

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

Tatiana Araujo Pereira

Danos oxidativos promovidos por  
espécies de Mn(III) sobre biomolécu-  
las e células em situação de estresse

Versão corrigida

São Paulo

Data do depósito na SPG:

26/04/2012

Tatiana Araujo Pereira

Danos oxidativos promovidos por espécies de Mn(III)  
sobre biomoléculas e células em situação de estresse.

*Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade de São Paulo  
para obtenção do título de Mestre em Ci-  
ências (Química)*

*Orientador: Prof Dr. Breno Pannia Espósito*

São Paulo

2012

EM BRANCO PARA ANEXAR A FOLHA DE APROVAÇÃO

## **Agradecimentos**

À minha família, namorado e amigos.

Ao orientador, Breno Pannia Espósito.

À aluna de iniciação científica Daniela Pereira, do laboratório de bioinorgânica.

A todos os colegas de laboratório.

Ao colega Raúl Bonne Hernández e à prof<sup>ª</sup>. Nadja Crithina de Souza Pinto Lardner (IQUSP).

Ao prof. Hermi Felinto de Brito (IQUSP) e aos seus alunos Jiang Kai; Lucas e Ivan.

Ao prof. Maurício da Silva Baptista (IQUSP).

Ao professores do Grupo de Pesquisa em Química Verde e Ambiental (GPQVA) do IQUSP.

À prof<sup>ª</sup>. Giselle Cerchiaro (UFABC).

Ao prof. Fabio Luis Forti (IQUSP) e sua aluna Gisele Espinha Teixeira da Silva.

Ao prof. Omar Abdel Moneim Abou El Seoud.

À prof<sup>ª</sup>. Ohara Augusto.

Ao programa de pós-graduação em Química do IQUSP.

Às agências CNPq e FAPESP.

*“Um homem que trabalha com as mãos é um operário;  
um homem que trabalha com as mãos e com o cérebro  
é um artesão; mas o homem que trabalha com as mãos,  
o cérebro e o coração, é um artista.”*

*São Francisco de Assis.*

## Resumo

Tatiana Araujo Pereira. DANOS OXIDATIVOS PROVOCADOS POR ESPÉCIES DE Mn(III) SOBRE BIOMOLÉCULAS E CÉLULAS EM SITUAÇÃO DE ESTRESSE. 2012. (115p). Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O manganês é um elemento traço essencial, porém existe uma preocupação com seus potenciais efeitos neurotóxicos associados à exposição a níveis excessivos, podendo provocar uma síndrome conhecida como manganismo, cujos sintomas são semelhantes aos da doença de Parkinson. A maioria dos trabalhos envolvendo manganês usa espécies de Mn(II), mas sabe-se que Mn(III) é acumulado em maior quantidade no cérebro. Nesse sentido, foi feito um estudo dos danos oxidativos e de toxicidade provocados por três complexos de Mn(III): citrato, pirofosfato e salicilenodiamina (respectivamente MnCit, MnPPi e EUK8). Para tanto, as três espécies foram sintetizadas e caracterizadas por métodos espectroscópicos. Em seguida foram determinadas suas capacidades pró-oxidantes sobre os seguintes marcadores: dihidro-rodamina (DHR), tirosina (Tyr), albumina (BSA) e dopamina (DA). Finalmente, seu efeito sobre células cerebelares e da cepa HeLa estressada por meio de irradiação UV também foi avaliado, e foi usado ascorbato na tentativa de tratar o dano sobre células HeLa. O teste com a DHR também foi feito em presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ascorbato.

A capacidade pró-oxidante testada por fluorescência da DHR sugere que o ascorbato atua como anti-oxidante. Além disso, MnCit e MnPPi (mas não EUK8), quando na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, são menos oxidantes. O mesmo comportamento foi percebido nas medidas de fluorescência de Tyr. A carbonilação da BSA, verificada pela absorbância do seu marcador (DN-PH), seria indício de capacidade oxidante dos complexos, mas não percebeu-se variação sig-

nificativa de grupos C=O na proteína após tratamento com espécies de Mn(III), mesmo em amostras com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, embora notem-se as mesmas tendências apresentadas pelos complexos com DHR e Tyr.

Estudos de oxidação de DA por luminescência tiveram resultados inconclusivos, mas dados mais concretos em testes com medidas de absorvância de soluções de DA e fluorescência de misturas de DA com DHR indicaram que DA é preferencialmente oxidada por todos os compostos.

A viabilidade celular de culturas de células neuronais granulares (CGC) mostrou pouca diferença entre as toxicidades dos compostos, mas verifica-se uma relação inversamente proporcional entre as toxicidades e lipofilicidades dos complexos. O mesmo não ocorre nos experimentos com HeLa, cuja viabilidade foi avaliada por contagem de colônias após fixação e coloração das células, pois nesse caso o EUK8 se mostrou o mais tóxico dos três. Além disso, ao contrário do observado com a DHR, o ascorbato teve ação pró-oxidante, e, aparentemente, houve um efeito sinérgico negativo entre os complexos e a radiação UV. Tratamento com o quelante *p*-aminossalicilato só foi eficaz na recuperação das culturas para amostras não irradiadas.

Palavras – chave: Manganês, toxicidade, neurônio, redox, biomoléculas.

## Abstract

Tatiana Araujo Pereira. OXIDATIVE DAMAGE INDUCED BY Mn(III) SPECIES OVER BIOMOLECULES AND STRESSED CELLS. 2012 (115p) PhD Thesis – Graduate program in Chemistry. Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo.

Manganese is an essential trace element, however there is considerable concern regarding its neurological effects when in excess, giving rise to a condition termed manganism which is characterized by Parkinson disease-like symptoms. Most evaluations of manganese toxicity use poorly defined Mn(II) species, although Mn(III) is known to accumulate preferentially in the brain. Therefore, in this work we proposed a study of oxidative damage and cytotoxicity of Mn(III) derivatives of citrate, pyrophosphate and salicylenediamine (respectively, MnCit, MnPPi and EUK8). The species were synthesized and characterized by spectroscopic methods. Their pro-oxidant abilities were assessed over markers of oxidant activity dihydrorhodamine (DHR), tyrosine (Tyr), albumin (BSA) and dopamine (DA). In addition, their effect over granular cerebral cells (CGC) and HeLa cells stressed by ultraviolet irradiation was studied, and treated with ascorbate. Tests with DHR were repeated treating the samples with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ascorbate.

Pro-oxidant ability tested by both DHR and Tyr fluorescence suggest that ascorbate is antioxidant towards Mn(III)-induced oxidative damage. MnCit and MnPPi (but not EUK8), when in presence of peroxide, are less oxidants. An analogous trend was observed for BSA, although without statistical significance.

Evaluation of DA formation by luminescence was inconclusive, but competition studies of DA+DHR mixtures indicated that DA is preferentially oxidized by all the complexes.



To CGC, little difference was observed for the toxicities of the complexes. An inverse relationship of toxicity and lipophilicity has been observed. However this was not observed for HeLa cells, to which EUK8 was more toxic. In addition, and in opposition to the DHR solution study, ascorbate was found to be pro-oxidant. A negative synergic effect was observed between complex doses and irradiation. Treatment of the cells with para-aminosalicylate was beneficial only for non-irradiated cells.

Keywords: Manganese, toxicity, neurons, redox, biomolecules.

## Lista de Abreviaturas e Siglas

<b>6-OHDA</b>	6-Hidroxidopamina
<b>AAS</b>	Ácido Acetilsalicílico
<b>Asc</b>	Ascorbato
<b>BHE</b>	Barreira Hematoencefálica
<b>BSA</b>	Albumina Bovina
<b>CGC</b>	Células Granulares Cerebelares
<b>CSF</b>	Fluido Cerebrospinal
<b>DA</b>	Dopamina
<b>DHR</b>	Dihidrorodamina
<b>diTyr</b>	Ditirosina
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMT</b>	Transportador de Metal Divalente
<b>DNPH</b>	Dinitofenilhidrazina
<b>EC50</b>	Efeito causado a 50 % de uma população testada
<b>Et<sub>2</sub>O</b>	Éter Etílico
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>GS</b>	Glutamina Sintetase
<b>GSH</b>	Glutationa
<b>HBS</b>	Tampão Hepes-salino
<b>L-DOPA</b>	L - 3, 4 - dihidroxifenilalanina
<b>MMT</b>	Metilciclopentadieniltricarbonil Mn

<b>MnCit</b>	Citrato de Mn(III)
<b>MnPPi</b>	Pirofosfato de Mn(III)
<b>MTT</b>	3-(4,5)-dimetiltiazolil -2,5 difeniltetrazólio
<b>N-AcPASH</b>	Ácido <i>N</i> -acetil- <i>p</i> -aminosalicílico
<b>NaPAS</b>	<i>p</i> -aminosalicilato de sódio
<b>OECD</b>	Organization for Economic Co-operation and Development
<b>PASH</b>	Ácido <i>p</i> -aminosalicílico
<b>PBS</b>	Tampão fosfato-salino
<b>PD</b>	Doença de Parkinson
<b>ROS</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>Salen</b>	<i>N,N'</i> -bis(salicilaldeído)etilenodiamina
<b>SOD</b>	Superóxido Dismutase
<b>Tf</b>	Transferrina
<b>TH</b>	Tirosina Hidroxilase
<b>Tyr</b>	Tirosina
<b>UV</b>	Ultravioleta

## Lista de Figuras

Figura 1. Diagrama de Frost para o manganês. ....	20
Figura 2. Energias de estabilização do campo ligante e efeito Jahn-Teller em Mn(III). (Roat-Malone, 2002a).....	21
Figura 3. Fotossistema II (em destaque o centro gerador de oxigênio).....	23
Figura 4. Fórmula geral dos complexos com ligante do tipo salen, onde M = Mn. (Doctrow, Huffman <i>et al.</i> , 2002) .....	26
Figura 5. Mecanismos de transporte de manganês através da barreira hemato-encefálica para níveis fisiológicos de Mn(II) e Mn(III). O tamanho das setas está relacionado à importância relativa de cada transportador. Observa-se maior captação de Mn(II) que Mn(III), especialmente pela proteína DMT-1. Albumina não consegue atravessar a BHE devido ao seu tamanho. (Aschner, Guilarte <i>et al.</i> , 2007). ....	29
Figura 6. Concentração de Mn(II) (A) e de Mn(III) (B) no cérebro (GP = globo pálido; Str = estriato; Th = Tálamo; Cx = Córtex). Em ambos os gráficos, as diferenças entre as doses de Mn são extremamente significantes, mas não entre e as regiões do cérebro.(Reaney, Bench <i>et al.</i> , 2006).....	30
Figura 7. [Mn] no sangue x [Mn] no cérebro. Foi calculada a média da [Mn] no cérebro com base nas concentrações encontradas nas diferentes áreas deste órgão. Mn(II) é representado pelo triângulo invertido e Mn(III) pelo quadrado.(Reaney, Bench <i>et al.</i> , 2006).....	30
Auto-oxidação da DA catalisada por Mn(III).....	33
Iniciação: .....	33
Propagação: .....	33
Terminação: .....	33
Figura 8. Estrutura da dopamina (A) e da quinona formada a partir da sua oxidação (B), seguida dos possíveis mecanismos para formação de B.....	33
Figura 9. Estrutura do ácido <i>p</i> -aminosalicílico. Seus grupos hidroxila e carboxila são considerados excelentes ligantes para manganês. ....	35
Figura 10. Estruturas da tirosina (A) e da ditirosina (B). ....	37
Figura 11. Estruturas da DHR (A) e de seu produto fluorescente de oxidação, a Rodamina (B). ....	39
Figura 12. Medidas de absorvância dos complexos com PAS em proporção molar 1 : 1. ....	55

Figura 13. Medidas de absorvância dos complexos em tampão citossólico. ....	57
Figura 14. Medidas de absorvância dos complexos com PAS em proporção molar 1 : 1 em tampão citossólico. ....	57
Figura 15. Comparativo do efeito dos tratamentos sobre $k_{obs}$ . ....	59
Figura 16. Comparativo das intensidades de oxidação da DHR pelos complexos de amostras com e sem PAS.....	62
Figura 17. Comparativo das intensidades de oxidação da DHR 50 $\mu$ M pelos complexos 10 $\mu$ M em presença de $H_2O_2$ 50 $\mu$ M, na presença ou ausência de PAS.....	62
Figura 18. Espectro de emissão de fluorescência de Tyr com MnPPi (proporção molar = 1 : 1, com e sem peróxido de hidrogênio em mesma concentração) em meio ácido ( $\lambda_{exc}$ = 284 nm). ....	64
Figura 19. Espectro de emissão de fluorescência de Tyr com MnCit (proporção molar = 1 : 1, com e sem peróxido de hidrogênio em mesma concentração) em meio ácido ( $\lambda_{exc}$ = 284 nm). ....	65
Figura 20. Espectro de emissão de fluorescência de Tyr com EUK8 (proporção molar = 1 : 1, com e sem peróxido de hidrogênio em mesma concentração) em meio ácido ( $\lambda_{exc}$ = 284 nm). No detalhe: escala ampliada. ....	65
Figura 21. Espectro de emissão de fluorescência de tirosina com peróxido de hidrogênio (proporção molar = 1 : 1) em meio ácido ( $\lambda_{exc}$ = 284 nm). No detalhe: escala ampliada. ....	66
Figura 22. Concentração de carbonilas das amostras com albumina nativa (a) e com grupo tiol protegido (b) ( $p > 0,1$ ). ....	67
Figura 23. Comparativo do efeito da DA 500 $\mu$ M sobre $k_{obs}$ . Valores mais baixos de $k_{obs}$ indicam maior oxidação da DA. ....	69
Figura 24. Curvas dose-resposta (viabilidade celular) para os complexos de Mn(III) em CGC. ....	71
Figura 25. Viabilidade Celular em culturas HeLa frente ao MnCit. ....	73
Figura 26. Viabilidade Celular em culturas HeLa frente ao MnPPi.....	73
Figura 27. Viabilidade Celular em culturas HeLa frente ao EUK8.....	74
Figura 28. Viabilidade Celular de culturas HeLa estressadas e não estressadas frente aos complexos em níveis de EC50 (significância estatística por método ANOVA: * = significativamente diferentes comparadas ao controle não irradiado; A = significativamente diferentes comparadas ao controle irradiado com UVA). ....	77

Figura 29. Viabilidade Celular de culturas HeLa não estressadas frente aos precursores (Cit e Ac 2 mM; PPI 300 $\mu$ M) dos complexos (significância estatística por método ANOVA: $p > 0,1$ para todas as combinações) .....	78
Figura 30. Viabilidade Celular de culturas HeLa estressadas e não estressadas frente aos complexos em níveis de EC50 em presença de Asc 40 $\mu$ M (significância estatística por método ANOVA: * = significativamente diferentes comparadas ao controle sem ascorbato não irradiado; A = significativamente diferentes comparadas ao controle sem ascorbato irradiado com UVA; B = significativamente diferentes comparadas ao controle com ascorbato não irradiado).....	79
Figura 31. Comparativo entre valores de oxidação da DHR 50 $\mu$ M pelos complexos em níveis de EC50 com e sem ascorbato 40 $\mu$ M em meio DMEM.....	81
Figura 32. Viabilidade Celular de culturas HeLa estressadas e não estressadas frente aos complexos em níveis de EC50 em presença de NaPAS 200 $\mu$ M(significância estatística por método ANOVA: * = significativamente diferentes comparadas ao controle não irradiado; A = significativamente diferentes comparadas ao controle irradiado com UVA; B = significativamente diferentes comparadas ao controle irradiado com UVB).....	81
Figura A 1. Espectro na região do visível do MnCit em meio aquoso.....	91
Figura A 2. Espectro na região do visível do MnPPI em meio aquoso.....	91
Figura A 3. Espectro na região do visível do EUK8 em etanol. ....	92
Figura A 4. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu$ M por Mn(OAc) <sub>3</sub> 0 - 10 $\mu$ M.....	93
Figura A 5. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu$ M por MnCit 0 - 10 $\mu$ M. ....	93
Figura A 6. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu$ M por MnPPI 0 - 10 $\mu$ M.....	94
Figura A 7. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu$ M por EUK8 0 - 10 $\mu$ M.....	94
Figura A 8. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu$ M por Mn(OAc) <sub>3</sub> 0 - 10 $\mu$ M na presença de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 $\mu$ M.....	95
Figura A 9. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu$ M por MnCit 0 - 10 $\mu$ M na presença de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 $\mu$ M.....	95
Figura A 10. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu$ M por MnPPI 0 - 10 $\mu$ M na presença de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 $\mu$ M.....	96
Figura A 11. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu$ M por EUK8 0 - 10 $\mu$ M na presença de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 $\mu$ M.....	96

Figura A 12. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu\text{M}$ por $\text{Mn}(\text{OAc})_3$ 0 - 10 $\mu\text{M}$ na presença de ascorbato 40 $\mu\text{M}$ . .....	97
Figura A 13. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu\text{M}$ por $\text{MnCit}$ 0 - 10 $\mu\text{M}$ na presença de ascorbato 40 $\mu\text{M}$ . .....	97
Figura A 14. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu\text{M}$ por $\text{MnPPi}$ 0 - 10 $\mu\text{M}$ na presença de ascorbato 40 $\mu\text{M}$ . .....	98
Figura A 15. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu\text{M}$ por $\text{EUK8}$ 0 - 10 $\mu\text{M}$ na presença de ascorbato 40 $\mu\text{M}$ . .....	98
Figura A 16. Aceleração da oxidação da DHR 50 $\mu\text{M}$ pelos complexos. ....	99
Figura A 17. Aceleração da oxidação da DHR 50 $\mu\text{M}$ pelos complexos na presença de $\text{H}_2\text{O}_2$ 50 $\mu\text{M}$ . .....	99
Figura A 18. Aceleração da oxidação da DHR 50 $\mu\text{M}$ pelos complexos na presença de ascorbato 40 $\mu\text{M}$ . .....	100
Figura A 19. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu\text{M}$ por $\text{NaOAc}$ 0 – 100 $\mu\text{M}$ . ....	100
Figura A 20. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu\text{M}$ por $\text{Na}_3\text{Cit}$ 0 – 100 $\mu\text{M}$ . ....	101
Figura A 21. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu\text{M}$ por $\text{Na}_4\text{PPi}$ 0 – 100 $\mu\text{M}$ . ....	101
Figura A 22. Aceleração da oxidação da DHR 50 $\mu\text{M}$ pelos sais sódicos precursores dos complexos. ....	102
Figura A 23. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu\text{M}$ por $\text{Mn}(\text{OAc})_3$ 10 $\mu\text{M}$ na presença de $\text{PAS}$ 0 - 100 $\mu\text{M}$ . ....	102
Figura A 24. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu\text{M}$ por $\text{MnCit}$ 10 $\mu\text{M}$ na presença de $\text{PAS}$ 0 - 100 $\mu\text{M}$ . ....	103
Figura A 25. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu\text{M}$ por $\text{MnPPi}$ 10 $\mu\text{M}$ na presença de $\text{PAS}$ 0 - 100 $\mu\text{M}$ . ....	103
Figura A 26. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu\text{M}$ por $\text{EUK8}$ 10 $\mu\text{M}$ na presença de $\text{PAS}$ 0 - 100 $\mu\text{M}$ . ....	104
Figura A 27. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu\text{M}$ por $\text{Mn}(\text{OAc})_3$ 10 $\mu\text{M}$ na presença $\text{H}_2\text{O}_2$ 50 $\mu\text{M}$ e $\text{PAS}$ 0 - 100 $\mu\text{M}$ . ....	104
Figura A 28. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu\text{M}$ por $\text{MnCit}$ 10 $\mu\text{M}$ na presença $\text{H}_2\text{O}_2$ 50 $\mu\text{M}$ e $\text{PAS}$ 0 - 100 $\mu\text{M}$ . ....	105
Figura A 29. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu\text{M}$ por $\text{MnPPi}$ 10 $\mu\text{M}$ na presença $\text{H}_2\text{O}_2$ 50 $\mu\text{M}$ e $\text{PAS}$ 0 - 100 $\mu\text{M}$ . ....	105

Figura A 30. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu\text{M}$ por EUK8 10 $\mu\text{M}$ na presença $\text{H}_2\text{O}_2$ 50 $\mu\text{M}$ e PAS 0 - 100 $\mu\text{M}$ .	106
Figura A 31. Espectro de excitação ( $\lambda_{\text{emis}} = 406 \text{ nm}$ ) de soluções ácida e básica de tirosina 1 mM e de ditirosina gerada a partir de soluções de tirosina 1 mM reagida com acetato de Mn(III).	106
Figura A 32. Luminescência de soluções de DA 500 $\mu\text{M}$ com e sem $\text{MnSO}_4$ .	107
Figura A 33. Luminescência de soluções de DA 500 $\mu\text{M}$ com e sem MnPPi.	107
Figura A 34. Luminescência de soluções de DA 500 $\mu\text{M}$ com e sem MnCit.	108
Figura A 35. Luminescência de soluções de DA 500 $\mu\text{M}$ com e sem EUK8.	108
Figura A 36. Luminescência de soluções de DA 500 $\mu\text{M}$ com e sem peróxido de hidrogênio.	109
Figura A 37. Absorbância das soluções de DA 500 $\mu\text{M}$ com e sem os complexos ( $\lambda = 350 \text{ nm}$ ) após 2 horas.	109
Figura A 38. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu\text{M}$ por $\text{MnSO}_4$ 0 - 20 $\mu\text{M}$ na ausência de DA 500 $\mu\text{M}$ .	110
Figura A 39. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu\text{M}$ por EUK8 0 - 20 $\mu\text{M}$ na ausência de DA 500 $\mu\text{M}$ .	110
Figura A 40. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu\text{M}$ por MnCit 0 - 20 $\mu\text{M}$ na ausência de DA 500 $\mu\text{M}$ .	111
Figura A 41. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu\text{M}$ por MnPPi 0 - 20 $\mu\text{M}$ na ausência de DA 500 $\mu\text{M}$ .	111
Figura A 42. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu\text{M}$ por $\text{MnSO}_4$ 0 - 20 $\mu\text{M}$ na presença de DA 500 $\mu\text{M}$ .	112
Figura A 43. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu\text{M}$ por EUK8 0 - 20 $\mu\text{M}$ na presença de DA 500 $\mu\text{M}$ .	112
Figura A 44. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu\text{M}$ por MnCit 0 - 20 $\mu\text{M}$ na presença de DA 500 $\mu\text{M}$ .	113
Figura A 45. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu\text{M}$ por MnPPi 0 - 20 $\mu\text{M}$ na presença de DA 500 $\mu\text{M}$ .	113
Figura A 46. Aceleração da oxidação da DHR 50 $\mu\text{M}$ pelos complexos na presença e ausência de DA 500 $\mu\text{M}$ .	114



Figura A 47. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu$ M pelos complexos com e sem ascorbato 40 $\mu$ M em meio DMEM não irradiado.....	114
Figura A 48. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu$ M pelos complexos com e sem ascorbato 40 $\mu$ M em meio DMEM irradiado com UVA.....	115
Figura A 49. Velocidade de oxidação da DHR 50 $\mu$ M pelos complexos com e sem ascorbato 40 $\mu$ M em meio DMEM irradiado com UVB.....	115

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Log P dos complexos.....	54
Tabela 2. EC50 em CGC para espécies de Mn(III).....	71
Tabela 3. EC50 em HeLa para espécies de Mn(III). ....	74
Tabela A 1. Análise elementar do complexo EUK8. ....	92

# Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
1.1	MANGANÊS.....	20
1.2	QUÍMICA BIOINORGÂNICA DO MANGANÊS .....	22
1.3	TOXICIDADE DO MANGANÊS.....	27
1.4	TRATAMENTO DA TOXICIDADE DO MN .....	34
1.5	MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS.....	36
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>40</b>
2.1	GERAIS .....	40
2.2	ESPECÍFICOS.....	40
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
3.1	MATERIAIS .....	41
3.1.1	<i>Solventes e Reagentes</i> .....	41
3.1.2	<i>Equipamentos e outros materiais</i> .....	42
3.2	MÉTODOS .....	44
3.2.1	<i>Síntese e caracterização dos complexos</i> .....	44
3.2.2	<i>Lipofilicidade dos complexos</i> .....	46
3.2.3	<i>Estabilidade dos complexos frente aos p-aminosalicilato de sódio (NaPAS)</i> .....	47
3.2.4	<i>Capacidade pró-oxidante dos complexos</i> .....	47
3.2.5	<i>Danos oxidativos sobre biomoléculas</i> .....	48
3.2.6	<i>Testes biológicos</i> .....	51
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>54</b>
4.1	LIPOFILICIDADE DOS COMPLEXOS .....	54
4.2	ESTABILIDADE DOS COMPLEXOS FRENTE AO PAS .....	54

<b>4.3</b>	<b>CAPACIDADE PRÓ-OXIDANTE DOS COMPLEXOS.....</b>	<b>58</b>
<b>4.4</b>	<b>DANOS OXIDATIVOS SOBRE BIOMOLÉCULAS.....</b>	<b>63</b>
<b>4.5</b>	<b>TESTES BIOLÓGICOS.....</b>	<b>70</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>82</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>ANEXO I: GRÁFICOS E TABELAS.....</b>	<b>91</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Manganês

O manganês é um metal de transição com massa atômica 55 e configuração eletrônica  $[\text{Ar}]4s^23d^5$  ( $Z = 25$ ). Foi isolado pela primeira vez, por redução de  $\text{MnO}_2$  com carvão, pelo químico sueco Johan Gottlieb Gahn, em 1774. Observa-se pelo diagrama de Frost (**Figura 1**), que o manganês pode ter oito estados de oxidação, doando no máximo sete elétrons. O diagrama de Frost representa qualitativamente a estabilidade relativa dos estados de oxidação de um dado elemento, através do gráfico de  $nE^0$  em função do número de oxidação. Assim, é coerente que, em sistemas biológicos as espécies de manganês mais encontradas sejam Mn(II), Mn(III) e Mn(IV) (Brown, 2006), sendo Mn(II) e Mn(IV) as mais estáveis, visto que Mn(III) desproporciona-se rapidamente em meio oxidante e neutro ( $\text{pH} \approx 7$ ), na ausência de um sistema de ligantes que o estabilize em solução, conforme mostrado por equações obtidas através do diagrama de Latimer (**Esquema I**) (Arndt, 2009a).

