada pela união direta de moléculas A e B, sem que se produzam mudanças estruturais nas porções A e B.
3. Fagocitose é o englobamento e digestão de partículas sólidas e microrganismos por fagócitos ou células amebóides. Na corrente sanguínea, ocorre quando o sistema imunológico identifica um corpo estranho que será englobado e digerido pelos leucócitos.
4. Microglia – consiste em macrófagos especializados, capazes de fagocitar, que protegem os neurônios. São as menores de todas as células gliais e correspondem a 15% de todas as células do tecido nervoso. As células da glia, geralmente chamadas neuróglia ou simplesmente glia (grego para "cola"), são células não neuronais do sistema nervoso central que proporcionam suporte e nutrição aos neurônios.
5. Antioxidante – é um conjunto heterogêneo de substâncias formadas por vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outros compostos vegetais e, ainda, enzimas. Para um composto ser considerado um antioxidante, deve atender a duas condições básicas: (1) estar presente em baixas concentrações comparado com o substrato oxidável e (2) o radical resultante formado deve ser estável, pouco reativo e não tóxico.
6. Femto (símbolo f) é um prefixo no Sistema Internacional (SI) de Unidades denotando um fator de  $10^{-15}$ .
7. Atto (símbolo a) é um prefixo do Sistema Internacional de Unidades que denota um fator de  $10^{-18}$ .
8. Vitaminas são substâncias orgânicas, presentes em pequena quantidade nos alimentos naturais, essenciais para o metabolismo normal e cuja carência na dieta pode causar doenças. Não podem ser sintetizadas pelo homem, pelo menos, em quantidades apreciáveis.