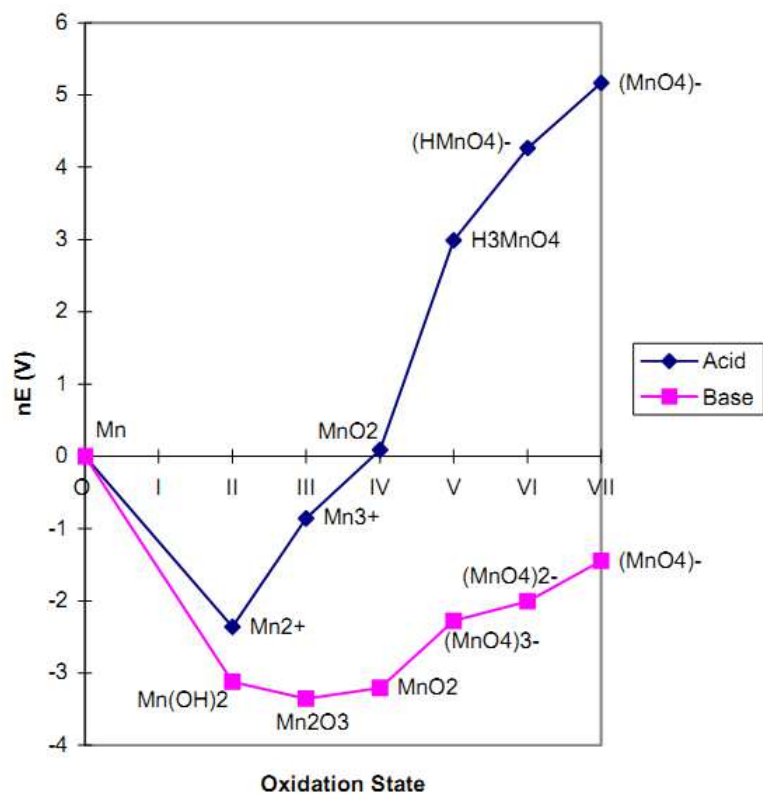
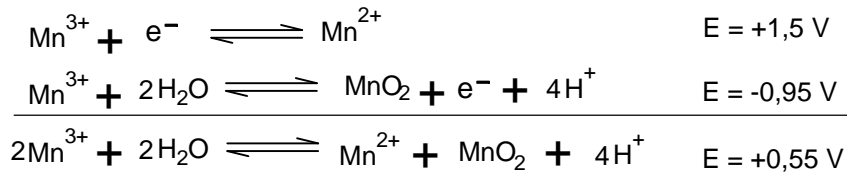


Figura 1. Diagrama de Frost para o manganês.



(Esquema I)

Ambos Mn(II) ( $3d^5$ ) e Mn(III) ( $3d^4$ ) têm número de coordenação igual a 6, entretanto, o primeiro tende a formar complexos octaédricos, enquanto que o último é mais encontrados em compostos de coordenação tetragonais devido à distorção na estrutura pelo efeito Jahn-Teller (**Figura 2**) (Roat-Malone, 2002a).

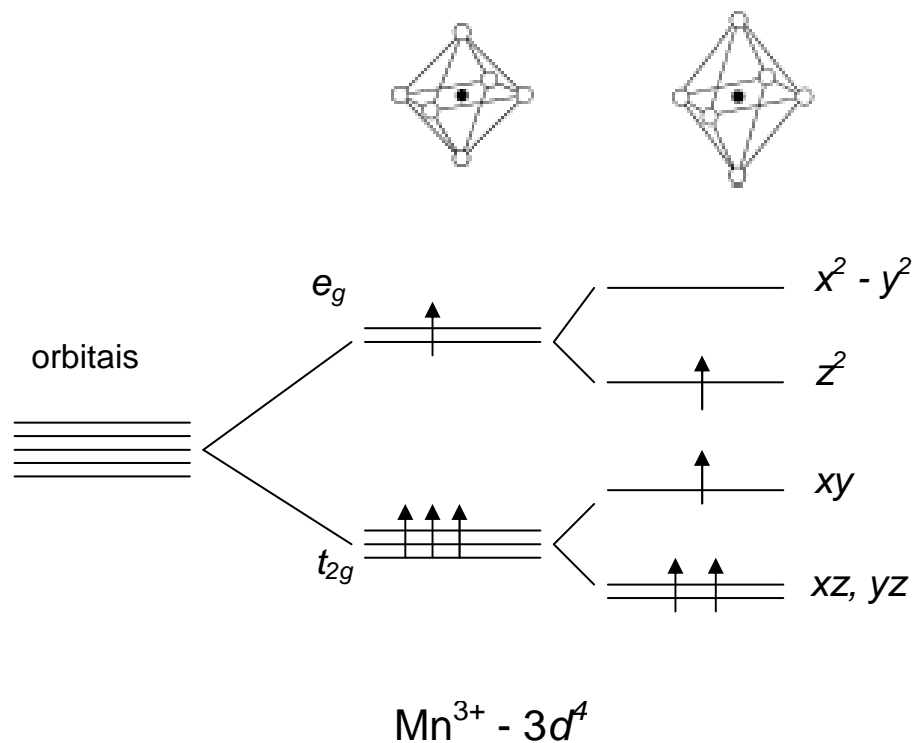


Figura 2. Energias de estabilização do campo ligante e efeito Jahn-Teller em Mn(III). (Roat-Malone, 2002a)

O manganês é largamente distribuído no solo, e seu dióxido, conhecido como pirolusita, é a forma mais comumente encontrada em minérios, dos quais a maior parte do manganês é obtida no Brasil, Ucrânia, Austrália, África do Sul, Gabão, China e Índia.  $\text{MnO}_2$  é utilizado

como despolarizador em baterias e como “descolorizador” em vidros, que são naturalmente verdes devido à impurezas de ferro (Lide, 2006-2007), mas a principal aplicação do manganês é na indústria do aço, onde é usado para proporcionar maior dureza à liga ferro-carbono (Santos, Milatovic *et al.*, 2010). O Mn também é usado na forma de um organometálico conhecido como metilciclopentadienil tricarbonil manganês (MMT), um aditivo antidetonante da gasolina que também tem como função melhorar a octanagem do combustível. Aliás, esse composto é uma fonte de Mn para a atmosfera, visto que emite material particulado contendo principalmente  $Mn_3O_4$ ,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  e  $Mn_5(PO_4)[PO_3^-(OH)]_2 \cdot 4H_2O$  (Ressler, Wong *et al.*, 2000), e vale mencionar que 99 % das partículas emitidas é respirável ( $< 5 \mu m$ ) e 86 % é menor que  $1 \mu m$  (Joly, Lambert *et al.*, 2009), ou seja, podem penetrar os pulmões e alcançar a região alveolar, a partir de onde passarão para outros órgãos sem serem processados pelo fígado.

## 1.2 Química Bioinorgânica do Manganês

Muitas espécies de manganês, principalmente óxidos, são encontradas na crosta terrestre, e, por meio de lixiviação do material rochoso no leito de corpos d'água, são dissolvidos na fase aquosa, e, portanto, tais espécies são abundantes em rios e lagos. O manganês também é encontrado em muitos vegetais, já que faz parte do fotossistema II, responsável pela evolução do oxigênio durante a fotossíntese (**Figura 3**). Dessa forma, manganês pode ser ingerido através da água e/ou de alimentos.

No fotossistema II, o OEC (oxygen-evolving complex) é a enzima composta por quatro monômeros de Mn(II) hexacoordenados responsável pela evolução do oxigênio, ou seja, pela reação redox que converte água em  $O_2$  e  $H^+$ . Nesse processo, duas moléculas de água se coordenam a dois Mn(II) da enzima, onde um elétron e um próton são removidos (um de cada vez) na primeira etapa e transferidos para a clorofila P680<sup>+</sup> por meio de um resíduo de tirosina. Isso se repete na segunda etapa, e o oxigênio formado é liberado em seguida, restaurando

a conformação inicial do complexo. A clorofila P680 é doador primário de elétrons para uma quinona envolvida no transporte de prótons e elétrons que mantém a força próton-motora e a síntese de ATP durante a fotossíntese, daí é gerada sua forma catiônica ( $P680^+$ ). O sítio ativo contendo Mn(II) é o principal responsável pela geração de oxigênio e manutenção de energia em vegetais, por isso OEC é uma enzima de grande importância, que atrai a atenção de muitos pesquisadores (Hoganson e Babcock, 1997).

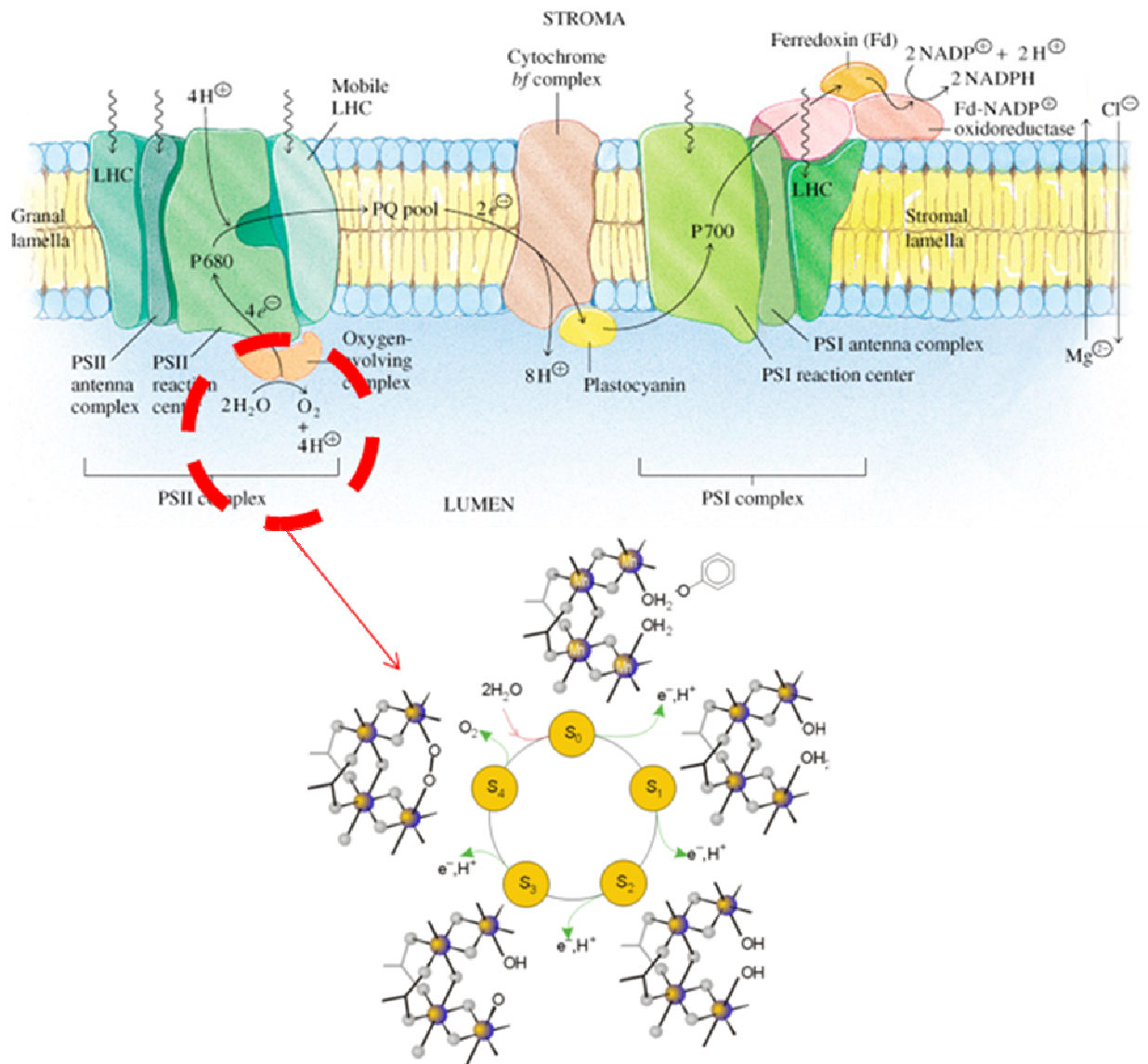


Figura 3. Fotossistema II (em destaque o centro gerador de oxigênio).

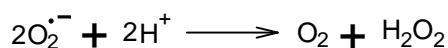


Manganês é um elemento traço essencial, cujo consumo recomendado na dieta é de 2-5 mg por dia e a regulação homeostática dos níveis de Mn é essencial para o funcionamento normal do organismo (Khalid, Aoun *et al.*, 2011). O tempo de meia-vida biológico do manganês em humanos é de 40 dias, sendo eliminado na bile e excretado nas fezes (somente 5 % é eliminado através da urina) (Nowak, Bojanek *et al.*, 2010). A falta desse elemento já foi relacionada a problemas de fertilidade, deficiências de nascimento, capacidade mental afetada e formação prejudicada dos ossos (Khalid, Aoun *et al.*, 2011).

Além de ser importante para muitas enzimas do cérebro, como, por exemplo, a glutamina sintetase (GS) (Crossgrove, Allen *et al.*, 2003), manganês é co-fator da superóxido dismutase mitocondrial (SOD2), enzima antioxidante responsável pela dismutação do ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), formado normalmente na respiração celular e anormalmente em casos de inflamações agudas ou crônicas (Freeland-Graves, Bose *et al.*, 2005). A SOD contendo Cu e Zn é encontrada no citossol (SOD1) ou no meio extracelular (SOD3), porém somente a ausência da SOD2 se mostrou letal em experimentos com camundongos (Salvemini, Muscoli *et al.*, 2002; Simon, 2002; Muscoli, Cuzzocrea *et al.*, 2003).

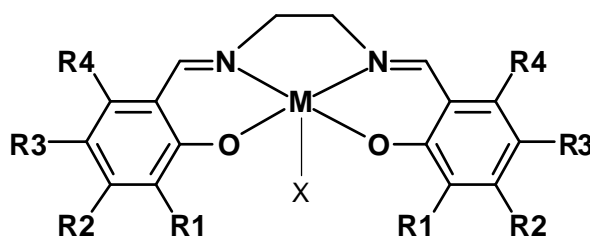
A SOD1 bovina era comumente usada em terapias antioxidantes, mas provocava problemas imunológicos devido à sua origem não humana. Por isso, recentemente se tem mostrado muito interesse no desenvolvimento de miméticos funcionais da enzima como possíveis substitutos, visto que compostos de menor peso molecular superaríamos algumas limitações associada ao uso da SOD1 de origem animal (Doctrow, Huffman *et al.*, 2002; Muscoli, Cuzzocrea *et al.*, 2003). Além disso, miméticos da SOD não devem reagir com  $H_2O_2$ , produto da dismutação do superóxido (**Esquema II**), e é necessário que o metal complexado seja estável e atóxico. Dessa forma, manganês é visto como a melhor escolha, já que possui menor toxicidade e reatividade com peróxido de hidrogênio, quando comparado a cobre e ferro (Roat-Malone, 2002a), pois sabe-se que estes metais catalizam reações do tipo Fenton, gerando ra-

dical hidroxila. Observa-se, então, mais uma vantagem do uso de miméticos compostos por Mn(III) – sítio ativo da SOD2 – sobre a SOD1 bovina, cujo sítio ativo é Cu/Zn.



(Esquema II)

Dentre os principais miméticos funcionais da SOD estão os complexos de Mn(III) com derivados de N,N'-bis(salicilaldeído)etilenodiamina (salen) (**Figura 4**), da família EUK (Doctrow, Huffman *et al.*, 2002). Esses compostos recebem a nomenclatura EUK-n, onde n é o número sequencial da empresa fabricante, a Eukarion (Arndt, 2009a), e apresentam boa eficiência como miméticos funcionais da SOD em modelos animais de desordens neurológicas (Roat-Malone, 2002b). Muitos desses complexos também mimetizam a ação da catalase, principalmente aqueles com grupos alcoxila nas posições R1 e R3 (**Figura 4**) (Doctrow, Huffman *et al.*, 2002).



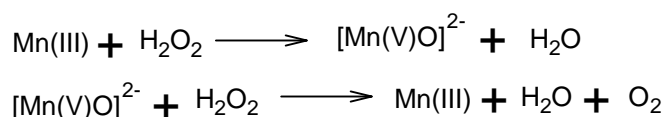
Composto	R1	R2	R3	R4	X
EUK8	H	H	H	H	Cl
EUK108	H	H	H	H	OAc
EUK122	F	H	H	H	Cl
EUK121	F	H	H	H	OAc
EUK15	H	H	OMe	H	Cl
EUK123	H	H	OMe	H	OAc
EUK134	OMe	H	H	H	Cl

<b>EUK113</b>	OMe	H	H	H	OAc
<b>EUK124</b>	H	OMe	H	OMe	Cl
<b>EUK118</b>	H	OMe	H	OMe	OAc
<b>EUK115</b>	H	OMe	H	H	Cl
<b>EUK114</b>	H	OMe	H	H	OAc
<b>EUK160</b>	OME	H	OMe	H	OAc
<b>EUK189</b>	OEt	H	H	H	OAc

Figura 4. Fórmula geral dos complexos com ligante do tipo salen, onde M = Mn. (Doctrow, Huffman *et al.*, 2002)

Alguns complexos de metais de transição com o ligante salen se ligam ao DNA promovendo sua cisão, tendo potencial atividade antitumoral (Routier, Cotelle *et al.*, 1996; Liu, Liao *et al.*, 2002; Verquin, Fontaine *et al.*, 2004). Vale mencionar ainda que, por causa da sua atividade antioxidante, compostos de Mn-salen são possíveis metalofármacos para terapia em casos onde a oncogênese é disparada por processos oxidativos (Doctrow, Huffman *et al.*, 2002).

Entretanto, como os compostos de Mn(III)-salen não são seletivos no sequestro de espécies reativas, em presença de peróxido de hidrogênio (**Esquema III**) (Verquin, Fontaine *et al.*, 2004), peroxinitrito e/ou  $\text{ClO}_4^-$  o complexo é oxidado a Mn(V)-oxo-salen, um potente oxidante que rapidamente transforma NO em  $\text{NO}_2$  e  $\text{NO}_2^-$  em  $\text{NO}_3^-$  (Muscoli, Cuzzocrea *et al.*, 2003). Assim, existe uma preocupação com a capacidade pró-oxidante desses complexos.



(*Esquema III*)

### 1.3 Toxicidade do Manganês

Embora seja um elemento essencial, existe uma preocupação com os potenciais efeitos neurotóxicos, v. p. ex. (Yokel, 2006), associados à exposição a excessivos níveis de manganês (Ljung e Vahter, 2007; Menezes-Filho, Paes *et al.*, 2009; Menezes, Bouchard *et al.*, 2009). Sua principal rota de absorção é através do trato gastrointestinal (Aschner e Aschner, 1991), porém a intoxicação por via oral é rara, pois o manganês é submetido à regulação homeostática no fígado (Benedetto, Au *et al.*, 2009; Boyes, 2010). A importância do fígado na homeostase do manganês foi ressaltada pela observação de pacientes com cirrose, os quais acumulavam níveis anormais de manganês no cérebro (Winder, Salmon *et al.*, 2009), de onde é eliminado muito mais lentamente do que no resto do corpo (Nowak, Bojanek *et al.*, 2010).

O manganês também pode ser absorvido pela circulação pulmonar (circulação sangüínea que oxigena as células pulmonares), quando presente em material particulado, e daí segue à circulação sistêmica (circulação sangüínea que oxigena as células dos demais tecidos corporais) (Saric e Lucchini, 2007). Nesse caso, pode ser levado do pulmão diretamente para o cérebro, sem que haja homeostase, resultando em acúmulo e dano em áreas específicas desse órgão (Benedetto, Au *et al.*, 2009; Nong, Taylor *et al.*, 2009; Winder, Salmon *et al.*, 2009; Boyes, 2010), provocando uma síndrome conhecida como manganismo, cujos sintomas são semelhantes aos observados em indivíduos que sofrem da doença de Parkinson (PD). No primeiro estágio do manganismo, sintomas como dores de cabeça, hipersonia, psicose, irritabilidade, anorexia e apatia começam a aparecer. À medida que a doença progride, distúrbios de memória, atenção e concentração se manifestam, e, por fim, aparecem as deficiências motoras, tais como rigidez muscular, distonia e bradicinesia (Khalid, Aoun *et al.*, 2011).

Estudos sugerem que a concentração de Mn no cérebro é maior no gânglio basal, em especial na substância negra, mesma região afetada na PD (Gunter, Gerstner *et al.*, 2010; Ordoñez-Librado, Anaya-Martinez *et al.*, 2010). É importante ressaltar que, mesmo sendo

hereditária em grande parte dos casos, PD também pode ser adquirida em função da exposição a contaminantes ambientais, dentre os quais Mn aparece como um forte candidato (Benedetto, Au *et al.*, 2009), haja vista o fato de que essa doença acomete pessoas expostas a excesso de Mn, incluindo mineradores e usuários de fungicidas, como o Maneb® e Mancozeb®.

Os mecanismos de aquisição e transporte de Mn pela barreira hematoencefálica (BHE) não são totalmente compreendidos, em função da baixa concentração desse elemento nos tecidos (menor que  $1 \text{ mg.g}^{-1}$ ) (Brown, 2006). Porém, supõe-se que quando o metal está em sua forma livre,  $\text{Mn}^{2+}$ , ou ligado a alguns transportadores específicos, como transferrina (Tf), ou o transportador de metal divalente (DMT-1), ele tenha maior facilidade em cruzar essa barreira (**Figura 5**). O manganês também pode atravessar a BHE complexado com citrato ou por regiões não intactas da barreira (canais de escape). Evidências recentes implicam o papel de proteínas transportadoras da família ZIP no transporte de Mn, embora ainda não tenha sido determinada sua funcionalidade na BHE. Proteínas da família ZIP são comumente encontradas como transportadoras de metais divalentes; a ZIP8, em especial, mostrou ter bastante afinidade por Mn (Aschner, Guilarte *et al.*, 2007).

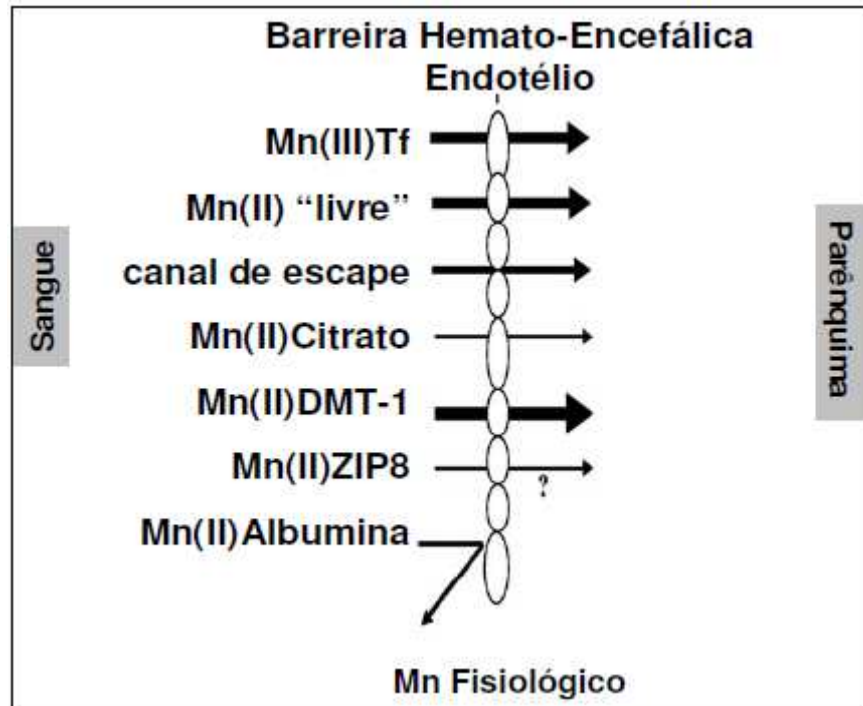


Figura 5. Mecanismos de transporte de manganês através da barreira hemato-encefálica para níveis fisiológicos de Mn(II) e Mn(III). O tamanho das setas está relacionado à importância relativa de cada transportador. Observa-se maior captação de Mn(II) que Mn(III), especialmente pela proteína DMT-1. Albumina não consegue atravessar a BHE devido ao seu tamanho. (Aschner, Guilarte *et al.*, 2007).

Embora haja mais transportadores para Mn(II), maiores concentrações de Mn(III) são acumuladas no cérebro (**Figura 6**). Além disso, exposição a Mn(III) causa maior efeito à homeostase do ferro que Mn(II), sugerindo que a toxicidade também varia conforme a especificação do Mn (Reaney, Bench *et al.*, 2006).

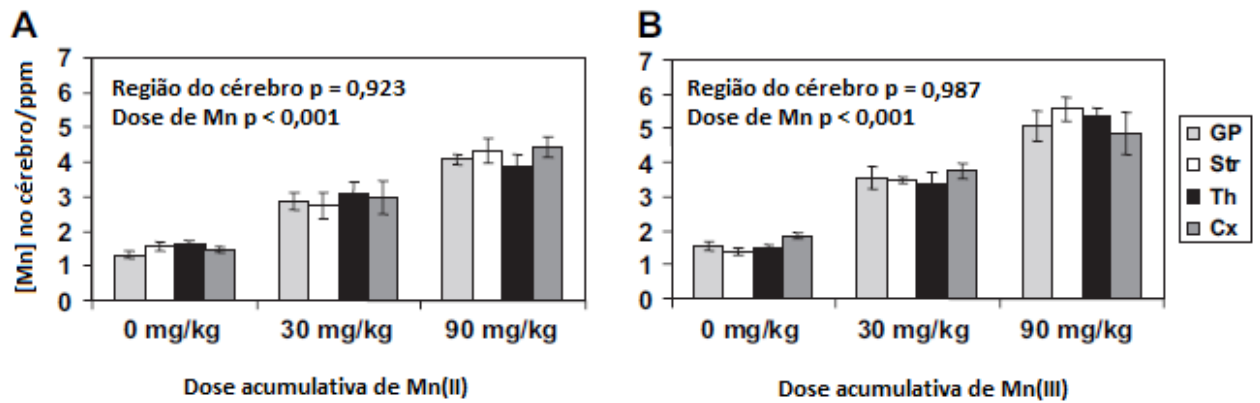


Figura 6. Concentração de Mn(II) (A) e de Mn(III) (B) no cérebro (GP = globo pálido; Str = estriato; Th = Tálamo; Cx = Córtex). Em ambos os gráficos, as diferenças entre as doses de Mn são extremamente significantes, mas não entre e as regiões do cérebro.(Reaney, Bench *et al.*, 2006).

Um estudo comparou as concentrações dessas duas espécies de manganês no sangue e no cérebro, concluindo que Mn(III) de fato se acumula mais no cérebro que Mn(II) (Figura 7) (Reaney, Bench *et al.*, 2006).

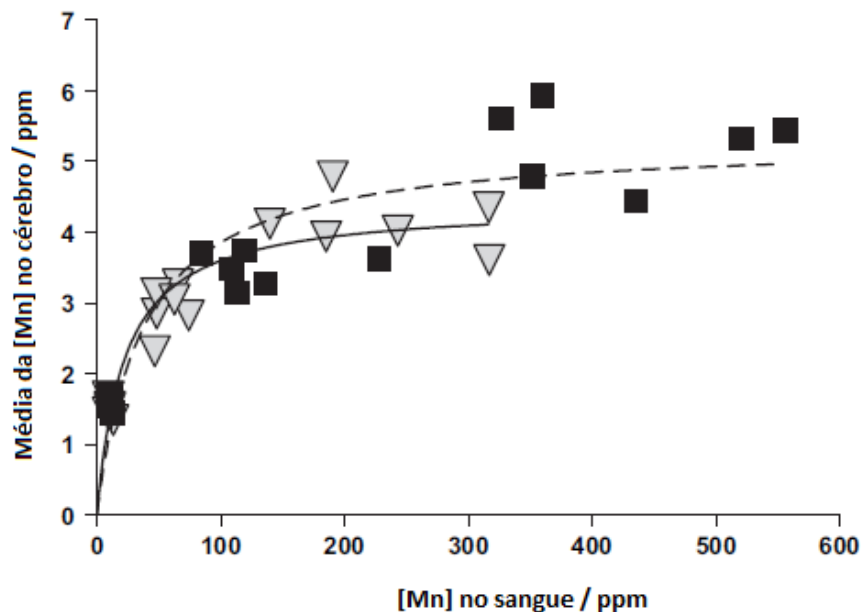
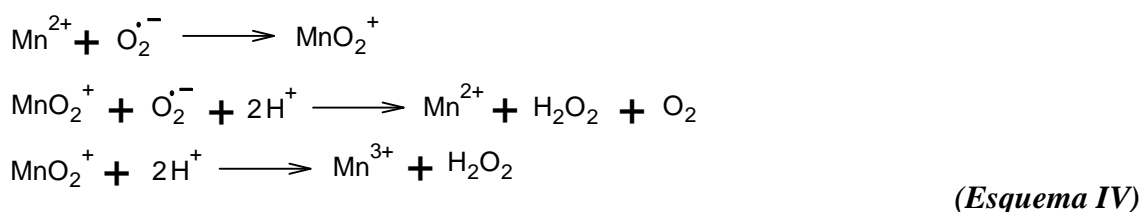
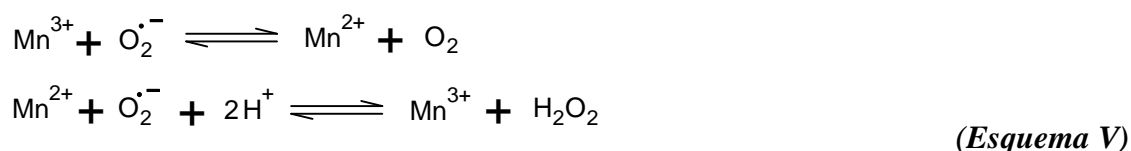


Figura 7. [Mn] no sangue x [Mn] no cérebro. Foi calculada a média da [Mn] no cérebro com base nas concentrações encontradas nas diferentes áreas deste órgão. Mn(II) é representado pelo triângulo invertido e Mn(III) pelo quadrado.(Reaney, Bench *et al.*, 2006).

A toxicidade do Mn(III) pode estar associada ao seu potencial de atuar como pró-oxidante, por exemplo, oxidando o ascorbato para o radical ascorbila, espécie bastante reativa capaz de promover danos oxidativos, ou como metal ativo em uma reação de Fenton. Já o  $\text{Mn}^{2+}$  é capaz de catalisar a dismutação do  $\text{O}_2^{\cdot-}$  para  $\text{H}_2\text{O}_2$ , de acordo com os ligantes presentes (por exemplo, polifosfatos), podendo gerar como produto final  $\text{Mn}^{3+}$  na ausência de mais superóxido no meio (**Esquema IV**) (Halliwell e Gutteridge, 2007).



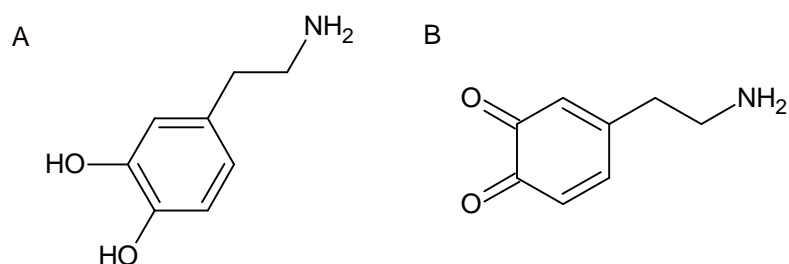
A enzima MnSOD atua com um mecanismo similar, mas o centro ativo da enzima contém o íon  $\text{Mn}^{3+}$  (**Esquema V**):

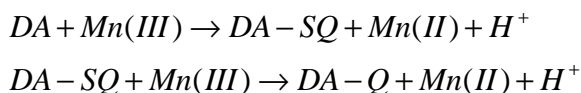
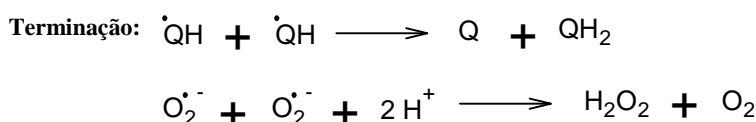
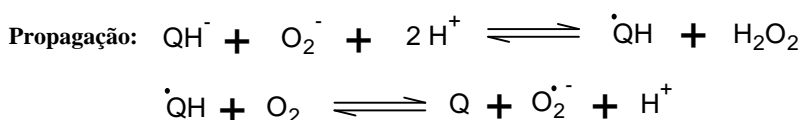
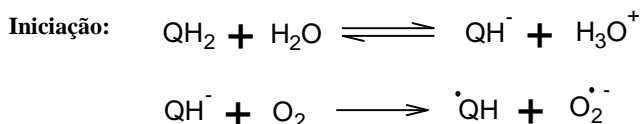


Os mecanismos de toxicidade do manganês não são bem conhecidos, mas sabe-se que tanto Mn(II) quanto Mn(III) são capazes de reagir com compostos carbonílicos contendo aminas como grupos funcionais, e, por isso, induzir auto-oxidação da dopamina (DA) (**Figura 8**), o que pode explicar a seletividade deste metal para neurônios dopaminérgicos (Benedetto, Au *et al.*, 2009), os quais são mais vulneráveis ao estresse oxidativo devido à sua baixa capacidade antioxidante, já que possuem baixos níveis de glutathione (Fang Zhao, Tongjian Cai *et al.*, 2009). No que se refere a danos causados ao sistema dopaminérgico, verificou-se ainda que



Mn provoca perda de tirosina hidroxilase (TH) (Fang Zhao, Tongjian Cai *et al.*, 2009; Ordoñez-Librado, Anaya-Martinez *et al.*, 2010), enzima responsável pela transformação da tirosina (Tyr) em L-DOPA, precursor da dopamina. Há vários relatos sobre possível interação entre Mn e um produto da oxidação da DA, a 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) (**Figura 8**), sugerindo que Mn intensifica o efeito neurotóxico deste composto. A 6-OHDA é acumulada nos nervos dopaminérgicos com auxílio da proteína transportadora de DA, e, depois, produz espécies radiculares de oxigênio, as quais induzem danos aos neurônios dopaminérgicos (Nowak, Bojanek *et al.*, 2010). Outros estudos mostraram a variação nos níveis do receptor de DA D2 em células tratadas com manganês, mas algumas pesquisas resultaram em aumento da concentração do receptor, enquanto que em outras, diminuição (Khalid, Aoun *et al.*, 2011). O trabalho de Khalid et al. mostra efeito no transporte da dopamina provocado pelo MnCl<sub>2</sub>, além da não existência da relação tempo-dependente dos danos sobre DA e exposição subaguda ao Mn, mas, 7 dias após a exposição, os níveis de DA diminuíram significativamente (Khalid, Aoun *et al.*, 2011). Zhao sugere que efeitos do Mn sobre o sistema dopaminérgico ocorrem via ativação da microglia, célula responsável pela defesa do sistema nervoso. A concentração de microglia na substância negra é quatro vezes e meia maior que no resto do cérebro, daí a maior vulnerabilidade dessa região (Fang Zhao, Tongjian Cai *et al.*, 2009).



**Oxidação da DA por Mn(III)****Auto-oxidação da DA catalisada por Mn(III)**

**Figura 8.** Estrutura da dopamina (A) e da quinona formada a partir da sua oxidação (B), seguida dos possíveis mecanismos para formação de B.

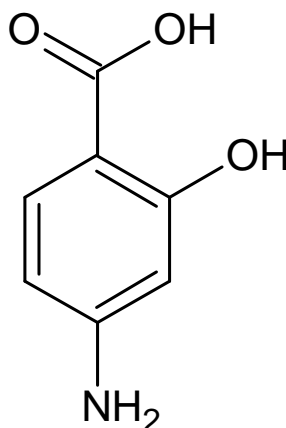
Dentre outros mecanismos propostos, um dos mais discutidos é o aumento da atividade da caspase-3 de forma dose-dependente em células tratadas com espécies de manganês, sugerindo indução de apoptose, ocorrendo ainda diminuição na concentração de glutathione (GSH) e de outros tióis, com conseqüente aumento da quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células estudadas (Park e Park, 2010). Há ainda a hipótese de inibição da síntese de ATP (Gunter, Gerstner *et al.*, 2010; Ordoñez-Librado, Anaya-Martinez *et al.*, 2010; Santos, Milatovic *et al.*, 2010), afetando enzimas responsáveis por sinais excitatórios e inibitórios no gânglio basal e levando à interrupção das funções normais. De fato, foi constatado que o manganês afeta a produção de ATP via fosforilação oxidativa por inibição de vários sítios, principalmente os de  $Ca^{2+}$  (Gunter, Gerstner *et al.*, 2010).

Os efeitos da toxicidade do manganês são considerados irreversíveis, podendo continuar progredindo mesmo após interrupção da exposição ao metal (Nong, Taylor *et al.*, 2009; Gunter, Gerstner *et al.*, 2010). Entretanto, um estudo feito com trabalhadores de minas mostrou que, após cessar a exposição, houve melhora na coordenação motora, ainda que a firmeza da mão e o tempo de resposta visual tenham permanecido afetados (Nong, Taylor *et al.*, 2009).

Baseando-se nas informações de toxicidade de manganês, as agências governamentais estipulam valores limites a que podemos estar expostos. Em água potável, a Organização Mundial de Saúde considera o limite de 0,5 mg/L de manganês suficiente para proteger a saúde humana (Who, 2006), a Agência de Proteção Ambiental dos EUA estipula o valor de 0,05mg/L (Us-Epa, 2003), enquanto o Ministério da Saúde brasileiro estipula o limite de 0,1 mg/L (Saúde, 2004).

#### **1.4 Tratamento da toxicidade do Mn**

Ácido *p*-aminosalicílico (PASH) (**Figura 9**) é considerado um potencial agente quelante para o manganês devido aos seus grupos hidroxila e carboxila, excelentes ligantes para o metal. Seu sucesso clínico em dois casos de manganismo foi relatado pela primeira vez por Ky e colaboradores em 1992, e quando administrado em animais intoxicados por manganês, o quelante mobilizou o metal e aumentou suas concentrações excretadas nas fezes (Nelson, Huggins *et al.*, 2010). É um fármaco bem conhecido, administrado há muitos anos como medicamento para tuberculose, mas seu mecanismo de ação contra o manganês não é bem conhecido, pois há dúvidas se ele atua como antiinflamatório ou como agente quelante (Lougheed, Taylor *et al.*, 2009; Nelson, Huggins *et al.*, 2010; Hong, Jiang *et al.*, 2011; Yoon, Lee *et al.*, 2011).



**Figura 9.** Estrutura do ácido *p*-aminosalicílico. Seus grupos hidroxila e carboxila são considerados excelentes ligantes para manganês.

Um estudo comparou a ação do PASH com EDTA e ácido acetilsalicílico (AAS) na inibição dos efeitos do manganês sobre o sistema dopaminérgico. Os efeitos do PASH foram mais semelhantes àqueles observados com o EDTA do que aos verificados com AAS, concluindo assim que o *p*-aminosalicilato age como quelante (Nelson, Huggins *et al.*, 2010; Hong, Jiang *et al.*, 2011).

Pesquisas feitas por Hong e colaboradores mostraram que, uma vez na corrente sanguínea, o PASH é rapidamente eliminado do plasma e entra no fluido cefalorraquidiano (CSF), cerebelo e tálamo. A maioria das moléculas do ácido permanece na forma livre, tanto no plasma quanto no cérebro. Depois, o quelante é metabolizado, convertido em ácido *N*-acetil-*p*-aminosalicílico (*N*-AcPASH), o qual pode ser um quelante melhor para manganês devido ao grupo carboxílico a mais na estrutura e alcança concentrações no cérebro maiores que o próprio PASH, possivelmente por ser mais lipofílico e conseguir atravessar por difusão a BHE mais facilmente. As concentrações de ácido *p*-aminosalicílico e de seu metabólito mostraram associação com sua eficácia contra manganês, ou seja, elevados níveis de PASH no plasma se mostraram mais eficientes no tratamento contra intoxicação por manganês, pois, devido ao baixo tempo de meia vida do ligante no organismo, em baixas concentrações não há PASH

suficiente para atravessar a BHE e alcançar as regiões afetadas do cérebro (Hong, Jiang *et al.*, 2011).

Todavia, deve-se ressaltar que a maioria dos estudos foram feitos com sais simples de Mn(II) e pouco se sabe sobre a ação do PAS em espécies de Mn(III).

### 1.5 Marcadores de danos oxidativos

A maioria dos mecanismos propostos para a neurotoxicidade do manganês envolve oxidação de biomoléculas e, portanto, é importante mencionar os principais marcadores desse efeito no organismo. Por exemplo, espécies oxidantes podem promover alterações na estrutura de muitas biomoléculas, como é o caso da carbonilação de proteínas. Assim, a determinação dos níveis de carbonila é usada como índice de extensão do dano oxidativo nessas macromoléculas (Pirinccioglu, Gokalp *et al.*, 2010). A carbonilação de proteínas é definida como uma modificação não enzimática e irreversível da proteína que envolve a introdução de grupos carbonílicos em sua estrutura induzida por estresse oxidativo (Baltacioglu, Akalin *et al.*, 2008). Os mecanismos responsáveis por isso não estão totalmente esclarecidos, mas podem-se citar quatro vias diferentes, dentre as quais a principal seria a oxidação direta das cadeias laterais de lisina, treonina, arginina e prolina. Outras possibilidades incluem a glicação não enzimática na presença de açúcares redutores, a quebra oxidativa da cadeia peptídica via  $\alpha$ -amidação ou pela oxidação de glutamila nas cadeias laterais, e ligação covalente de compostos carbonílicos não protéicos (Mario, 2011).

Mudanças em estrutura de proteínas também ocorrem quando dois resíduos do mesmo aminoácido se ligam covalentemente, produzindo o seu dímero. É o caso da tirosina (**Figura 10**), cujos grupos fenólicos podem sofrer ataque de espécies oxidantes, formando a ditirosina (diTyr) (**Figura 10**), um excelente biomarcador de estresse oxidativo (Ueno, Horio *et al.*, 2002).

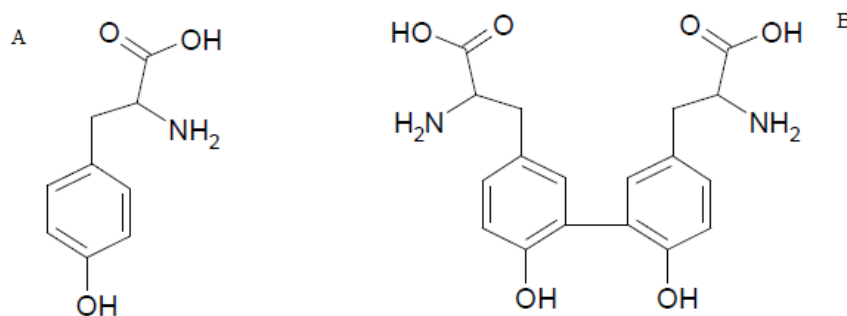
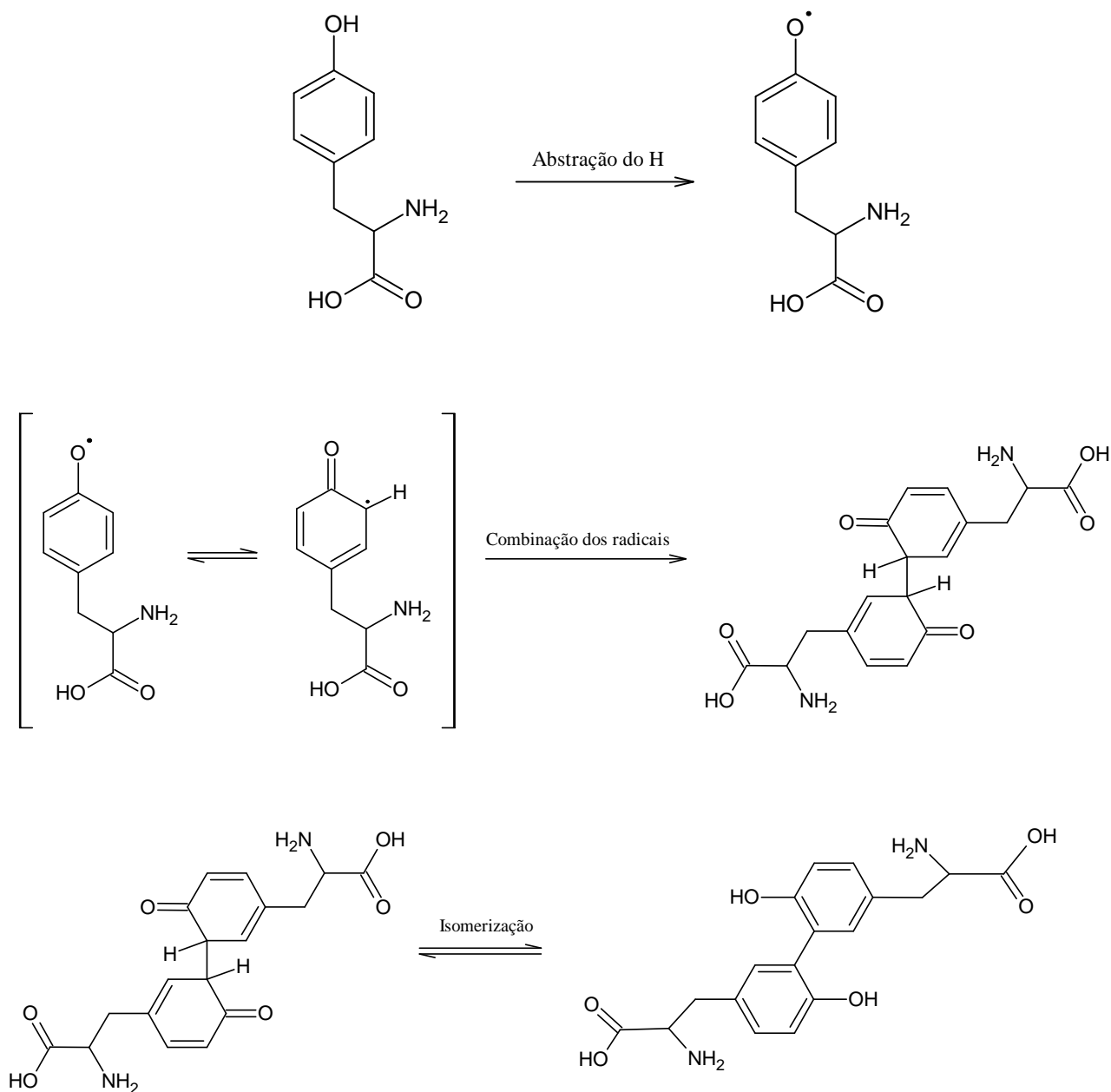


Figura 10. Estruturas da tirosina (A) e da ditirosina (B).

A primeira etapa para a dimerização da tirosina envolve a formação do radical tirosila, e o potencial de redução positivo do par  $\text{TyrO}^\bullet/\text{TyrOH}$  (+0,88 V – SHE) indica que é necessário espécies altamente oxidantes para que a reação seja termodinamicamente favorável. Uma vez formada a espécie radicalar por abstração de um hidrogênio da tirosina, duas tirosilas se combinam, formando um dímero, e sofrem isomerização (transformando o grupo carboxílico em fenol), produzindo a ditirosina (**Esquema VI**) (Giulivi, Traaseth *et al.*, 2003). A abstração de hidrogênio pode ser feita por espécies como radical hidroxila, peroxinitrito, ou outras espécies radicalares. Os radicais tirosila resultantes se unem por ligação intermolecular (formada pelos elétrons desemparelhados de cada espécie), e por fim, um equilíbrio entre as espécies cetona e fenol no anel aromático (a isomerização) resulta na ditirosina.



(Esquema VI)

Outro método bastante utilizado para verificar se um composto é capaz de provocar estresse oxidativo é o teste com sondas fluorescentes, como a dihidrorodamina 123 (DHR) (**Figura 11**), que é pouco seletiva para espécies reativas formadas no meio (Glebska e Koppenol, 2003; Wrona, Patel *et al.*, 2005), e, portanto, facilmente oxidada para o fluoróforo rodamina 123 (**Figura 11**) (Wilhelm, Vytášek *et al.*, 2009). Outros trabalhos demonstraram que a

DHR é convertida em sua forma fluorescente de maneira tempo-dependente sob ação de espécies oxidantes (Espósito, Breuer *et al.*, 2002). Dessa forma, é possível acompanhar a oxidação da sonda acompanhando a emissão de fluorescência em função do tempo.

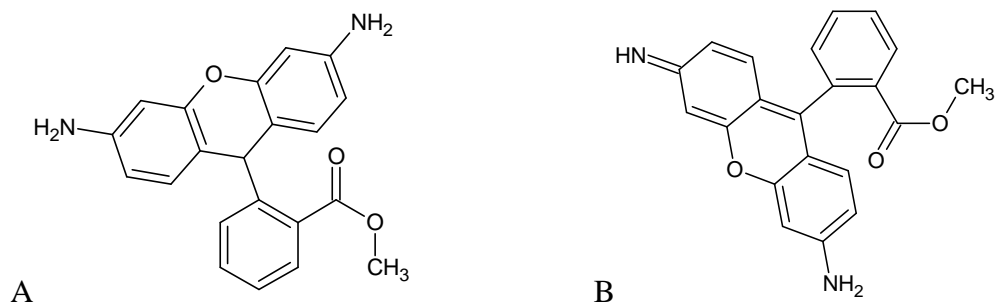


Figura 11. Estruturas da DHR (A) e de seu produto fluorescente de oxidação, a Rodamina (B).



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Gerais

Testes de neurotoxicidade e de avaliação de riscos bioquímicos por estresse oxidativo iniciados por manganês são normalmente realizados utilizando-se sais simples de Mn(II), como  $\text{MnCl}_2$  ou  $\text{MnSO}_4$ , por exemplo (Migheli, Godani *et al.*, 1999; Serra, Esposito *et al.*, 2000), o que não permite avaliar o efeito de espécies complexas bem definidas do metal, ou ainda o efeito das espécies da forma trivalente redox-ativa, Mn(III). Portanto, neste projeto, sugere-se colaborar para o preenchimento dessa lacuna. Ademais, conforme foi discutido, citrato é um dos principais transportadores de manganês através da BHE, e miméticos da SOD2 com ligante salen podem reagir com  $\text{H}_2\text{O}_2$  e formar espécies oxidantes fortes, o que torna interessante o estudo de complexos de Mn(III) com tais ligantes.

### 2.2 Específicos

- A. Síntese de complexos de Mn(III) com bases de Schiff, citrato e pirofosfato.
- B. Estudo da ação pró-oxidante desses complexos em função da concentração de peróxido de hidrogênio através da sonda fluorimétrica 1, 2, 3-dihidrorodamina.
- C. Estudo da ação pró-oxidante sobre tirosina, dopamina e albumina bovina em função da concentração de peróxido de hidrogênio.
- D. Estudo da citotoxicidade frente a linhagens de células em condição de estresse, e verificação do efeito de um quelantes (PAS) e de um antioxidante (ascorbato).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

##### 3.1.1 Solventes e Reagentes

Etanol (P.A. Merck, 99,8 %); éter etílico (Aldrich, 99 %); citrato de sódio tribásico (P.A. Cromoline química fina, 99 %); pirofosfato de sódio decahidratado (Sigma-Aldrich, 99%); acetato de manganês(II) tetrahidratado (P.A. Vetec, 99,5 %); acetato de Mn(III) dihidratado (Aldrich, 97 %); cloreto de potássio (P.A. Cromoline Química Fina, 99 %); chelex 100 forma sódica (Sigma-Aldrich); acetona (P.A. Synth, 99,5 %); sílica-gel azul (P.A. Synth); L-tirosina (Sigma-Aldrich, 98 %); peróxido de hidrogênio (P.A. Vetec, 30 %); HEPES sodium salt (Sigma, 99,5 % tritacion); DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F12, Sigma-Aldrich); NaCl (Aldrich, 98 %); DMSO (Synth, P. A.); tripsina (GIBCO); soro fetal bovino (Cultilab); formaldeído (Cromoline Química fina, P. A. 37 %); hidróxido de sódio (pellets, Sigma-Aldrich, 99,99 %); NaHCO<sub>3</sub> (Aldrich, 99,5 %); ácido p-aminobenzóico (Aldrich, 99 %); L-glutamina (Sigma, 99 %); albumina bovina (sigma-Aldrich, 98 %); Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (BioUltra, Sigma-Aldrich, 99 %); NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, ACS 98 %); HCl (Sigma, 36,5 – 38 %); CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, 93 %); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, ACS 98 %); MgSO<sub>4</sub> (cell culture tested, Sigma); Glicose (Aldrich, 96 %); K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Aldrich, 97 %); cloridrato de guanidina (Sigma-Aldrich); acetato de etila (Mallinkrodt chemicals); 2,4-dinitofenilhidrazina (Aldrich, 97 %); ácido tricloroacético (Aldrich, 99 %); *N*-etilmaleimida (Aldrich, 98 %); *p*-aminosalicilato de sódio (Aldrich); dihidrorodamina 123 (Sigma-Aldrich, 95 %); ácido ascórbico (Cromoline Química Fina, 99 %); dopamina (Aldrich) e luminol (Aldrich, 97 %) foram usados como recebidos. O tampão HBS (HEPES 20 mM; NaCl 150 mM; pH 7,4) foi tratado com Chelex (1 g/100 mL), e foi usado como solvente em todas as soluções neutras durante os experimentos. Soluções ácidas e básicas foram preparadas em água destilada. Em alguns testes foi utilizada uma solução de tampão citossólico,

para que houvesse maior semelhança com o meio fisiológico. Tal solução continha 5 mL da seguinte composição: KCl 100 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 5 mM; ATP-Na 2 mM; HEPES 10 mM; CaCl<sub>2</sub> 1 μM; MgSO<sub>4</sub> 1 mM e aminoácidos não-essenciais. Este último é composto por L-alanina 890 mg/L, L-asparagina 1.321 mg/L, L-ácido aspártico 1.330 mg/L, L-ácido glutâmico 1.470 mg/L, glicina 750 mg/L, L-prolina 1.150 mg/L, e serina 1.050 mg/L. No momento de uso, a essa solução acrescentava-se GHS (concentração final 5mM) e ascorbato de sódio (concentração final 50 μM), com pH ajustado para 7,2.

### 3.1.2 Equipamentos e outros materiais

- Toda a água utilizada nos experimentos foi purificada em um aparelho NANOpure UV, Barnstead/Thermolyne.
- Para soluções que deveriam ser filtradas fez-se uso de membranas Durapore (diâmetro do poro 0,45 μm), da Millipore.
- Espectros de FTIR foram registrados num espectrofotômetro Bomem MB100, em pastilhas de KBr, os de UV-vis em um Shimadzu UV-1700.
- As concentrações de Mn(III) nas soluções foram verificadas por medidas de absorção atômica em um equipamento com forno de grafite Shimadzu AA6300. Os espectros de fluorescência (excitação e emissão) foram obtidos a temperatura ambiente em um espectrofluorímetro SPEX-FLUOROLOG2 (controlado pelo programa computacional DM3000F) com monocromadores duplos SPEX 1680 utilizando uma lâmpada de Xenônio de 450 W como fonte de excitação. Os dados espectrais foram coletados em um ângulo de 22,5° (face frontal) e as fendas de excitação e de emissão foram utilizadas com aberturas entre 0,1 e 2,0 mm.
- Quando necessário evaporar solventes, foi utilizado um rota-evaporador Buchi, modelo R-210.

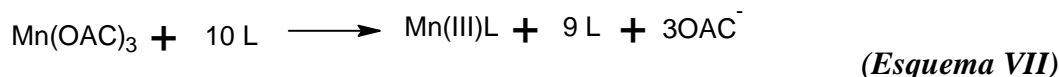
- O acompanhamento de viabilidade celular pelo método do MTT (v. abaixo) foi feito colorimetricamente em microplacas de 96 poços no equipamento Infinite M2000 (Tecan).
- Camundongos retirados do biotério com sete dias de vida foram eutanasiados para preparação da cultura primária de células de neurônios. A eutanásia foi realizada pelo aluno de pós-doutorado Raul Hernández, do laboratório da prof<sup>a</sup> Nadja Lardner.
- Leituras de fluorescência em microplacas foram feitas em um leitor BMG Fluorstar OPTIMA.
- Para leituras de luminescência foi usado um luminômetro de microplacas Tecan Infinite M200.
- Quando necessário, centrifugações foram conduzidas em uma centrífuga Minispin Plus, da Eppendorf.
- Células HeLa foram plaqueadas em placas multiwell de 12 poços da Hexis, enquanto que, para as culturas de neurônios e os demais experimento feitos em multiwell utilizou-se microplacas com 96 poços TestPlatte 96F da Zellkultur.
- Soluções usadas nos experimentos com cultura de células foram esterilizadas com filtros para seringa Sartorius Biotec.
- Células incubadas ficaram em uma estufa Sanyo Scientific CO<sub>2</sub> Incubator.
- Na contagem de células foi usado um microscópio Olympus IX51.
- Quando necessário, análises estatísticas foram feitas pelo software SigmaStat, versão 3.5, todas pelo método One Way ANOVA.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Síntese e caracterização dos complexos

#### 3.2.5.3 Citrato de Mn(III) (MnCit)

MnCit foi preparado conforme em (Parker, Sposito *et al.*, 2004), misturando 10 mL de citrato de sódio 10 mM em tampão HBS com 2,7 mg ( $1.10^{-5}$  mmol) de acetato de manganês(III). A mistura foi agitada até obter-se coloração amarelada, característica do MnCit<sub>(aq)</sub>. A reação de complexação ocorre conforme o **Esquema VII**, onde L representa o citrato (ligante), que foi adicionado em proporção 10:1 em relação ao Mn<sup>3+</sup>. A solução resultante foi submetida à medida de absorção no UV-vis para caracterização do complexo formado através do seu  $\lambda_{\max}$  (430 nm; **Figura A1 – Anexo I**), coerente com dados da literatura (Klewicki e Morgan, 1998). A concentração das soluções-estoque (10 mM) foi confirmada através de medidas de absorção atômica.



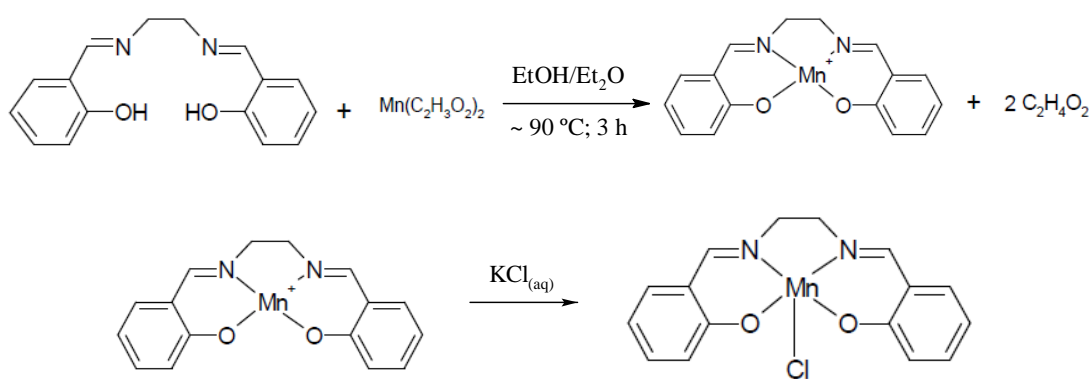
#### 3.2.5.3 Pirofosfato de Mn(III) (MnPPi)

Da mesma forma que o MnCit, o sal sódico do ligante foi misturado com Mn(OAc)<sub>3</sub>. 2,7 mg ( $1.10^{-5}$  mmol) de acetato de manganês(III) foi acrescentado a 10 mL de uma solução de pirofosfato de sódio 10 mM em tampão HBS. A mistura foi agitada até obter-se coloração rosada, própria do complexo desejado quando dissolvido em água. Este complexo também foi caracterizado através da medida de absorção, apresentando  $\lambda_{\max} = 474$  nm (**Figura A2 – Anexo I**), valor dentro de uma faixa aceitável em relação ao fornecido pela literatura (Klewicki e Morgan, 1998). A reação se dá como no **Esquema VII**, onde L é o pirofosfato, cuja quantidade usada foi o 10 vezes aquela de Mn(OAc)<sub>3</sub> a fim de garantir um bom rendimento da reação.

Medidas de absorção atômica para avaliar concentração de Mn(III) dos estoques tiveram resultados satisfatórios.

### 3.2.5.3 Salicilenodiamina de Mn(III) (EUK8)

A síntese do complexo EUK8 foi realizada conforme descrito por Boucher (L.J, 1974) e mostrado no **Esquema VIII**.



(*Esquema IX*)

Partiu-se de 1,07 g (4 mmol) do ligante salen dissolvido em uma mistura de etanol e éter etílico 1:1 (v/v) e 1,40 g (8 mmol) de acetato de Mn(II) e obteve-se 775 mg (rendimento de 54,35 %) de um sólido marrom bem escuro, que foi analisado por espectroscopia UV-vis e FT-IR com resultados coerentes com os fornecidos pela literatura (**Figura A3 – Anexo I**) (Arndt, 2009b). O primeiro foi obtido de uma solução 33  $\mu$ M do complexo em etanol, já o espectro no infravermelho foi feito a partir do sólido em pastilha de KBr.

Durante os experimentos foi usado EUK8 preparado anteriormente em outro trabalho envolvendo estudo de Mn(III), cuja análise elementar indicando que o sólido em questão era o EUK8 segue no **Anexo I (Tabela A1)**.

### 3.2.2 Lipofilicidade dos complexos

A lipofilicidade de um composto é importante na interpretação da capacidade deste em se acumular no organismo, e pode ser expressa através do coeficiente de partição *n*-octanol/água (P), determinado através da razão entre as concentrações da substância no *n*-octanol ( $C_o$ ) e na água ( $C_w$ ) (**Esquema IX**).

$$P = \frac{C_o}{C_w} \quad (\text{Esquema IX})$$

Assim, na intenção de deduzir se os complexos estudados são lipo ou hidrofílicos, foram determinados experimentalmente os valores de P de cada espécie pelo método Shake Flask, descrito no OECD Guidelines for the Test of Chemicals. Contudo, dado que os complexos apresentam elevada solubilidade em água, foram analisadas somente as fases aquosas das amostras, que eram três para cada composto de Mn(III) com diferentes proporções *n*-octanol/água (1,0:1,0; 1,0:0,5 e 0,5:1,0) feitas em duplicata. Considerando a equação de Lambert-Beer, assume-se que P pode ser calculado através da razão entre as absorvâncias das duas fases ( $A_o/A_w$ ). Ao denominar-se a solução aquosa inicial como  $A_s$ , a equação utilizada na determinação de P será:

$$P = \frac{A_o}{A_w} = \frac{A_s - A_w}{A_w} \quad (\text{Esquema X})$$

### 3.2.3 Estabilidade dos complexos frente aos p-aminosalicilato de sódio (NaPAS)

Soluções 1 mM de EUK8 e 5 mM dos demais complexos em HBS isento de ferro foram misturadas com p-aminosalicilato (PAS) em proporções molares 1 : 1 e tiveram seus espectros de absorvância medidos durante 2 h a fim de verificar se haveria degradação das espécies.

Para avaliar o mesmo efeito em meio mais similar ao fisiológico o mesmo teste foi realizado em tampão citossólico, na ausência e na presença do quelante.

### 3.2.4 Capacidade pró-oxidante dos complexos

Soluções 1 mM dos complexos em HBS foram diluídas até obter-se amostras com concentração variando entre 0 – 100  $\mu\text{M}$ . Destas, 20  $\mu\text{L}$  foram acrescentados a três grupos com 180  $\mu\text{L}$  de dihidrorodamina 50  $\mu\text{M}$ . O primeiro grupo era a DHR pura, o segundo continha  $\text{H}_2\text{O}_2$  50  $\mu\text{M}$  e o terceiro, ascorbato 40  $\mu\text{M}$ . A intensidade de fluorescência de cada amostra foi medida por 2 h com  $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{emis}} = 485/515$  nm.

O teste também foi feito com os precursores dos complexos, nas mesmas concentrações usadas anteriormente, a fim de verificar a influência dos íons ligantes livres nos resultados.

O procedimento foi repetido depois com as soluções de DHR e de DHR com peróxido na presença de PAS 0 – 500  $\mu\text{M}$ , fixando-se a concentração dos complexos em 10  $\mu\text{M}$ .

Todos os testes foram repetidos duas vezes, mas em dias diferentes, e, portanto, em condições ambientais diferentes, o que impossibilita análises estatísticas. Contudo, os resultados apresentaram as mesmas tendências, sugerindo coerência nos mesmos.



### 3.2.5 Danos oxidativos sobre biomoléculas

#### 3.2.5.1 Tirosina

Foram preparadas seis soluções de tirosina 1,0 mM em 5 mL tampão HBS (pH = 7,4). A três destas os complexos foram adicionados em quantidade tal que a concentração final também fosse 1,0 mM. Às demais, além dos complexos, acrescentou-se peróxido de hidrogênio para verificar seu efeito pró-oxidante, atingindo uma proporção molar de 1:1:1 (tirosina:complexo:peróxido) em solução.

Concomitantemente obteve-se o produto de oxidação da tirosina, a ditirosina, conforme descrito por (Lee, Hwang *et al.*, 2008), tratando-se uma solução 1,0 mM de tirosina com  $\text{Mn}(\text{OAc})_3$  em igual quantidade. A mistura ficou sob agitação à temperatura ambiente por 30 min, sendo filtrada em seguida para separar o excesso de sal não reagido. O filtrado foi reservado para análise.

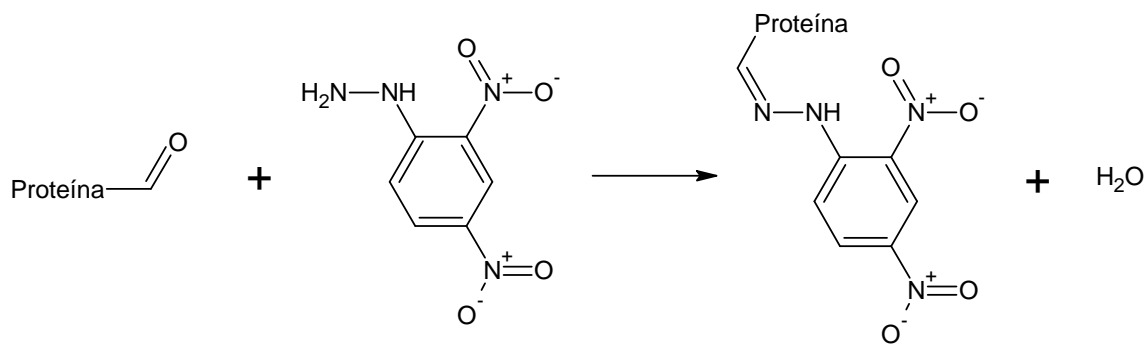
Em seguida, preparou-se uma solução 1,0 mM de tirosina com o fim de analisá-la junto com a de seu dímero e avaliar a melhor forma de identificá-las sem confundi-las, visto que o espectro de emissão de fluorescência de ambas apresenta máximo por volta de 400 nm, sendo excitadas em diferentes comprimentos de onda dependendo do pH (Dimarco e Giulivi, 2007). Verificou-se que em meio ácido é possível observar a banda de fluorescência da ditirosina com maior nitidez, com pouca ou nenhuma excitação da tirosina.

As soluções finais, obtidas após o tratamento com os complexos e/ou peróxido, foram, então, acidificadas até pH  $\approx$  2 e tiveram seus espectros de emissão medidos em um espectrofluorímetro, com excitação em 284 nm.

### 3.2.5.2 Albumina Bovina Sérica (BSA)

Albumina é a proteína mais abundante no plasma, além de ser bastante solúvel em água (em pH ~ 7) (Restani, Ballabio *et al.*, 2004). Tais características a tornam atraente para uso em experimentos com polipeptídeos em meio aquoso e neutro, e, por isso, ela foi escolhida para testar a carboxilação de proteínas induzida pelas espécies de Mn(III) estudadas. Todavia, essa macromolécula é rica em resíduos de cisteína, um alvo facilmente oxidável e que poderia influenciar nos resultados do procedimento. Então, os grupos tióis desse aminoácido foram bloqueados conforme descrito por (Trindade, Cerchiaro *et al.*, 2006) antes de misturar a proteína com os complexos.

O teste foi realizado com dois grupos, o primeiro com a proteína *in natura*, e o outro com seus grupos SH protegidos, ambos em duplicata, na presença e ausência de peróxido. Para tanto, foram preparadas soluções 600 µM da proteína (bloqueada e não-bloqueada) em HBS com Chelex, às quais se acrescentaram soluções, também em HBS, de cada complexo e de peróxido, quando necessário, de forma que suas concentrações finais fossem 10 µM. Os controles foram as soluções com a proteína pura (para as amostras apenas com os complexos) e da proteína com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (para as amostras que, além de complexo, adicionou-se o peróxido). As misturas ficaram em banho-maria a 37 °C por 1 h, e a reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético 20 % para precipitar a albumina, a qual foi separada por centrifugação (3 min; 11000 g) e posterior descarte do sobrenadante. Em seguida, a proteína foi tratada da forma descrita por (Fields e Dixon, 1971) para marcar os grupos carbonila com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (**Esquema XI**).



(Esquema XI)

Por fim, mediu-se a absorvância de todas as soluções em 360 nm, e compararam-se as intensidades para verificar se houve aumento na quantidade de grupos C=O na BSA.

### 3.2.5.3 Dopamina

Para observar os danos provocados à DA pelas espécies de Mn(III) dois procedimentos indiretos e um direto foram abordados. No primeiro, foi induzida reação entre a dopamina 500  $\mu\text{M}$  com os compostos de Mn (0 – 10  $\mu\text{M}$ ), incluindo  $\text{MnSO}_4$  dessa vez, e mediram-se os produtos de oxidação com o auxílio de luminol 500  $\mu\text{M}$ , de acordo com o trabalho de (Klegeris, Korkina *et al.*, 1995). Como o estudo afirma que o produto medido é o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , teoricamente formado na reação de oxidação da dopamina, uma amostra do peróxido com a DA e luminol passou pelo mesmo tratamento.

Outro método indireto implicava em misturar a dopamina 500  $\mu\text{M}$  com os complexos e o Mn(II) 10  $\mu\text{M}$  em presença de DHR variando de 0 a 20  $\mu\text{M}$ , e medir a intensidade de fluorescência por 2 h com  $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{emis}} = 485/515$  nm.

No último teste, a mistura da DA 500  $\mu\text{M}$  com os complexos e o sulfato (0 – 10  $\mu\text{M}$ ) foi submetida à leitura de intensidade de absorção em 350 nm durante 2 h.

### 3.2.6 Testes biológicos

#### 3.2.6.1 - Viabilidade de neurônios frente aos complexos

No intuito de avaliar melhor a neurotoxicidade dos complexos estudados prepararam-se culturas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) de células neuronais granulares cerebelares (CGC) de filhotes de camundongo sete dias após o nascimento. Estes foram eutanasiados por decapitação a fim de evitar danos neuronais que prejudicassem a avaliação dos resultados, e tiveram seu cerebelo removido para extração das CGC's e preparação da cultura primária em meio DMEM. As células foram aderidas a placas com 96 poços e deixadas em estufa a 37 °C e atmosfera 5 % CO<sub>2</sub> por seis dias, quando os neurônios estariam maduros. Depois disso, as culturas foram tratadas com os complexos de Mn(III) em concentração variando entre 0 e 300 µM.

Para avaliação da viabilidade celular foram conduzidos ensaios com brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), que é reduzido a uma formazana colorida ( $\lambda_{\text{abs}} = 560 \text{ nm}$ ) somente por células viáveis.

Nesses ensaios foi realizado controle de morte celular com o tensoativo triton nos dois primeiros poços da placa, ficando na estufa por 30 minutos antes de serem tratadas com MTT. Após tratamento, as placas permaneceram na estufa por mais 1 h. As culturas com MTT tiveram sua absorção medida em 560 nm.

Esse estudo foi feito em colaboração com o aluno de pós-doutorado Raul Hernández, do laboratório da prof<sup>a</sup> Nadja Lardner.

### 3.2.6.2 - Viabilidade de células em situação de estresse frente aos complexos

Células da cepa HeLa foram cultivadas em placas com 12 poços em meio DMEM, de maneira a se obter densidade de 500 células/mL, e incubadas a 37 °C e 5 % CO<sub>2</sub>. Após três dias as culturas foram tratadas com MnCit, MnPPi e EUK 8 nas concentrações 3, 15, 30, 60 e 100 mM, todas em duplicata, e incubadas novamente por mais três dias. Ao fim deste prazo, o meio foi trocado e as placas deixadas em estufa por quatro dias, sendo observadas periodicamente.

Depois disso, eventuais impurezas foram removidas por lavagem com tampão fosfato-salino (PBS), as células, fixadas com formaldeído por 5 min, quando foram novamente lavadas com PBS. Por fim, as colônias foram coradas com violeta de cristal, possibilitando a contagem. A partir desse teste, determinou-se EC50 de cada composto.

As concentrações determinadas foram utilizadas nos tratamentos seguintes, feitos da mesma maneira já descrita, mas em três grupos: (i) não irradiado, (ii) irradiado com luz UV A (365 nm, dose 50 J/m<sup>2</sup>), (iii) irradiado com luz UV B (302 nm, dose 80 J/m<sup>2</sup>). Raios UV foram escolhidos para estressar as células porque a radiação de alta energia absorvida por moléculas cromóforas pode produzir oxigênio singlet e espécies radicalares, desencadeando o estresse oxidativo (Sinha e Hader, 2002). Ondas ultravioleta também conduzem alterações na sinalização celular, distorcendo a expressão gênica e induzindo apoptose (Bode e Dong, 2003).

Em cada plaqueamento havia triplicata de amostras sem adição de complexo, com MnCit 200 µM, com MnPPi 30 µM e EUK8 15 µM. Após o tratamento, as culturas ficaram incubadas por um período de 24 h, quando o meio foi trocado para retirar o excesso de radicais livres, e as culturas deixadas em incubação novamente por 10 dias. Daí, foram coradas com violeta de cristal para efetuação da contagem de colônias.

O procedimento foi repetido com os precursores dos complexos, nas mesmas concentrações usadas anteriormente, a fim de verificar a influência dos íons ligantes livres nos resultados.

Por fim, fez-se mais dois plaqueamentos, um com a adição de ascorbato 40  $\mu\text{M}$ , e outro com *p*-aminosalicilato de sódio 200  $\mu\text{M}$ , na intenção de verificar possível recuperação do estresse oxidativo. Com o objetivo de comparar o efeito da mistura do ascorbato com as espécies de Mn(III) em DMEM, acrescentou-se DHR 500  $\mu\text{M}$  a misturas idênticas e sob as mesmas condições, medindo-se a emissão de fluorescência ( $\lambda_{\text{exc}} = 485/\lambda_{\text{emis}} = 515 \text{ nm}$ ) a cada 2 min, por 2 h.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Lipofilicidade dos complexos

Valores de log P (**Tabela 1**) expressam baixa lipofilicidade dos complexos, principalmente do citrato. O EUK8, possivelmente por causa dos anéis aromáticos de seus ligantes com maiores tendências a interações por forças de dispersão de London, possui menor hidrofiliabilidade que os demais. De acordo com a referência utilizada para o procedimento experimental, o método Shake Flask é válido para valores de log P variando entre -2 e 4, com desvio padrão de, no máximo,  $\pm 0,30$ , e a temperatura não deve variar mais do que 1 °C. Esta última foi mantida em 24 °C, com variação imperceptível no termômetro, e, portanto, desprezível, e os dados estão dentro dos intervalos permitidos. Além disso, como não existem valores limites, negativo ou positivo, para solubilidades, as incertezas maiores que os valores brutos são estatisticamente admissíveis. Portanto, os resultados obtidos são aceitáveis.

**Tabela 1. Log P dos complexos.**

<b>Complexos</b>	<b>log P</b>
EUK 8	$0,61 \pm 0,15$
MnPPi	$0,18 \pm 0,30$
MnCit	$-0,47 \pm 0,25$

### 4.2 Estabilidade dos complexos frente ao PAS

Considerando a possível ação quelante do ácido *p*-aminosalicílico frente ao manganês, era conveniente avaliar a estabilidade dos complexos frente a este composto. Nesse sentido, misturas das espécies de Mn(III) em estudo com *p*-aminosalicilato de sódio foram observadas ao longo do tempo, tendo seu valores de absorção registrados nas primeiras 2 h. A diminuição

desses valores seria um indício de que os complexos estariam sujeitos a equilíbrio de troca de ligantes.

Somente o MnCit mostrou rápida reação frente ao PAS, pois o MnPPi teve absorbância máxima ( $A_{\text{máx.}}$ ) pouco diminuída, e EUK8 mostrou  $A_{\text{máx}}$  praticamente constante durante o tempo medido (**Figura 12**). Contudo, após 24 h, soluções com EUK8 e pirofosfato perderam gradativamente suas cores e novas medidas de absorção no visível mostraram considerável diminuição ( $A_{\text{máx.}}$  foram, respectivamente, 34 % e 60 % da radiação total), a solução do complexo com citrato estava incolor em 24 h. Tal descoloramento foi observado para as outras duas soluções de complexo, porém, em intervalo de tempo mais longo: 36 h para MnPPi e 72 h para EUK8.

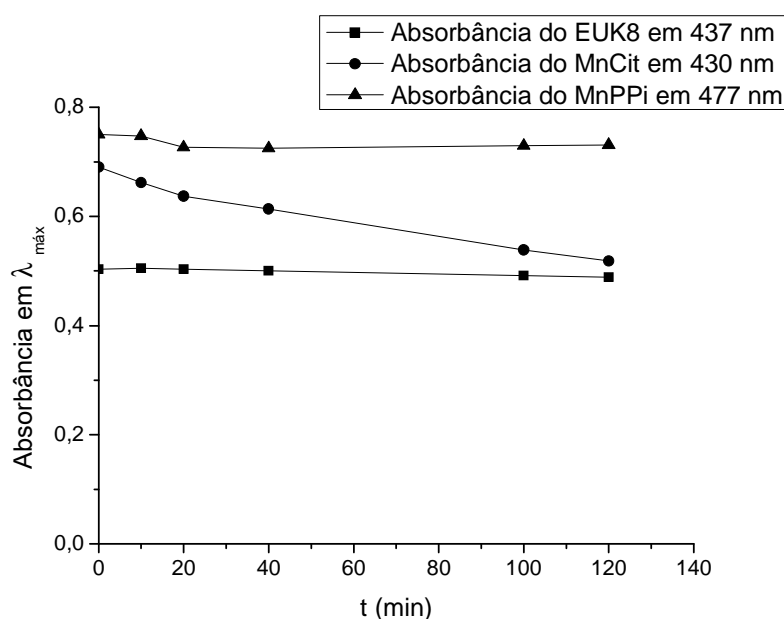


Figura 12. Medidas de absorbância dos complexos com PAS em proporção molar 1 : 1.

Possivelmente ocorreu degradação dos complexos pelo PAS, porém, de forma mais lenta para o MnPPi e o EUK8. De fato, observando soluções dos três complexos ao longo do tempo, nota-se descoloração mais rápida naquelas contendo MnCit, e, em seguida nas de



MnPPi, o que corroborou hipóteses mostradas na literatura de que este último é o mais estável das duas espécies (Klewicki e Morgan, 1998). Não se observou descoloração da solução de EUK8 sem adição de outros compostos, o que corrobora dados da literatura comprovando sua estabilidade (Arndt, 2009a). Deve-se ressaltar que as soluções de MnCit e MnPPi, devido às limitações de síntese, apresentam-se sempre com excesso dos ligantes de partida (citrato e pirofosfato), que também podem perturbar o equilíbrio de coordenação entre o íon metálico e o PAS. Entretanto, o desaparecimento completo de cor em todas as soluções sugere redução do Mn(III) a Mn(II), em vez de simples troca de ligantes e geração de novo complexo com o PAS.

Ao preparar a solução de MnCit em tampão citossólico, foi observado o desaparecimento de sua coloração amarelada muito rapidamente, tornando-se praticamente incolor antes que fosse possível medir seu espectro de absorvância (**Figura 13**). Como consequência sua curva de absorvância em função do tempo é praticamente constante. O mesmo ocorreu para a solução com adição de PAS (**Figura 14**). As soluções com MnPPi e EUK8 persistiram por mais tempo, especialmente a do EUK8, que só apresentou diminuição considerável de absorvância quando em presença de PAS. O MnPPi, apesar de apresentar sua cor característica inicialmente, foi consumido em pouco tempo, principalmente em presença de quelante. Confirma-se, então, a ordem de estabilidade:  $\text{MnCit} < \text{MnPPi} < \text{EUK8}$ .

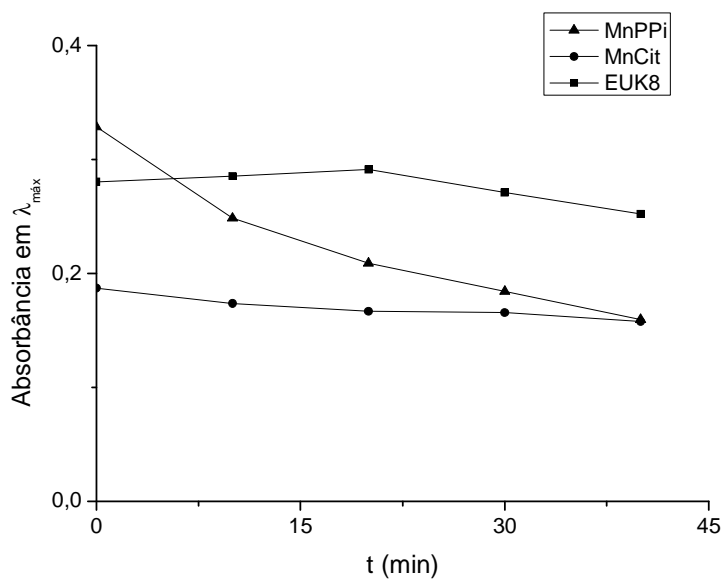


Figura 13. Medidas de absorbância dos complexos em tampão citossólico.

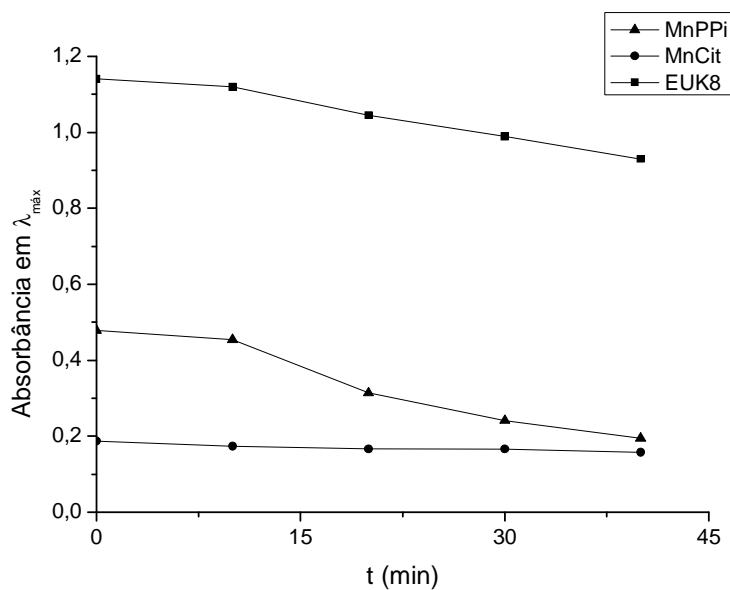


Figura 14. Medidas de absorbância dos complexos com PAS em proporção molar 1 : 1 em tampão citossólico.

### 4.3 Capacidade pró-oxidante dos complexos

Sendo a dihidrorodamina facilmente oxidável, seu uso em testes para prever o comportamento de biomoléculas sensíveis ao estresse oxidativo é bastante interessante, visto que a indução de sua oxidação na presença de certa substância pode indicar potencial capacidade oxidante desta última. O produto de oxidação formado, a rodamina, é fluorescente, e sua emissão é diretamente proporcional à quantidade de DHR oxidada. Então, soluções de diferentes concentrações de MnPPi, MnCit, Mn(OAc)<sub>3</sub> e EUK8 foram tratadas com soluções de DHR, contendo substratos pró (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e antioxidantes (ascorbato), e a emissão de fluorescência foi registrada ao longo de 2 h.

O teste foi realizado em três meios diferentes: (i) apenas com solução de DHR 50 µM; (ii) com solução de DHR 50 µM na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 µM e (iii) com solução de DHR 50 µM na presença de ascorbato 40 µM. Nessas condições de excesso de DHR (ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sobre os complexos de manganês, a expressão de velocidade da reação

$$\text{velocidade} = k[\text{DHR}][\text{MnL}]$$

(onde MnL = complexo de manganês) pode ser aproximada para a correspondente expressão de pseudo-primeira ordem:

$$\text{velocidade} = k_{\text{obs}}[\text{MnL}].$$

Os resultados são apresentados como comparações dos valores de  $k_{\text{obs}}$  (**Figura 15**), obtidos da maneira descrita abaixo e representados pelo **Esquema AI do Anexo I**:

- Gráficos de velocidade da oxidação da DHR: variação da intensidade de fluorescência em função do tempo, para uma dada concentração de complexo (**Figuras A4 a A15 – Anexo I**);
- Gráficos de variação da velocidade de oxidação da DHR (obtidas dos gráficos anteriores) em função da concentração do complexo (**Figuras A16 a A18 – Anexo I**);

- Comparações dos  $k_{obs}$  na presença ou ausência de tratamentos (peróxido, ascorbato).

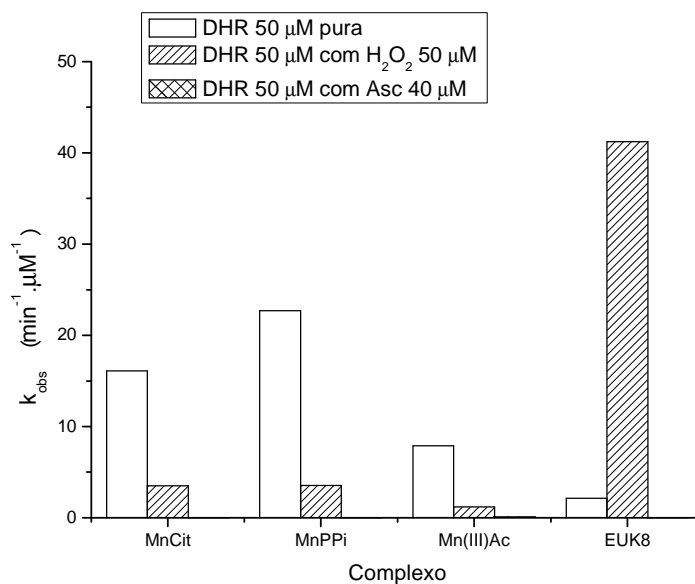


Figura 15. Comparativo do efeito dos tratamentos sobre  $k_{obs}$ .

O ascorbato atuou como antioxidante, protegendo a DHR contra oxidação pelos complexos, pois a intensidade de fluorescência apresentou valores desprezíveis, além de se manter praticamente constante durante o processo. Esse fenômeno é provavelmente resultado da redução de Mn(III) a Mn(II) pelo ascorbato, sendo que este íon tem pouca ou nenhuma capacidade de catalisar reações de formação de espécies reativas de oxigênio (Halliwell e Gutteridge, 2007).

O MnPPi se mostrou o mais oxidante dos complexos na ausência de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , seguido do MnCit, enquanto que o EUK8 só provocou efeito considerável ao ser combinado com peróxido, provavelmente, devido à sua reatividade em presença deste último, com possível geração de Mn(V)oxo, conforme mostrado no **Esquema III**, corroborando estudos que comprovam a

atividade catalítica do EUK8 similar à da catalase. Katsukiki e colaboradores (Tsutomu, 1995) compararam vários complexos de Mn(III)-salen com porfirinas e descobriram que os complexos salen possuem melhor atividade catalítica devido aos seus carbonos assimétricos, que lhe conferem maior enantioseletividade. Além disso, Amaral e Espósito (Amaral e Espósito, 2008) investigaram o comportamento deste complexo em presença de  $H_2O_2$ , verificando o mecanismo do **Esquema III**, e descobriram que baixa proporção molar  $H_2O_2$  : EUK8 implica em quantidade limitada de peróxido para reduzir o Mn(V) a Mn(III), favorecendo um meio altamente oxidante.

Para avaliar um possível efeito protetor do  $H_2O_2$ , fez-se um teste misturando soluções mais concentradas de complexo e peróxido, ocorrendo liberação de gás em todas as soluções, sendo muito maior no caso do EUK8, e quase imperceptível para o MnCit (dados não apresentados). A persistência da coloração do complexo, aliada à liberação do elevado volume de gás indicam provavelmente a catálise de desproporcionamento do  $H_2O_2$  por EUK8, o que é coerente com sua ação mimética da catalase discutida acima. Já os complexos pirofosfato e citrato de Mn(III) apresentaram imediato descoramento (possivelmente pela redução Mn(III)  $\rightarrow$  Mn(II)), sugerindo que estejam simplesmente oxidando o peróxido a oxigênio gasoso, o que de fato ocorre com algumas espécies metálicas.

O acetato de Mn(III) apresentou pouco ou nenhum efeito oxidante, indicando que o composto de manganês precursor dos complexos não influencia os resultados obtidos. É importante mencionar que os experimentos foram repetidos três vezes, entretanto, como as condições ambientais eram diferentes, não é possível comparar os resultados e verificar as incertezas, mas todos os resultados apresentaram as mesmas tendências.

Os precursores sódicos também apresentaram pouca ou nenhuma capacidade oxidante, dadas as baixas intensidades de fluorescência em função do tempo das amostras e os valores praticamente constantes para todas as concentrações testadas (**Figuras A19 a A22 – Anexo**

I). Assim, pode-se afirmar que não há influência destes nos resultados obtidos com aqueles produzidos em meio a excesso de ligante.

Para avaliar o efeito do suposto quelante *p*-aminossalicilato sobre essas reações, assumiu-se concentração de complexos 10  $\mu\text{M}$  e de peróxido 50  $\mu\text{M}$ . O PAS se mostrou bastante eficiente, inibindo quase que completamente a ação oxidante dos complexos, mesmo nas amostras com peróxido (**Figuras A23 a A30 – Anexo I**).

Nota-se considerável diminuição na emissão de fluorescência, embora os efeitos oxidantes do MnPPi e do MnCit, bem como da solução de EUK8 com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tenham sofrido menor inibição, mostrando as mesmas tendências vistas no teste sem o PAS (**Figuras 16 e 17**).

Com base nos experimentos com a sonda DHR, pode-se concluir, então:

- (i) os compostos menos estáveis (MnCit e MnPPi), ou algum produto redox dos mesmos formados em meio aquoso, atacam prontamente a sonda DHR, enquanto que o complexo estável EUK8 não tem ação sobre essa sonda, enquanto não estiver em presença de um substrato pró-oxidante.
- (ii) o peróxido deve reduzir rapidamente as espécies menos estáveis a formas redox-inativas de Mn(II), mas a associação  $\text{EUK8} + \text{H}_2\text{O}_2$  é muito pró-oxidante, possivelmente pela formação e persistência em solução de espécies de Mn com maior potencial oxidativo.
- (iii) o quelante PAS, embora de coordenação lenta a espécies das Mn(III) estudadas, é um antioxidante contra reações de formação de ERO's catalisadas por esses íons.

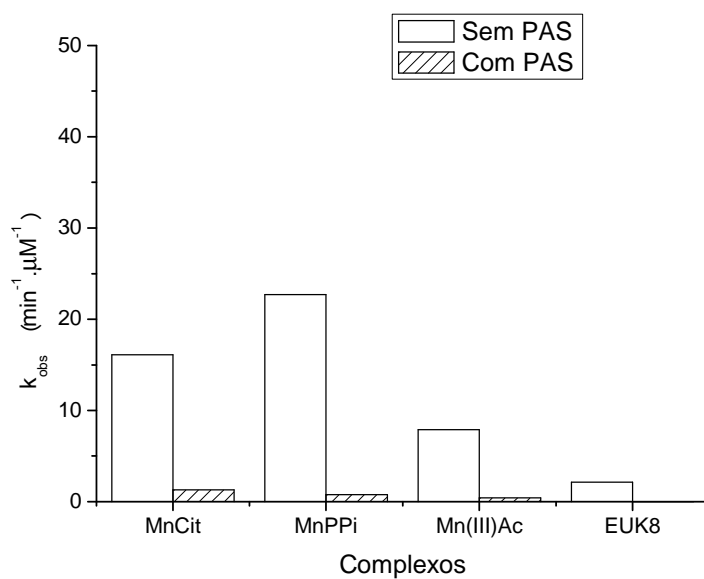


Figura 16. Comparativo das intensidades de oxidação da DHR pelos complexos de amostras com e sem PAS.

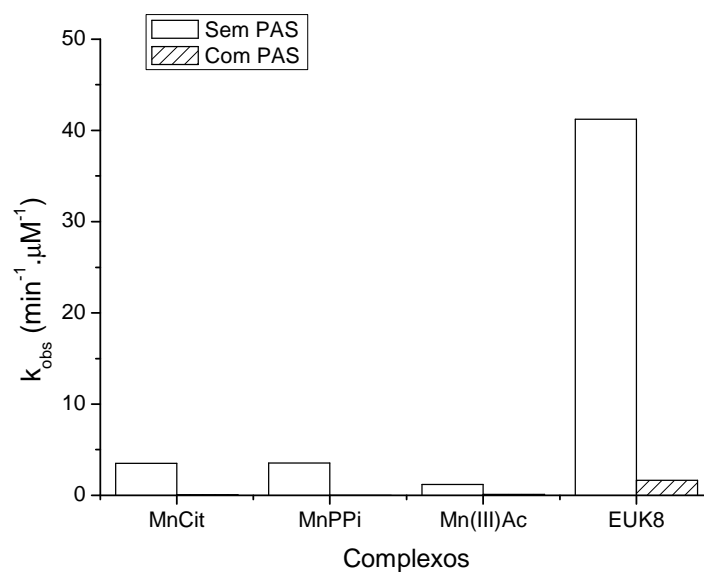


Figura 17. Comparativo das intensidades de oxidação da DHR 50  $\mu\text{M}$  pelos complexos 10  $\mu\text{M}$  em presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  50  $\mu\text{M}$ , na presença ou ausência de PAS.

Com base nesses resultados de ação antioxidante promovida pelo PAS, bem como nos testes de estabilidade apresentados na **Figura 12**, justifica-se o uso do *p*-aminossalicilato co-

mo quelante para o tratamento de sobrecargas de Mn, embora com menos eficiência se esse metal estiver majoritariamente na forma trivalente (o que pode explicar a menor velocidade de troca de ligantes). Até que ponto essa característica fisicoquímica do quelante pode prejudicar o tratamento das disfunções neurológicas provocadas por sobrecarga de Mn, sendo que a espécie trivalente é a que mais se acumula no cérebro (Reaney, Bench *et al.*, 2006), é uma questão em aberto. Nossos dados não nos permitem concluir se o PAS é um quelante e, portanto, antioxidante, ou um quelante que, além disso, é antioxidante. Ou seja, a ação antioxidante advém da complexação ao metal e, portanto, inibição de reações oxidativas, ou seria o caso de que, após a complexação, a proximidade da parte orgânica da molécula de PAS agiria como sequestradora de radicais livres? Tal questão, relevante para a compreensão do mecanismo de ação do PAS, só poderia ser resolvida com estudos (provavelmente cromatográficos) da estrutura do quelante *após* a complexação.

#### 4.4 Danos oxidativos sobre biomoléculas

##### 4.5.1 Tirosina

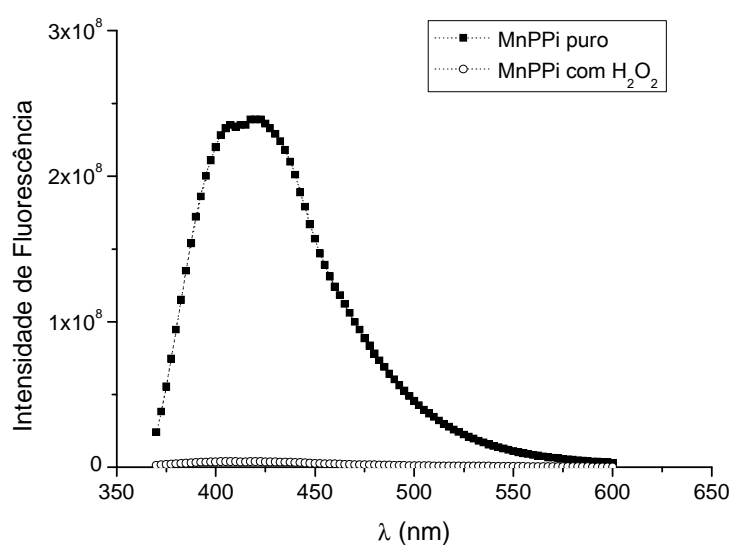
A diferença nos espectros de excitação das soluções de tirosina (Tyr) e de ditirosina (diTyr) de mesma concentração (1 mM) possibilitou a eficiente verificação da formação desta nas demais análises. Os espectros de excitação ( $\lambda_{\text{emis}} = 406 \text{ nm}$ ) de ambas as substâncias (**Figura A31 – Anexo I**), em solução de HCl 1 mM ou NaOH 1 mM, mostram maior intensidade em meio alcalino (320 nm), contudo, nesse comprimento de onda não é possível afirmar se o composto responsável pela emissão é Tyr ou diTyr. Entretanto, o pico de excitação a 284 nm em meio ácido é exclusivo da ditirosina, sendo, portanto, ideal para monitorar o progresso da formação desse produto de oxidação em função dos tratamentos.

Além disso, durante o procedimento, ocorreu precipitação nas misturas de todos os complexos com tirosina ao adicionar hidróxido de sódio, por isso somente valores de medidas



das soluções ácida ( $\lambda_{exc}/emis = 284 \text{ nm}/406 \text{ nm}$ ) foram considerados para interpretação dos resultados.

Então, a emissão de fluorescência observada nas figuras a seguir é, provavelmente, referente à diTyr, o que comprova ação oxidante dos complexos, sendo MnPPi mais oxidante que MnCit, e ambos muito mais que o EUK8.



**Figura 18.** Espectro de emissão de fluorescência de Tyr com MnPPi (proporção molar = 1 : 1, com e sem peróxido de hidrogênio em mesma concentração) em meio ácido ( $\lambda_{exc} = 284 \text{ nm}$ ).

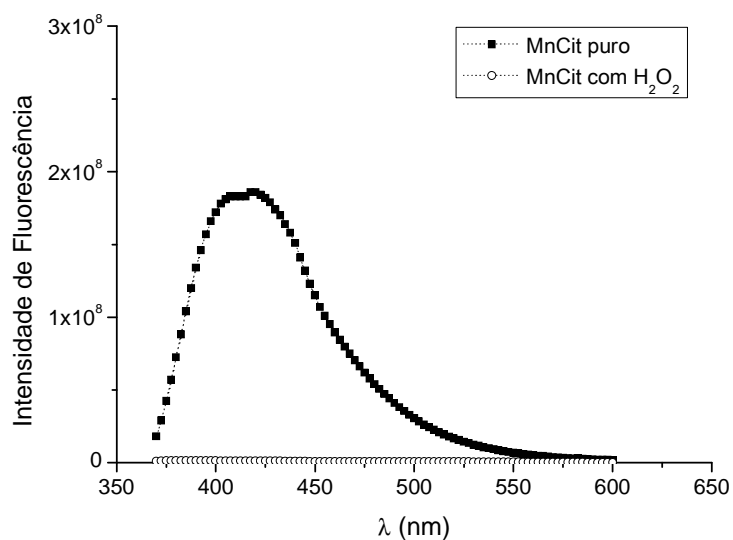


Figura 19. Espectro de emissão de fluorescência de Tyr com MnCit (proporção molar = 1 : 1, com e sem peróxido de hidrogênio em mesma concentração) em meio ácido ( $\lambda_{exc} = 284$  nm).

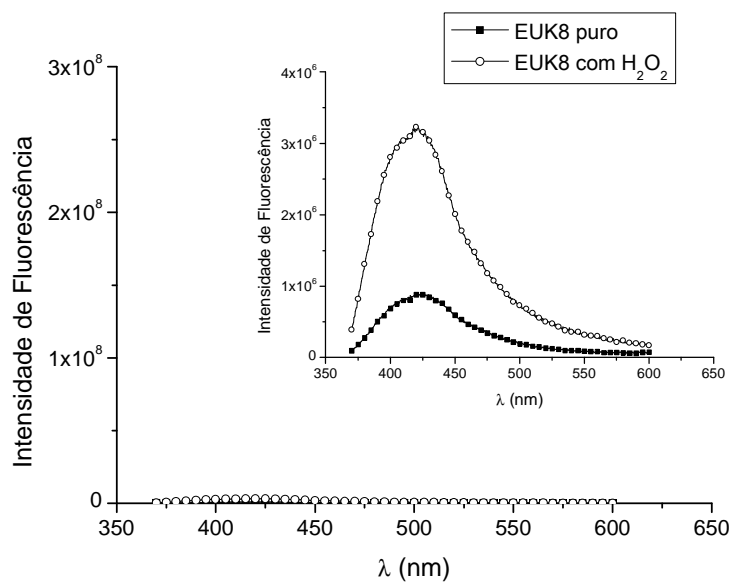
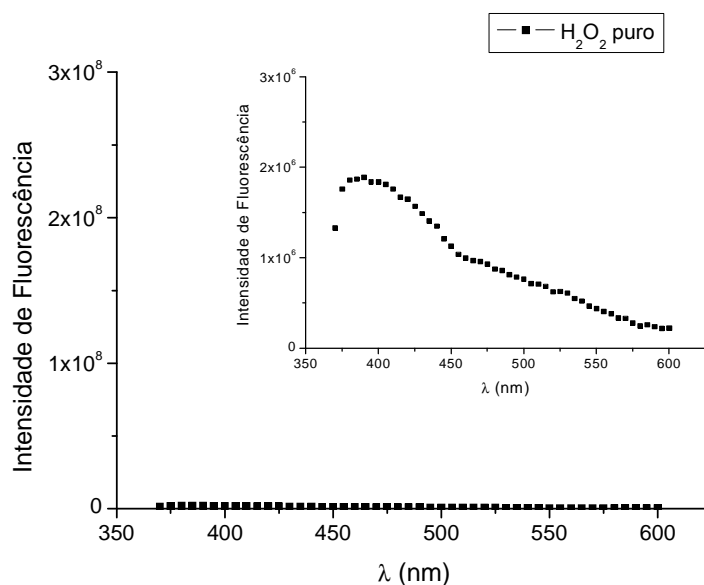


Figura 20. Espectro de emissão de fluorescência de Tyr com EUK8 (proporção molar = 1 : 1, com e sem peróxido de hidrogênio em mesma concentração) em meio ácido ( $\lambda_{exc} = 284$  nm). No detalhe: escala ampliada.

Peróxido de hidrogênio é um composto fortemente oxidante, entretanto, na amostra em que este foi misturado à tirosina sem qualquer composto de Mn, não foi observado tanta ditirosina quanto nas amostras com MnPPi e MnCit puros (**Figura 21**). Todavia, sua presença intensificou o efeito oxidante do EUK8, mesmo sendo muito menor que os outros dois compostos. A semelhança destes resultados com aqueles percebidos com a DHR corroboram o que foi explicitado anteriormente sobre a conversão do EUK8 em Mn(V)oxo com pouco peróxido para reduzir novamente essa espécie em Mn(III) (vide Esquema III), bem como a atividade oxidante dos complexos de pirofosfato e citrato frente ao  $H_2O_2$ , que é bastante plausível em vista dos potenciais de redução para os pares Mn(III)/Mn(II) e  $O_2/H_2O_2$  em meio ácido, respectivamente, 1,50 V e 0,68 V (Deloncle, Guillard *et al.*, 2006).

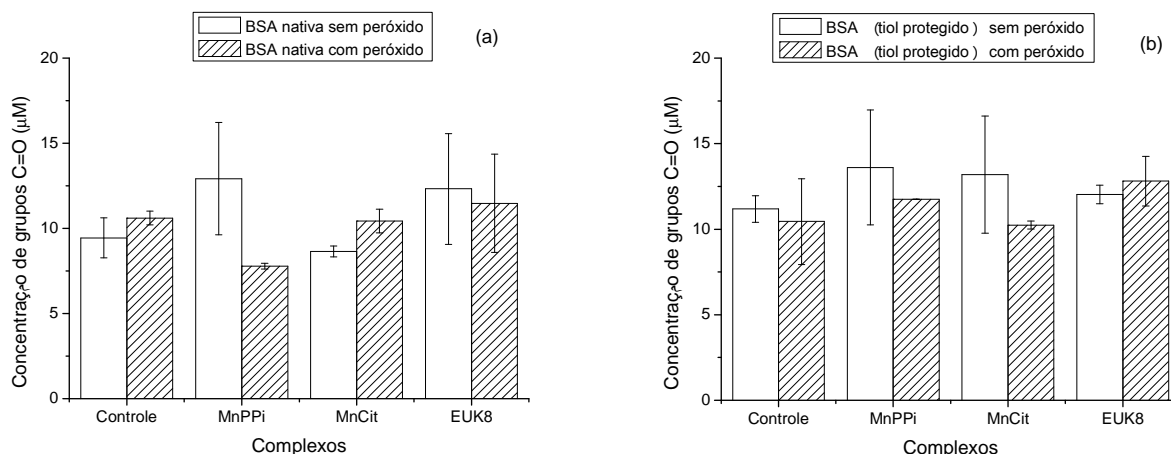
Considerando tais similaridades, abre-se uma possibilidade interessante de verificar o uso de DHR como substituto da formação de ditirosina nesse tipo de experimento, o que poderia facilitar a verificação da capacidade oxidante de várias substâncias em sistemas de alto desempenho.



**Figura 21.** Espectro de emissão de fluorescência de tirosina com peróxido de hidrogênio (proporção molar = 1 : 1) em meio ácido ( $\lambda_{exc} = 284$  nm). No detalhe: escala ampliada.

#### 4.5.2 Albumina Bovina

Os resultados obtidos são mostrados nas **Figuras 22a e 22b**.



**Figura 22.** Concentração de carbonilas das amostras com albumina nativa (a) e com grupo tiol protegido (b) ( $p > 0,1$ ).

As absorvâncias observadas das amostras preparadas não mostraram diferenças estatisticamente significativas nas quantidades de carbonila entre os tratamentos, tanto na proteína nativa como na tiol-protégida. Apesar disso, não se deve concluir ausência de danos à proteína.

Vale mencionar que existe uma leve tendência a maiores capacidades oxidantes de MnPPi e MnCit puros, e de EUK8 em presença de peróxido, as mesmas observadas nos estudos com DHR e Tyr. Logo, mais uma vez, comprova-se ação catalase do complexo com ligante salen, e oxidação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{O}_2$  pelos complexos de citrato e pirofosfato de Mn(III).

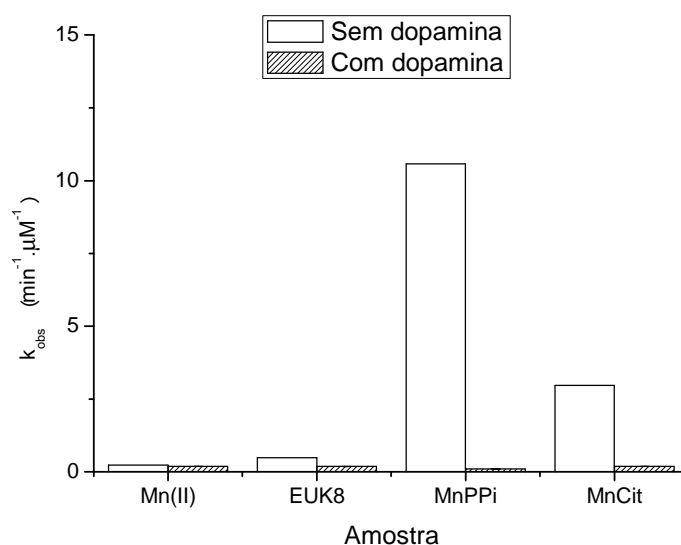
#### 4.5.3 Dopamina

No teste com luminol supôs-se que ocorreria formação de peróxido de hidrogênio durante a oxidação da dopamina e este seria detectado por luminescência, pois assumiu-se o mecanismo proposto por (Klegeris, Korkina *et al.*, 1995), embora não seja o único mecanismo possível para oxidação da DA. De fato há um leve aumento da intensidade de luminescência emitida durante os 100 min de reação (**Figuras A33 a A36 – Anexo I**), porém não existe uma relação direta com ausência ou presença de composto oxidante, menos ainda com aumento da concentração deste, pois as curvas de luminescência eram praticamente iguais independentemente da amostra. A medida de luminescência de uma amostra de peróxido com dopamina por 20 min também apresentou valores com oscilação periódica, mas, diferente das misturas com os complexos, não há aumento no decorrer do tempo (**Figura A37 – Anexo I**).

Como esse teste foi inconclusivo, prepararam-se soluções de dopamina na presença e ausência de complexos metálicos, as quais tiveram seus espectros de absorbância registrados, e todas apresentaram  $\lambda_{\text{máx}} = 350$  nm. Assim, esse comprimento de onda foi usado em medidas diretas de oxidação da dopamina pelos compostos de Mn durante 2 h. Não foi observada variação significativa dos valores de absorbância com o aumento da concentração dos complexos e tais valores também permaneceram praticamente constantes em função do tempo, mas notou-se pequena diferença entre os compostos, sendo que o EUK8 se mostrou mais oxidante que os demais, enquanto que o MnCit não provocou qualquer efeito (**Figura A38 – Anexo I**).

É importante mencionar que as soluções foram observadas ao longo do tempo, ocorrendo escurecimento de todas em 24 h, quando as absorbâncias foram novamente medidas, apresentando valores bastante elevados (absorbância de ~100 % da radiação).

Então, como uma terceira alternativa, optou-se por avaliar o efeito da presença de dopamina sobre a já discutida oxidação da DHR, mas não havia solução controle com espécies que oxidem a DA. A hipótese foi a de que, se a dopamina fosse oxidada preferencialmente pelos complexos, não haveria oxidação da sonda fluorescente, daí que a fluorescência da rodamina seria um indicador indireto da facilidade com que cada complexo metálico reage com a dopamina. Os dados com a DHR foram mais claros, mostrando que a dopamina é preferencialmente oxidada pelos complexos, pois a diminuição da emissão de fluorescência nas amostras onde o neurotransmissor está presente indica proteção da DHR pela DA (**Figuras 39 a A47 – Anexo I**). Os resultados (**Figura 23**) são expressos na forma de  $k_{obs}$  da oxidação da DHR em presença de DA, obtido da mesma maneira descrita para o teste com a DHR sem a presença do neurotransmissor.



**Figura 23. Comparativo do efeito da DA 500  $\mu$ M sobre  $k_{obs}$ . Valores mais baixos de  $k_{obs}$  indicam maior oxidação da DA.**

A dopamina praticamente anulou a formação de rodamina, corroborando os dados da literatura que afirmam maior sensibilidade do sistema dopaminérgico em casos de exposição a

espécies de manganês, especialmente com o que afirma (Benedetto, Au *et al.*, 2009) sobre a reatividade do Mn com DA em função dos grupos NH<sub>2</sub>, já que os demais estudos foram feitos *in vivo*, e não seria conveniente compará-los diretamente ao dados desse trabalho. Em vista disso, talvez seja interessante observar as semelhanças na estrutura da dopamina e da tirosina, a qual também possui grupo amino, que pode explicar a reatividade desse aminoácido com as espécies de Mn(III). Vale mencionar que o comprimento de onda de máxima absorção da dopamina oxidada é o mesmo  $\lambda$  de excitação máxima da Tyr.

Assim como as outras biomoléculas (Tyr e BSA) e a sonda DHR, DA se mostra mais sensível ao MnPPi e MnCit, refletindo a maior reatividade desses dois complexos.

## 4.5 Testes biológicos

### 4.5.4 Viabilidade de neurônios frente aos complexos

Os dados obtidos a partir dos ensaios com MTT foram utilizados para construir curvas dose-resposta (**Figura 74**) e, a partir delas, determinar os valores de EC50 para cada complexo (**Tabela 3**).

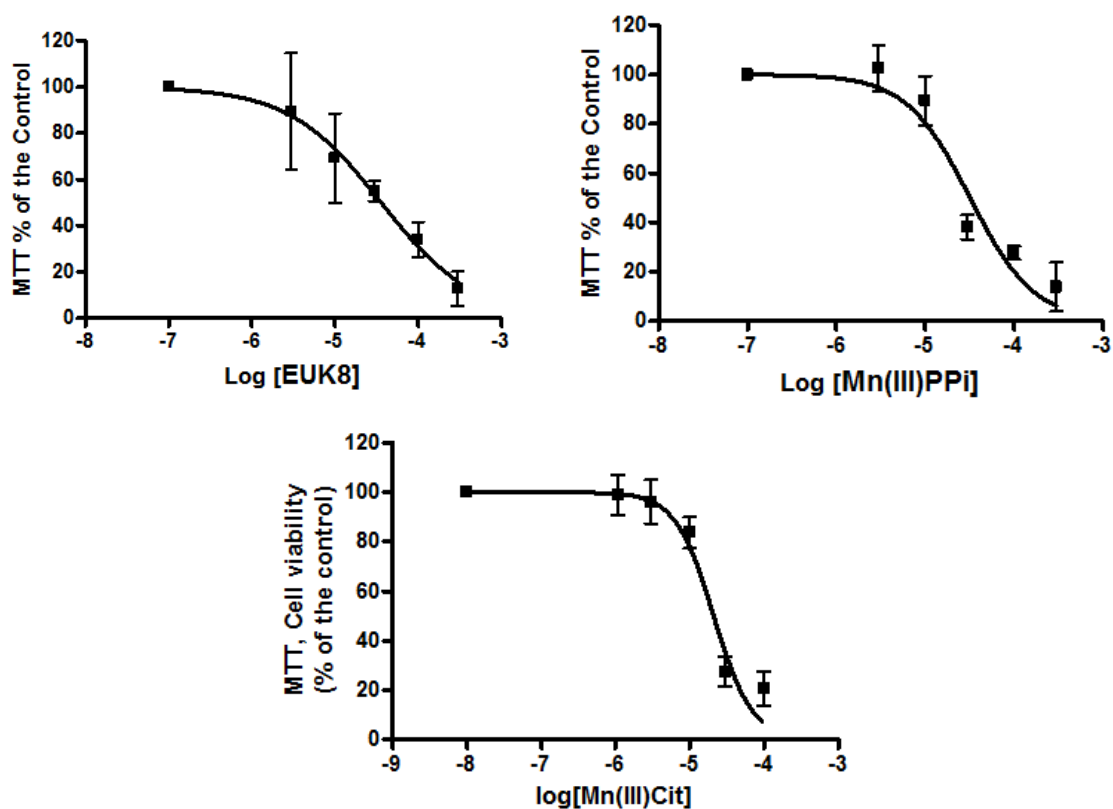


Figura 24. Curvas dose-resposta (viabilidade celular) para os complexos de Mn(III) em CGC.

Tabela 2. EC50 em CGC para espécies de Mn(III).

Complexo	EC50 ( $\mu\text{M}$ )
EUK 8	$35,6 \pm 2,4$
Mn(III)PPi	$32,2 \pm 11,3$
Mn(III)Cit	$22,4 \pm 2,7$

Embora os danos oxidativos do EUK8 sobre biomoléculas tenha sido relativamente baixo em comparação com citrato e MnPPi, nota-se aqui a ocorrência de toxicidade a células de neurônios em baixas concentrações, comprovando que sua toxicidade pode ser independente da presença de dano oxidativo, ou que o dano oxidativo real não tenha sido estudado neste trabalho. Apesar de não haver diferenças significativas nos valores de EC50 da **Tabela**

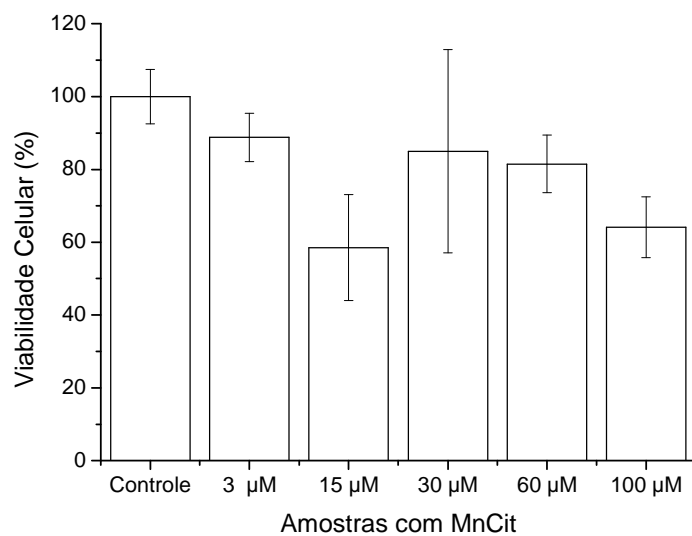


2, percebe-se que complexo com ligante salen pode ser menos neurotóxico que o MnCit. De acordo com o trabalho de Klewicki et. al. (1998) (Klewicki e Morgan, 1998), a decomposição do citrato em meio aquoso é dependente da acidez da solução, e, para valores de pH entre 6 e 9, o MnCit é degradado em cerca de 0,5 – 2,5 dias. Portanto, a menor toxicidade do EUK8, possivelmente, se deve à sua maior estabilidade em pH fisiológico. Além disso, os grupos citrato e pirofosfato, mas não o ligante salen, são substratos bioquímicos, podendo ter sua internalização celular facilitada por transportadores específicos. Klewicki também relata a instabilidade do MnPPi em solução aquosa, que, em pH = 7, pode durar até 25 dias (Klewicki e Morgan, 1998) o que sugere maior reatividade deste em relação ao EUK8. Todavia, apesar da maior ação oxidante à tirosina induzida pelo pirofosfato de manganês, em vista do elevado desvio padrão do seu valor médio de EC50, não se pode comparar sua neurotoxicidade com a dos demais complexos de forma segura. Entretanto, ele também provocou danos oxidativos às células estudadas.

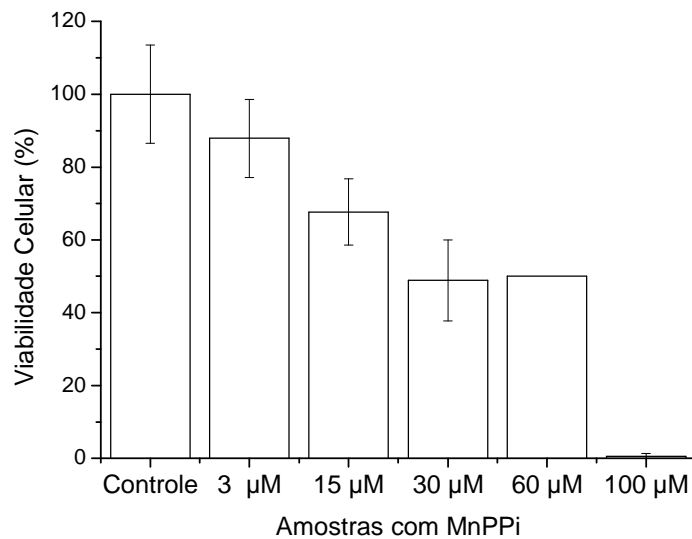
Os resultados obtidos deixam claro que a toxicidade do manganês depende do seu estado de oxidação, bem como da natureza de seus ligantes. É importante observar a relação inversamente proporcional da neurotoxicidade com a lipofilicidade dos complexos, sugerindo que os mais hidrofílicos também são mais absorvidos em CGC.

#### 4.5.5 Viabilidade de células em situação de estresse frente aos complexos

As concentrações aplicadas nos experimentos com HeLa para cada complexo foram escolhidas de acordo com seus respectivos valores de EC50 (**Tabela 3**). O MnCit não reduziu consideravelmente o número de colônias no intervalo de concentrações medidos, além de não se observar uma relação direta entre a concentração e a viabilidade celular como nos demais compostos estudados (**Figuras 25 –27**). Por isso, a concentração usada nos experimentos foi superestimada para 200  $\mu\text{M}$ .



**Figura 25. Viabilidade Celular em culturas HeLa frente ao MnCit.**



**Figura 26. Viabilidade Celular em culturas HeLa frente ao MnPPi.**

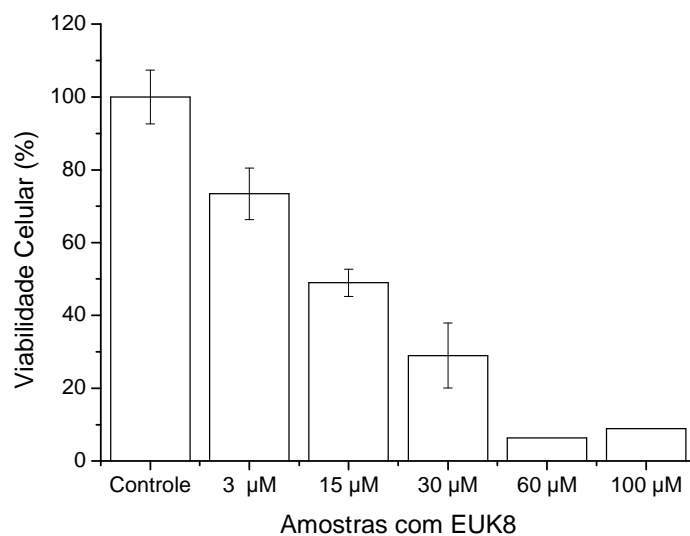


Figura 27. Viabilidade Celular em culturas HeLa frente ao EUK8.

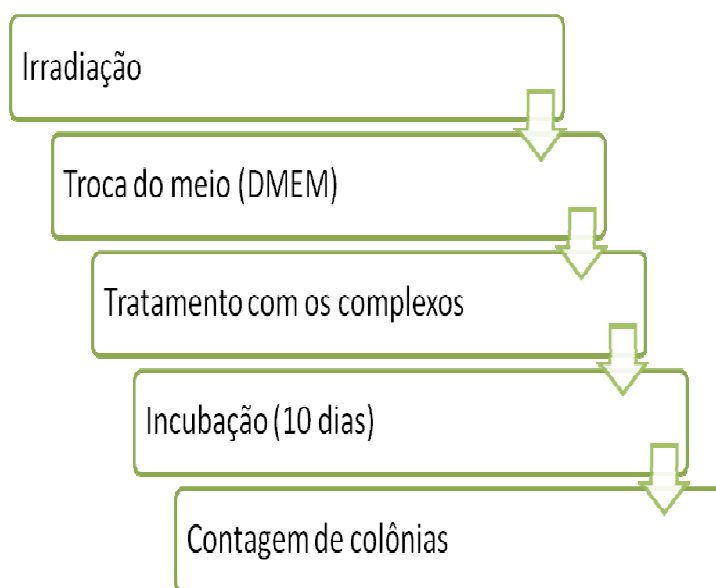
Tabela 3. EC50 em HeLa para espécies de Mn(III).

Complexo	EC50 (µM)
MnCit	200 *
MnPPi	30
EUK8	15

\*estimada

Ao contrário das culturas de CGC, células HeLa mostraram efeitos em 50% da população muito diferentes para cada complexo, sugerindo mecanismos diferentes de toxicidade. É importante lembrar que a cepa HeLa é tumoral, implicando em maior resistência que células normais, o que explica EC50 do MnCit bem acima daquela observada para cultura de neurônios. Por outro lado, EUK8 se mostrou menos oxidante para esta última, talvez devido à sua função como mimético de SOD, juntamente com sua atividade catalase, permitindo reação com o superóxido formado na respiração celular seguida da geração de Mn(V) através da redução do peróxido (**Esquema III**). Nesse caso, a presença de espécie mais oxidada de man-

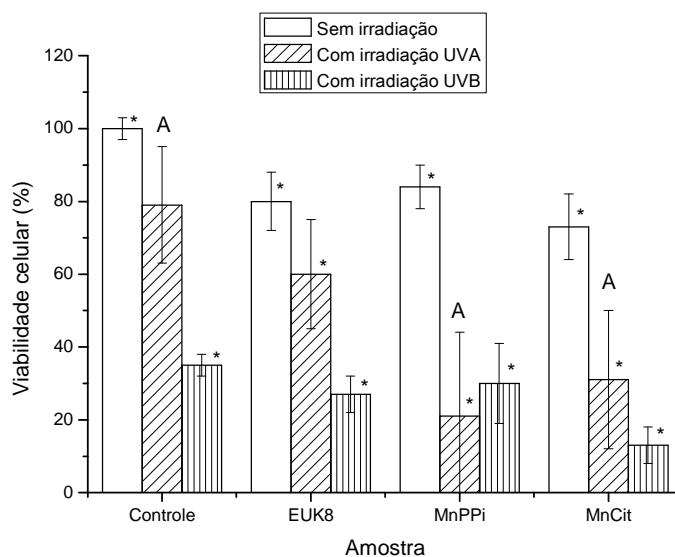
ganês provocaria maior dano à célula. Ora, mas CGC também realiza respiração celular, porém, é crucial recordar que células tumorais tem metabolismo mais acelerado, produzindo espécies reativas de oxigênio mais rapidamente que células normais. Portanto, a quantidade de ROS gerada nas colônias de HeLa pode alcançar níveis mais elevados que em CGC num mesmo intervalo de tempo, ou seja, o sistema antioxidante das células neuronais foi mais eficiente devido à menor proporção de ROS no meio. Embora não seja possível provar com os dados obtidos neste trabalho, tal hipótese é digna de futuros estudos para avaliar sua veracidade. Na etapa seguinte os complexos foram usados em concentrações equivalentes à respectiva EC50, aplicados isoladamente ou combinados com radiação UVA e UVB, seguindo a ordem mostrada no diagrama do **Esquema XII**.



*Esquema XII*

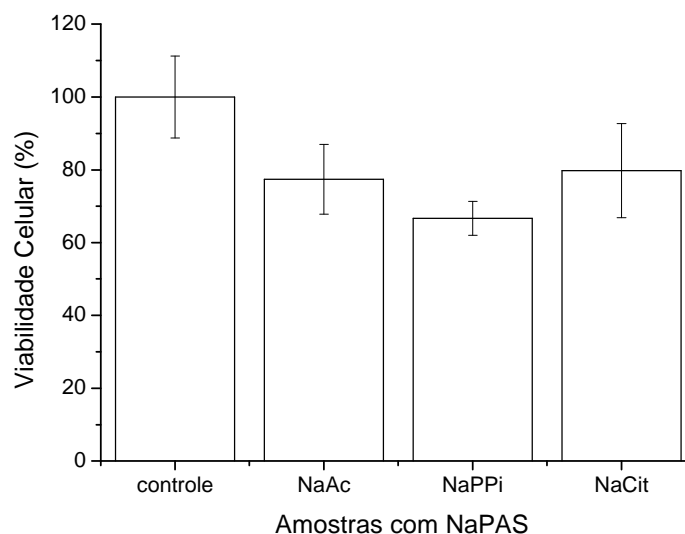
Todos os complexos prejudicaram a viabilidade celular mesmo sem irradiação, e culturas sem adição de Mn(III) expostas a UVA, a despeito da análise estatística, aparentemente, tiveram a viabilidade celular diminuída significativamente (comparada ao controle,  $p > 0,1$ ), enquanto que irradiação com UVB, elimina mais que 50 % das colônias (**Figura 28**). Quando

a radiação UVA foi combinada ao tratamento do complexo verificou-se possível efeito sinérgico nos danos provocados por espécies de citrato e pirofosfato de Mn(III), pois a viabilidade celular nessas soluções são significativamente inferiores àquelas dos controles irradiados com UVA ou dos controles sem irradiação. Pelos dados estatísticos, a menor viabilidade celular em amostras tratadas com EUK8 parece ter sido mais influenciada somente pela presença do complexo, pois não há diferença estatística entre amostras irradiadas com UVA e não irradiadas, porém, o gráfico apresenta leve tendência a um efeito sinérgico da radiação com o complexo, aumentando o dano sobre as células. Raios UVB foram mais letais, e, aparentemente, há pouca ou nenhuma influência dos complexos nesse efeito. Possível causa para tais observações seria a hipótese de que radiação UVA induz a formação de ROS, especialmente radicais hidroxila, enquanto que raios UVB reagem diretamente com bases nitrogenadas do DNA, gerando dímeros de pirimidinas ou 6-4 fotoprodutos (Sinha e Hader, 2002; Bode e Dong, 2003; Pfeifer, You *et al.*, 2005). Dessa maneira, as espécies reativas geradas por meio de radiação UVA poderiam ser as responsáveis pelo efeito sinérgico negativo observado especialmente para MnCit e MnPPi, o que não estaria de acordo com os estudos em solução com os modelos de danos redox estudados (DHR e Tyr) caso essas espécies reativas fossem constituídas majoritariamente por peróxido. Entretanto, outras podem ter sido formadas. É provável ainda que o alvo mais prejudicado seja o DNA, já que os anéis aromáticos de suas bases nitrogenadas absorvem UV com bastante eficiência (Bode e Dong, 2003) e, presumivelmente, as ROS formadas estariam nas suas proximidades.



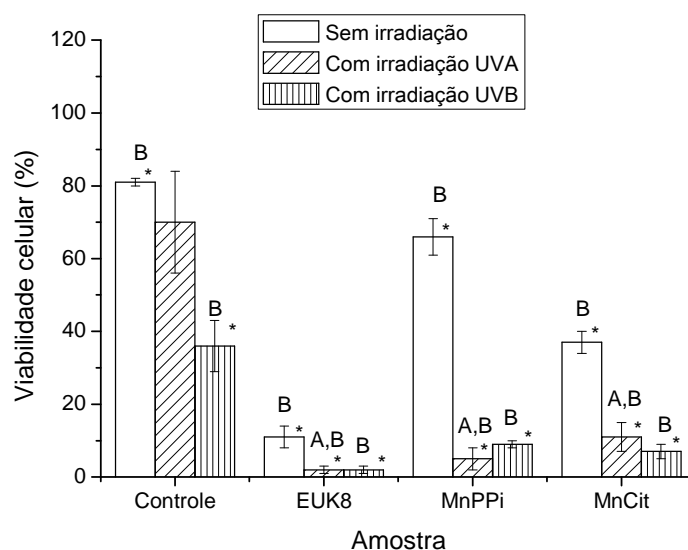
**Figura 28. Viabilidade Celular de culturas HeLa estressadas e não estressadas frente aos complexos em níveis de EC50 (significância estatística por método ANOVA: \* = significativamente diferentes comparadas ao controle não irradiado; A = significativamente diferentes comparadas ao controle irradiado com UVA).**

Culturas foram tratadas com os precursores em concentrações de ligantes iguais às que-las presentes nas soluções com os complexos a fim de observar a influência destes sobre os danos provocados às células. Os resultados (**Figura 29**) não mostraram diferenças significativas na viabilidade celular ( $p > 0,1$  em todos os casos), ou seja, o excesso de ligante presente não influencia na toxicidade verificada. Testes com  $\text{Mn}(\text{OAc})_3$  não foram conclusivos, pois, devido à sua baixa solubilidade em água, foi necessária dissolução do sal em DMSO em quantidade tal que impossibilitou diferenciar estatisticamente os danos provocados pela amostra daqueles relativos ao controle (cultura somente com o solvente).



**Figura 29. Viabilidade Celular de culturas HeLa não estressadas frente aos precursores (Cit e Ac 2 mM; PPI 300 µM) dos complexos (significância estatística por método ANOVA:  $p > 0,1$  para todas as combinações)**

O ascorbato (Asc) é conhecido como antioxidante, e foi dessa forma que ele atuou no teste com a DHR. Contudo, quando em meio DMEM utilizado nas culturas, ele se mostrou pró-oxidante, intensificando o dano provocado pelos complexos (**Figura 30**). Nas amostras controle não irradiadas, a viabilidade celular diminuiu cerca de 20% em relação às culturas sem Asc (comparem-se as Figuras 77 e 80). Novamente a radiação UVA isoladamente não foi capaz de provocar efeito significativo (comparada ao controle com Asc,  $p > 0,1$ ), ao contrário da UVB, a qual, dessa vez, mostrou um forte efeito sinérgico tóxico com os complexos e/ou o Asc (amostras tratadas comparadas com Controle de UVB,  $p < 0,05$ ). É provável que o Asc seja o principal responsável nesse caso, já que há pouca influência dos complexos nas amostras irradiadas com UVB nas placas sem adição desse ânion, haja vista as colônias não irradiadas e as estressadas com UVA terem sido muito mais prejudicadas do que no teste sem Asc.



**Figura 30. Viabilidade Celular de culturas HeLa estressadas e não estressadas frente aos complexos em níveis de EC50 em presença de Asc 40  $\mu$ M (significância estatística por método ANOVA: \* = significativamente diferentes comparadas ao controle sem ascorbato não irradiado; A = significativamente diferentes comparadas ao controle sem ascorbato irradiado com UVA; B = significativamente diferentes comparadas ao controle com ascorbato não irradiado).**

Numa tentativa de ganhar maior compreensão desse comportamento ambíguo do ascorbato *em um modelo em solução*, novos estudos com DHR foram feitos, mas dessa vez em meio DMEM e em triplicata, e suas emissões de fluorescência ao longo de 2 h foram registradas (**Figuras A48 a A50 – Anexo I**). O ascorbato não parece facilitar a oxidação da DHR, entretanto, e ao contrário do observado anteriormente (**Figuras A12 a A15 – Anexo I**), a presença do ascorbato neste ensaio não atenua a oxidação dos complexos, exceto para o MnPPi (**Figura 31**). Baixa ação antioxidante na maioria das soluções sugere que moléculas presentes no meio DMEM podem ter reagido com o Asc, deixando-o indisponível para inibir estresse oxidativo.

Em meio celular, os radicais gerados pelos raios UV podem ter favorecido a formação de radical ascorbila, causando maior dano às células. Levando em conta a menor eficiência de



UVA em reagir com o DNA (Sinha e Hader, 2002), isso explica porque houve maior efeito sinérgico nas amostras com UVB. Outra hipótese seria a redução do Mn(III) a Mn(II) pelo Asc, facilitando a entrada (e, portanto, a sobrecarga) do metal na célula através dos canais de cálcio (Shibuya e Douglas, 1992). Como não se percebe ação pró-oxidante do ascorbato em DMEM sem cultivo de células, supõe-se que a segunda alternativa seja mais crível.

De qualquer maneira, estes resultados apontam para um possível problema no uso de antioxidantes “tradicionais” em situações de sobrecarga de metal e estresse tecidual. Associações deletérias entre ferro e ascorbato, nas quais a molécula orgânica mantém o íon metálico na forma ferrosa (e, portanto, redox-ativa), já foram bem descritas e representam um problema em estratégias de nutrição que usam vitamina C como facilitadora da absorção de ferro da dieta (Esposito, Breuer *et al.*, 2003; Espósito, 2007).

O tratamento com PAS não é conclusivo, pois a duplicata do teste foi contaminada e não foi possível um novo plaqueamento. Entretanto, há aparente melhora nas amostras não irradiadas e tratadas com os complexos (**Figura 32**).

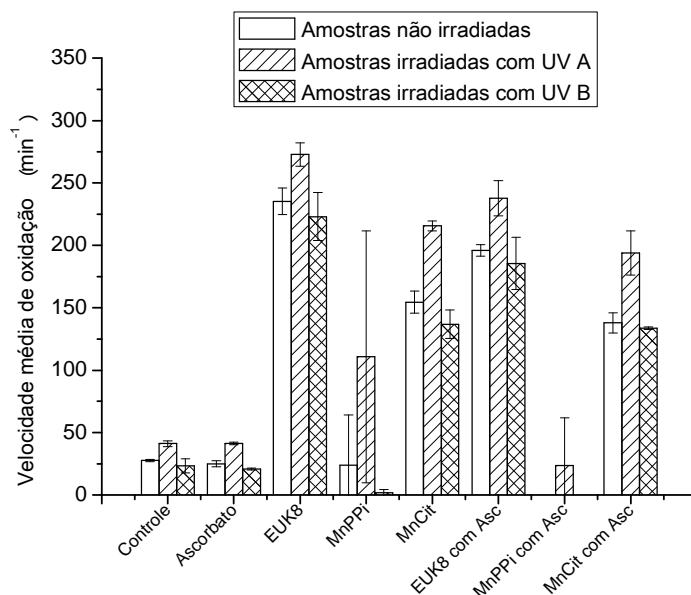


Figura 31. Comparativo entre valores de oxidação da DHR 50 μM pelos complexos em níveis de EC50 com e sem ascorbato 40 μM em meio DMEM.

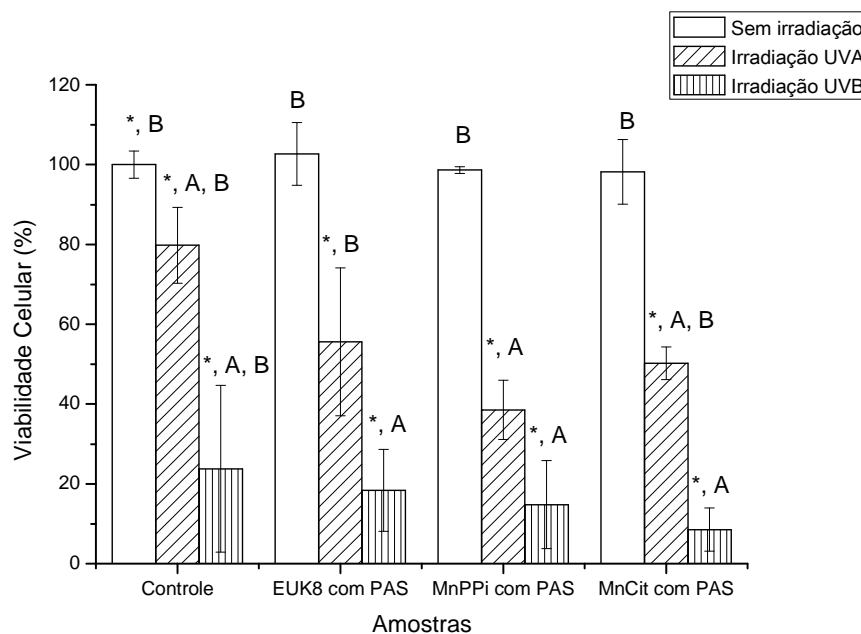


Figura 32. Viabilidade Celular de culturas HeLa estressadas e não estressadas frente aos complexos em níveis de EC50 em presença de NaPAS 200 μM (significância estatística por método ANOVA: \* = significativamente diferentes comparadas ao controle não irradiado; A = significativamente diferentes comparadas ao controle irradiado com UVA; B = significativamente diferentes comparadas ao controle irradiado com UVB).

## 5 CONCLUSÕES

- 1) Complexos simples de Mn(III) (MnCit, MnPPi) isoladamente apresentam ação pró-oxidante, conforme marcadores de danos oxidativos (DHR, Tyr, DA). Na presença de peróxido, esse efeito é abolido, provavelmente pela redução do íon metálico.
- 2) O complexo EUK8, mimético de enzimas antioxidantes como a catalase e a superóxido-dismutase, isoladamente não apresenta efeito sobre os marcadores de danos oxidativos mencionados. Entretanto, em presença de peróxido, pode exacerbar o efeito pró-oxidante sobre os mesmos, provavelmente pela formação e persistência de espécies Mn(oxo).
- 3) O quelante PAS, única linha de tratamento para casos de sobrecarga de Mn, é um quelante lento para Mn(III), embora seja antioxidante contra os marcadores de dano oxidativo em solução. Sua eficácia para o tratamento de sobrecarga cerebral de Mn, onde o metal encontra-se majoritariamente em sua forma trivalente, é discutível.
- 4) O uso da sonda DHR como substituta de ensaios mais demorados (como formação de ditirosina e luminescência da dopamina) é justificável, pois apresenta uma correlação interessante de resultados. Sua facilidade de execução e sua natureza como método analítico de alto desempenho são muito convenientes.
- 5) Os testes biológicos indicam que CGC é mais suscetível à intoxicação por Mn do que um modelo de célula tumoral (HeLa), o que é coerente com a diferença fisiológica entre ambas.
- 6) A pré-irradiação de HeLa com UVA mostrou-se deletéria quando em associação ao tratamento com MnCit e MnPPi, possivelmente devido à interação com ROS

formados, o que se relacionaria com os dados de atividade oxidante usando-se sondas em solução caso as espécies formadas fossem outras que o peróxido.

- 7) A presença de ascorbato no meio de cultura provocou uma diminuição generalizada de viabilidade de HeLa quando tratada com irradiação UV + complexos, de forma que possível redução de Mn(III) a Mn(II) pelo Asc induzindo maior incorporação de manganês nas células, é uma hipótese razoável para explicar tal fenômeno.
- 8) A administração de PAS sobre células irradiadas e expostas às espécies de Mn não resgatou a viabilidade das mesmas.
- 9) A toxicidade do Mn depende de sua especiação, do alvo biológico, e da presença de outros cofatores tradicionalmente reputados como anti- ou pró-oxidantes (respectivamente, ascorbato e peróxido).

## 6 REFERÊNCIAS

Amaral, S. e B. Espósito. Fluorimetric study of the pro-oxidant activity of EUK8 in the presence of hydrogen peroxide. BioMetals, v.21, n.4, p.425-432. 2008.

Arndt, A. Síntese, caracterização e estudo da ação neurotóxica de complexos de manganês(III) em *Danio rerio*. IQ, USP, São Paulo, 2009a.

\_\_\_\_\_. Síntese, caracterização e estudo da ação neurotóxica de complexos de manganês(III) em *Danio rerio* IQ, USP, São Paulo, 2009b.

Aschner, M. e J. L. Aschner. Manganese neurotoxicity: Cellular effects and blood-brain barrier transport. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, v.15, n.3, p.333-340. 1991.

Aschner, M., T. S. R. Guilarte, *et al.* Manganese: Recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. Toxicology and Applied Pharmacology, v.221, n.2, p.131-147. 2007.

Baltacioglu, E., F. A. Akalin, *et al.* Protein carbonyl levels in serum and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. Archives of oral biology, v.53, n.8, p.716-722. 2008.

Benedetto, A., C. Au, *et al.* Manganese-Induced Dopaminergic Neurodegeneration: Insights into Mechanisms and Genetics Shared with Parkinson's Disease. Chemical Reviews, v.109, n.10, 2012/02/12, p.4862-4884. 2009.

Bode, A. M. e Z. Dong. Mitogen-Activated Protein Kinase Activation in UV-Induced Signal Transduction. 2003: re2- p. 2003.

Boyes, W. K. Essentiality, Toxicity, and Uncertainty in the Risk Assessment of Manganese. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, v.73, n.2-3, 2012/02/12, p.159-165. 2010.

Brown, D. R., Koslowzki, H., Valensin, G. Metalochemistry of neurodegeneration, biological, chemical and genetical aspects: Springer Verlag NY. 2006

Crossgrove, J. S., D. D. Allen, *et al.* Manganese Distribution Across the Blood-Brain Barrier: I. Evidence for Carrier-Mediated Influx of Manganese Citrate as Well as Manganese and Manganese Transferrin. NeuroToxicology, v.24, n.1, p.3-13. 2003.

Deloncle, R., O. Guillard, *et al.* Free radical generation of protease-resistant prion after substitution of manganese for copper in bovine brain homogenate. NeuroToxicology, v.27, n.3, p.437-444. 2006.

Dimarco, T. e C. Giulivi. Current analytical methods for the detection of dityrosine, a biomarker of oxidative stress, in biological samples. Mass Spectrometry Reviews, v.26, n.1, p.108-120. 2007.

Doctrow, S. R., K. Huffman, *et al.* Salen<sup>^</sup>Manganese Complexes as Catalytic Scavengers of Hydrogen Peroxide and Cytoprotective Agents: <sup>^</sup>Structure<sup>^</sup>Activity Relationship Studies. Journal of Medicinal Chemistry, v.45, n.20, 2012/02/12, p.4549-4558. 2002.

Espósito, B. P. Redox-active labile iron in fortified flours from the Brazilian market. Revista de Nutrição, v.20, n.4, p.379-385. 2007.

Esposito, B. P., W. Breuer, *et al.* Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation. 102: 2670-2677 p. 2003.

Espósito, B. P., W. Breuer, *et al.* Labile iron in parenteral iron formulations and its potential for generating plasma nontransferrin-bound iron in dialysis patients. European Journal of Clinical Investigation, v.32, p.42-49. 2002.

Fang Zhao, Tongjian Cai, *et al.* Manganese Induces Dopaminergic Neurodegeneration via Microglial Activation in a Rat Model of Manganism. Toxicological sciences, v.107, n.1, p.156-164. 2009.

Fields, R. e H. B. F. Dixon. Micro Method for determination of reactive carbonyl groups in proteins and peptides, using 2,4-Dinitrophenylhydrazine. Biochemical Journal, v.121, p.587-589. 1971.

Freeland-Graves, J. H., T. Bose, *et al.* Manganese metallotherapeutics. In: M. Gielen e E. R. T. Tiekkink (Ed.). Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents: John Wiley & Sons, 2005. Manganese metallotherapeutics, p.159-178

Giulivi, C., N. J. Traaseth, *et al.* Tyrosine oxidation products: analysis and biological relevance. Amino Acids, v.25, n.3, p.227-232. 2003.

Glebska, J. e W. H. Koppenol. Peroxynitrite-mediated oxidation of dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine. Free Radical Biology and Medicine, v.35, n.6, p.676-682. 2003.

Gunter, T. E., B. Gerstner, *et al.* An analysis of the effects of Mn<sup>2+</sup> on oxidative phosphorylation in liver, brain, and heart mitochondria using state 3 oxidation rate assays. Toxicology and Applied Pharmacology, v.249, n.1, p.65-75. 2010.

Halliwell, B. e J. M. C. Gutteridge. Free Radicals in Biology and Medicine: Oxford University Press. 2007

Hoganson, C. W. e G. T. Babcock. A Metalloradical Mechanism for the Generation of Oxygen from Water in Photosynthesis. 277: 1953-1956 p. 1997.

Hong, L., W. Jiang, *et al.* Brain Regional Pharmacokinetics of p-Aminosalicylic Acid and Its N-Acetylated Metabolite: Effectiveness in Chelating Brain Manganese. 39: 1904-1909 p. 2011.

Joly, A., J. Lambert, *et al.* Reduced Atmospheric Manganese in Montreal Following Removal of Methylcyclopentadienyl Manganese Tricarbonyl (MMT). 20: S106-S107 10.1097/01.ede.0000362372.19894.21 p. 2009.

Khalid, M., R. A. Aoun, *et al.* Altered striatal dopamine release following a sub-acute exposure to manganese. Journal of Neuroscience Methods, v.202, n.2, p.182-191. 2011.

Klegeris, A., L. G. Korkina, *et al.* Autoxidation of dopamine: A comparison of luminescent and spectrophotometric detection in basic solutions. Free Radical Biology and Medicine, v.18, n.2, p.215-222. 1995.

Klewicki, J. K. e J. J. Morgan. Kinetic Behavior of Mn(III) Complexes of Pyrophosphate, EDTA, and Citrate. Environmental Science & Technology, v.32, n.19, 2012/02/12, p.2916-2922. 1998.

L.J., B. Manganese schiff's base complexes: II: Synthesis and spectroscopy of chloro-complexes of some derivatives of (salicylaldehydeethylenediimato) manganese(III). Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry, v.36, n.3, p.531-536. 1974.

Lee, D.-I., S. Hwang, *et al.* A convenient preparation of dityrosine via Mn(III)-mediated oxidation of tyrosine. Process Biochemistry, v.43, n.9, p.999-1003. 2008.

Lide, D. R. CRC Handbook of Chemistry and Physics. 2006-2007

Liu, G. D., J. P. Liao, *et al.* Interaction of bis(ethylene)tin [bis(salicylidene)ethylenediamine] with DNA. Anal. Sci., v.18, n.4. 2002.

Ljung, K. e M. Vahter. Time to Re-evaluate the Guideline Value for Manganese in Drinking Water? Environ Health Perspect, v.115, n.11. 2007.

Lougheed, K. E. A., D. L. Taylor, *et al.* New anti-tuberculosis agents amongst known drugs. Tuberculosis (Edinburgh, Scotland), v.89, n.5, p.364-370. 2009.

Mario, E. Protein carbonyls in meat systems: A review. Meat Science, v.89, n.3, p.259-279. 2011.

Menezes-Filho, J. A., C. R. Paes, *et al.* High levels of hair manganese in children living in the vicinity of a ferro-manganese alloy production plant. NeuroToxicology, v.30, n.6, p.1207-1213. 2009.

Menezes, J. A., M. Bouchard, *et al.* Manganese exposure and the neuropsychological effect on children and adolescents: a review. Revista Panamericana de Salud Publica - Pan American Journal of Public Health, v.26, n.6, Dec, p.541-548. 2009.

Migheli, R., C. Godani, *et al.* Enhancing Effect of Manganese on L-DOPA-Induced Apoptosis in PC12 Cells. Journal of Neurochemistry, v.73, n.3, p.1155-1163. 1999.

Muscoli, C., S. Cuzzocrea, *et al.* On the selectivity of superoxide dismutase mimetics and its importance in pharmacological studies. British Journal of Pharmacology, v.140, n.3, p.445-460. 2003.

Nelson, M., T. Huggins, *et al.* Effects of p-Aminosalicylic acid on the neurotoxicity of manganese on the dopaminergic innervation of the cilia of the lateral cells of the gill of the bivalve mollusc, *Crassostrea virginica*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, v.151, n.2, p.264-270. 2010.

Nong, A., M. D. Taylor, *et al.* Manganese Tissue Dosimetry in Rats and Monkeys: Accounting for Dietary and Inhaled Mn with Physiologically based Pharmacokinetic Modeling. Toxicol Sci, v.108, n.1, p.22-34. 2009.

Nowak, P., K. Bojanek, *et al.* Ontogenetic Exposure of Rats to Pre- and Post-Natal Manganese Enhances Behavioral Impairments Produced by Perinatal 6-Hydroxydopamine. Neurotoxicity Research, v.19, n.4, p.536-543. 2010.



Ordoñez-Librado, J. L., V. Anaya-Martinez, *et al.* L-DOPA treatment reverses the motor alterations induced by manganese exposure as a Parkinson disease experimental model. Neuroscience Letters, v.471, n.2, p.79-82. 2010.

Park, E.-J. e K. Park. Induction of oxidative stress and inflammatory cytokines by manganese chloride in cultured T98G cells, human brain glioblastoma cell line. Toxicology in Vitro, v.24, n.2, p.472-479. 2010.

Parker, D. L., G. Sposito, *et al.* Manganese(III) binding to a pyoverdine siderophore produced by a manganese(II)-oxidizing bacterium. Geochimica et Cosmochimica Acta, v.68, n.23, p.4809-4820. 2004.

Pfeifer, G. P., Y.-H. You, *et al.* Mutations induced by ultraviolet light. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, v.571, n.1-2, p.19-31. 2005.

Pirinccioglu, A. G., D. Gokalp, *et al.* Malondialdehyde (MDA) and protein carbonyl (PCO) levels as biomarkers of oxidative stress in subjects with familial hypercholesterolemia. Clinical Biochemistry, v.43, n.15, p.1220-1224. 2010.

Reaney, S. H., G. Bench, *et al.* Brain accumulation and toxicity of Mn(II) and Mn(III) exposures. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology, v.93, n.1, p.114-24. 2006.

Ressler, T., J. Wong, *et al.* Quantitative Speciation of Mn-Bearing Particulates Emitted from Autos Burning (Methylcyclopentadienyl)manganese Tricarbonyl-Added Gasolines Using XANES Spectroscopy. Environmental Science & Technology, v.34, n.6, 2012/02/12, p.950-958. 2000.

Restani, P., C. Ballabio, *et al.* Characterization of bovine serum albumin epitopes and their role in allergic reactions. Allergy, v.59, p.21-24. 2004.

Roat-Malone, R. M. Bioinorganic Chemistry: A short course: Jonh Wiley & sons, Inc., Hoboken, New Jersey. 2002a

\_\_\_\_\_, Ed. Bioinorganic Chemistry: a short course: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. 2002b.

Routier, S., N. Cotellet, *et al.* Salen-anthraquinone Conjugates. Synthesis, DNA-binding and cleaving properties, effects on topoisomerases and cytotoxicity. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v.4, n.8, p.1185-1196. 1996.

Salvemini, D., C. Muscoli, *et al.* Superoxide Dismutase Mimetics. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics, v.15, n.5, p.439-447. 2002.

Santos, A. P. M. D., D. Milatovic, *et al.* Rat brain endothelial cells are a target of manganese toxicity. Brain Research, v.1326, n.0, p.152-161. 2010.

Saric, M. e R. Lucchini. Handbook of the Toxicology of Metals: Elsevier. 2007

Saúde, M. D. Portaria 518, 25/03/2004 2004.

Serra, P. A., G. Esposito, *et al.* Manganese increases L-DOPA auto-oxidation in the striatum of the freely moving rat: potential implications to L-DOPA long-term therapy of Parkinson's disease. British Journal of Pharmacology, v.130, n.4, p.937-945. 2000.

Shibuya, I. e W. W. Douglas. Calcium Channels in Rat Melanotrophs Are Permeable to Manganese, Cobalt, Cadmium, and Lanthanum, but Not to Nickel - Evidence Provided by Fluorescence Changes in Fura-2-Loaded Cells. Endocrinology, v.131, n.4, Oct, p.1936-1941. 1992.

Simon, M. Animal models of oxidative stress, aging, and therapeutic antioxidant interventions. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v.34, n.11, p.1395-1400. 2002.

Sinha, R. P. e D.-P. Hader. UV-induced DNA damage and repair: a review. Photochemical & Photobiological Sciences, v.1, n.4. 2002.

Trindade, D. F., G. Cerchiaro, *et al.* A Role for Peroxymonocarbonate in the Stimulation of Biothiol Peroxidation by the Bicarbonate/Carbon Dioxide Pair. Chemical Research in Toxicology, v.19, n.11, 2012/02/12, p.1475-1482. 2006.

Tsutomu, K. Catalytic asymmetric oxidations using optically active (salen)manganese(III) complexes as catalysts. Coordination Chemistry Reviews, v.140, n.0, p.189-214. 1995.

Ueno, Y., F. Horio, *et al.* Increase in Oxidative Stress in Kidneys of Diabetic Akita Mice. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, v.66, n.4, p.869-872. 2002.

Us-Epa. Health Effects Support Document for Manganese: EPA N° 822R03003 2003.

Verquin, G., G. Fontaine, *et al.* DNA modification by oxovanadium(IV) complexes of salen derivatives. Journal of Biological Inorganic Chemistry, v.9, n.3, p.345-353. 2004.

Who. Guidelines for drinking-water quality 2006.

Wilhelm, J., R. Vytášek, *et al.* Evaluation of different methods detecting intracellular generation of free radicals. Molecular and Cellular Biochemistry, v.328, n.1, p.167-176. 2009.

Winder, B. S., A. G. Salmon, *et al.* Inhalation of an essential metal: Development of reference exposure levels for manganese. Regulatory Toxicology and Pharmacology, v.57, n.2-3, p.195-199. 2009.

Wrona, M., K. Patel, *et al.* Reactivity of 2,7-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. Free Radical Biology and Medicine, v.38, n.2, p.262-270. 2005.

Yokel, R. A. Blood-brain barrier flux of aluminium, manganese, iron and other metals suspected to contribute to metal-induced neurodegeneration. Journal of Alzheimers Disease, v.10, n.2-3, Nov, p.223-253. 2006.

Yoon, H., G.-H. Lee, *et al.* The effects of 3, 4 or 5 amino salicylic acids on manganese-induced neuronal death: ER stress and mitochondrial complexes. Toxicology in Vitro, v.25, n.7, p.1259-1268. 2011.

## 7 ANEXO I: GRÁFICOS E TABELAS.

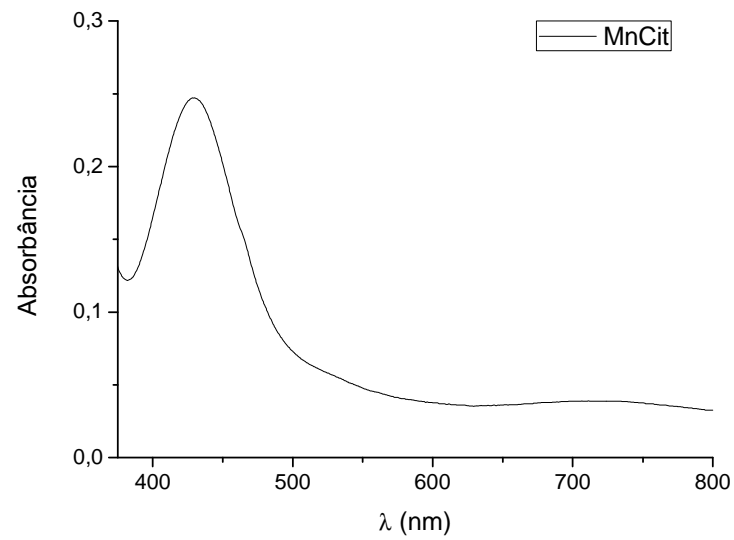


Figura A 1. Espectro na região do visível do MnCit em meio aquoso.

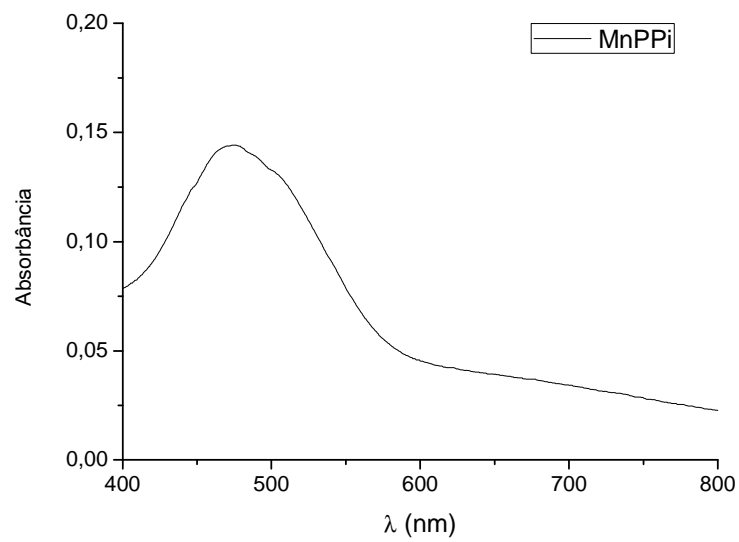


Figura A 2. Espectro na região do visível do MnPPi em meio aquoso.

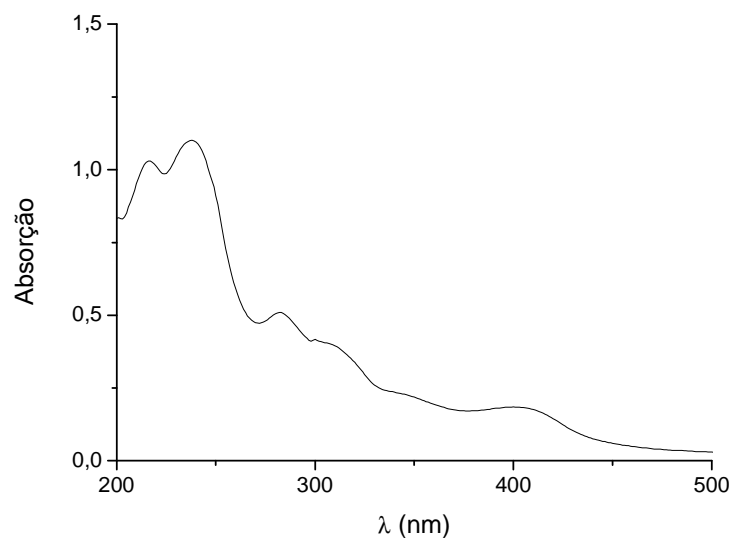
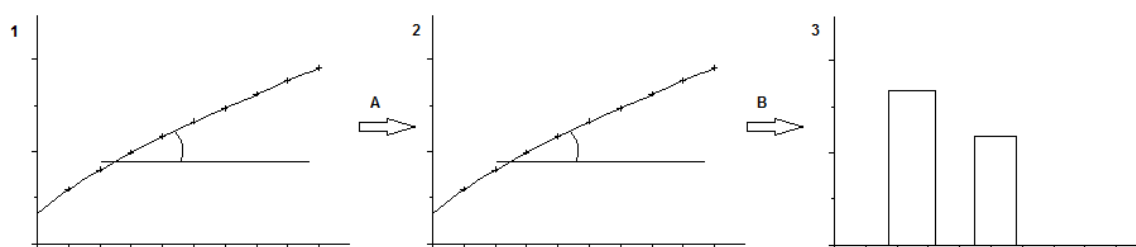


Figura A 3. Espectro na região do visível do EUK8 em etanol.

Tabela A 1. Análise elementar do complexo EUK8. (Arndt, 2009b)

	% C	% H	% N
<b>Teórico</b>	48,93	4,62	7,13
<b>Experimental</b>	49,95	3,68	7,19



### Esquema A1

Gráfico 1 - Intensidade de fluorescência da rodamina em função do tempo (velocidade de oxidação da DHR).

Gráfico 2 - Aumento da intensidade de fluorescência da rodamina com o tempo em função da concentração do complexo (aceleração da oxidação da DHR).

Gráfico 3 - Aumento da intensidade de fluorescência da rodamina conforme decorrer do tempo e aumento da concentração do complexo ( $k_{obs}$ ).

Etapa A – Inclinação da curva do gráfico 1 (intensidade de fluorescência  $\cdot t^{-1}$ ).

Etapa B – Inclinação da curva do gráfico 2 (intensidade de fluorescência  $\cdot t^{-1} \cdot \text{concentração do complexo}^{-1}$ )

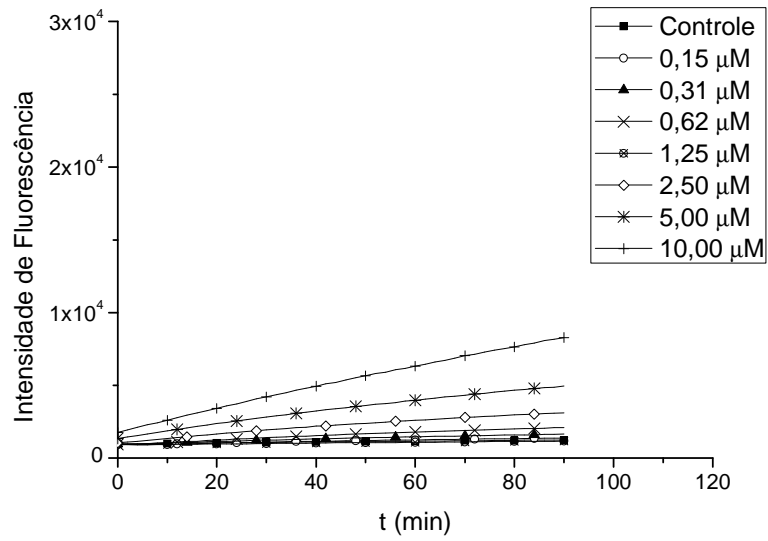


Figura A 4. Velocidade de oxidação da DHR 50  $\mu M$  por  $Mn(OAc)_3$  0 - 10  $\mu M$ .

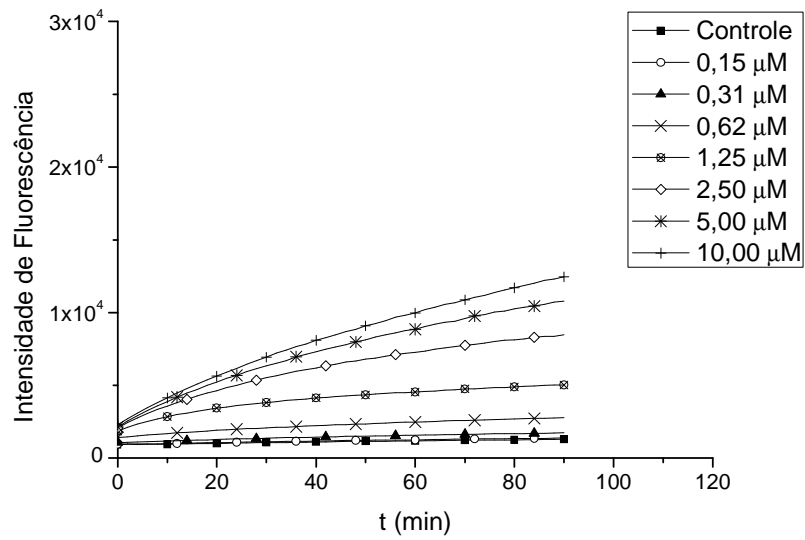


Figura A 5. Velocidade de oxidação da DHR 50  $\mu M$  por  $MnCit$  0 - 10  $\mu M$ .

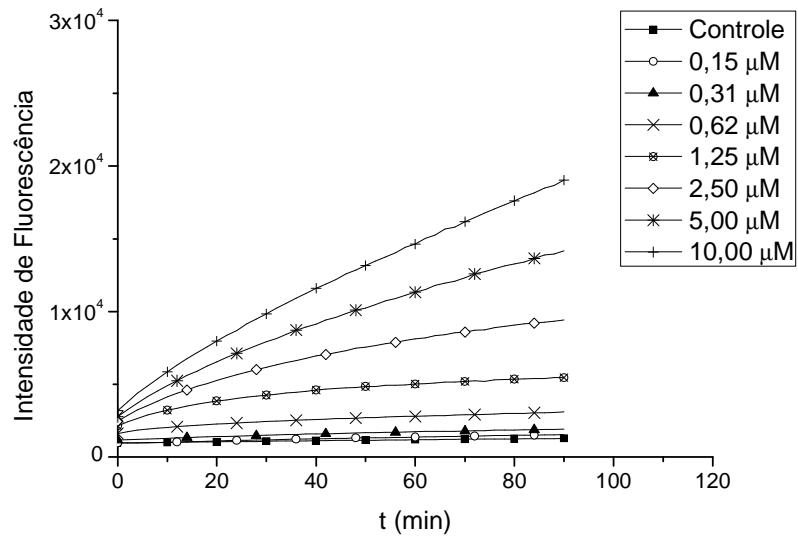


Figura A 6. Velocidade de oxidação da DHR 50 µM por MnPPi 0 - 10 µM.

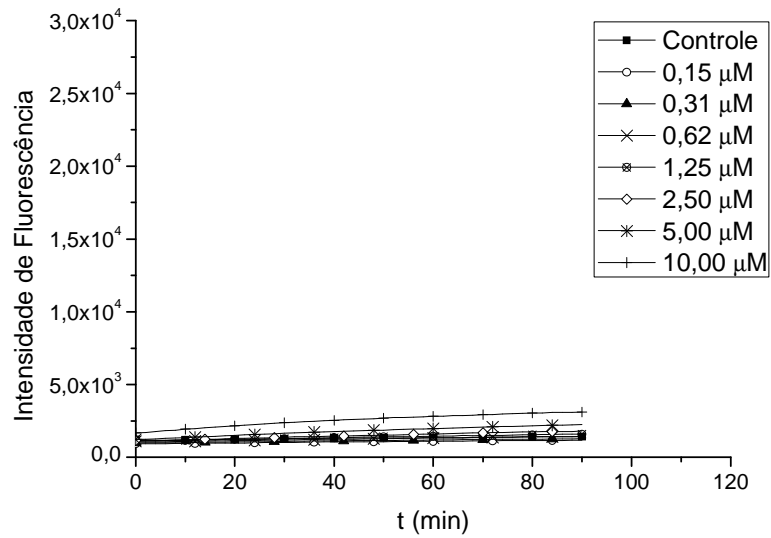


Figura A 7. Velocidade de oxidação da DHR 50 µM por EUK8 0 - 10 µM.

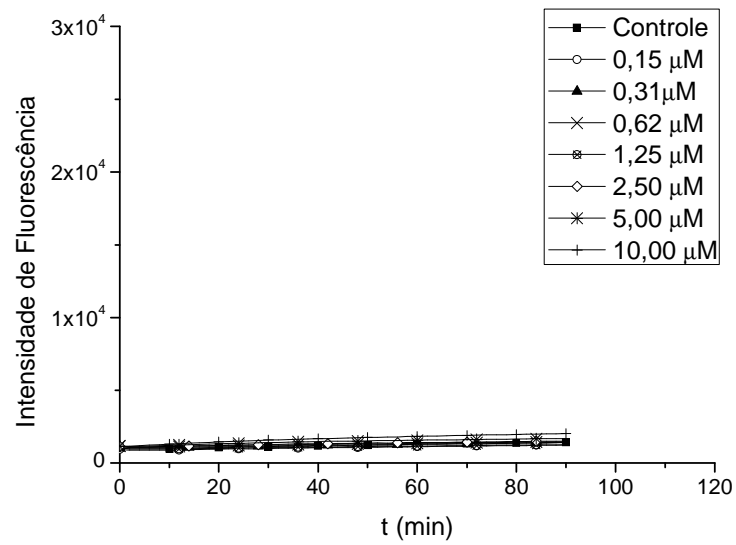


Figura A 8. Velocidade de oxidação da DHR 50 µM por Mn(OAc)<sub>3</sub> 0 - 10 µM na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 µM.

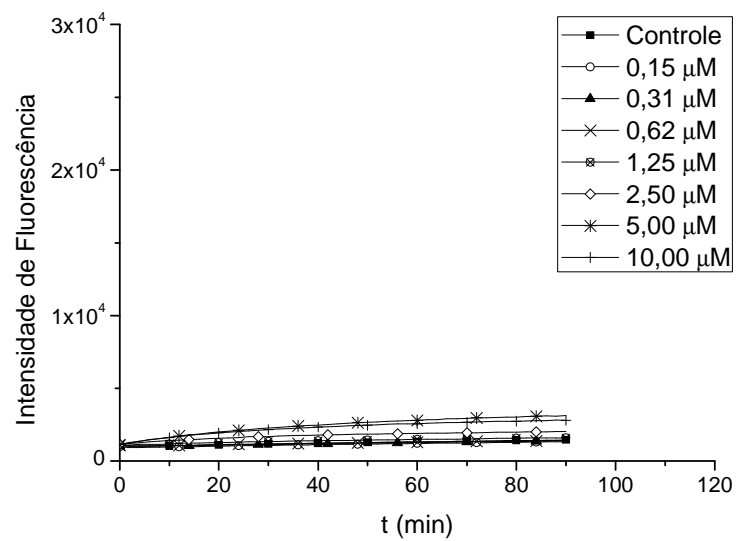


Figura A 9. Velocidade de oxidação da DHR 50 µM por MnCit 0 - 10 µM na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 µM.



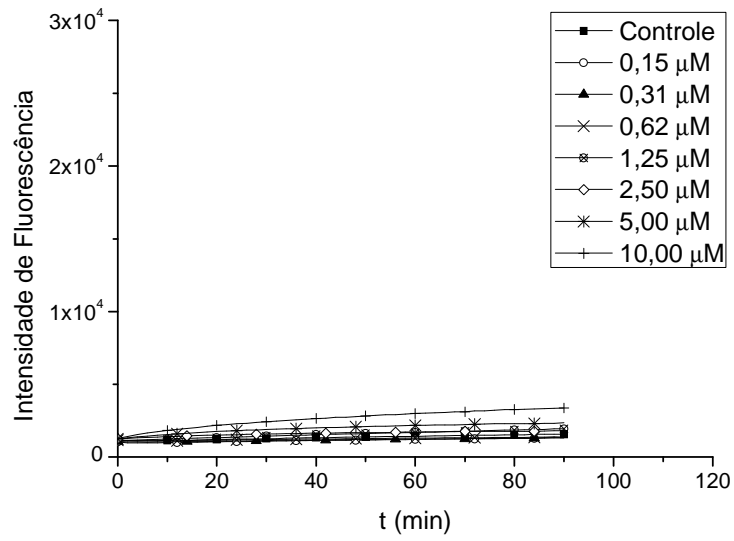


Figura A 10. Velocidade de oxidação da DHR 50  $\mu\text{M}$  por MnPPi 0 - 10  $\mu\text{M}$  na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  50  $\mu\text{M}$ .

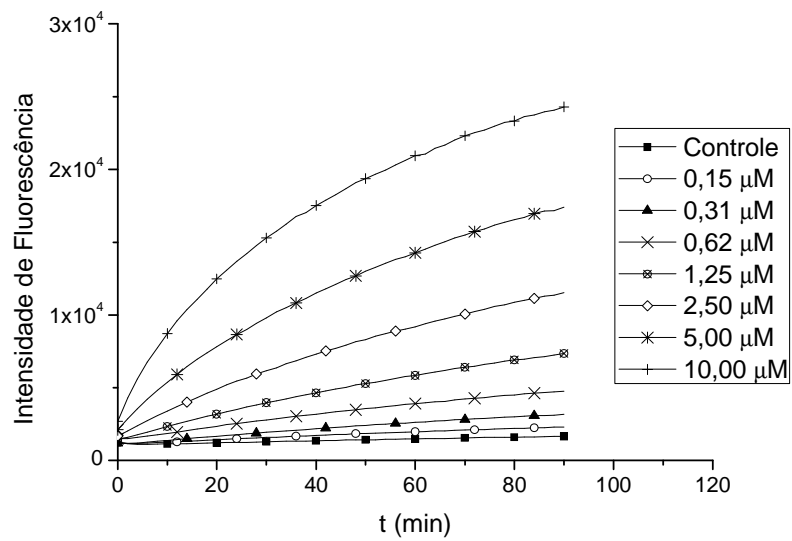


Figura A 11. Velocidade de oxidação da DHR 50  $\mu\text{M}$  por EUK8 0 - 10  $\mu\text{M}$  na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  50  $\mu\text{M}$ .

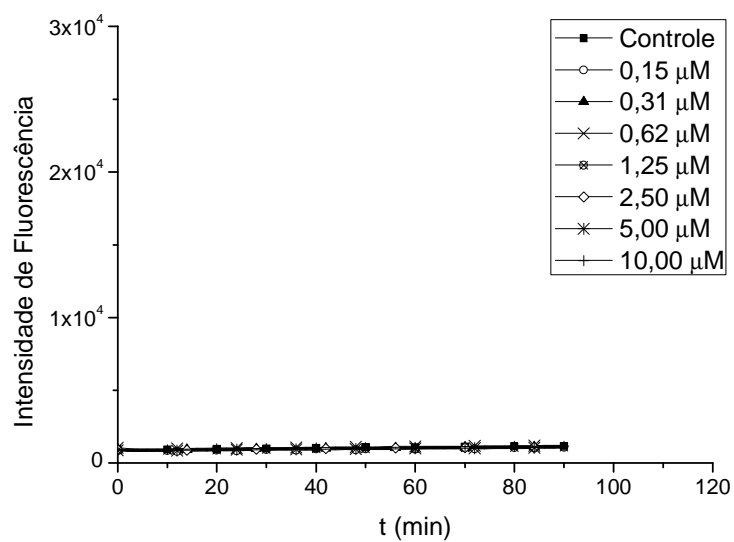


Figura A 12. Velocidade de oxidação da DHR 50 µM por Mn(OAc)<sub>3</sub> 0 - 10 µM na presença de ascorbato 40 µM.

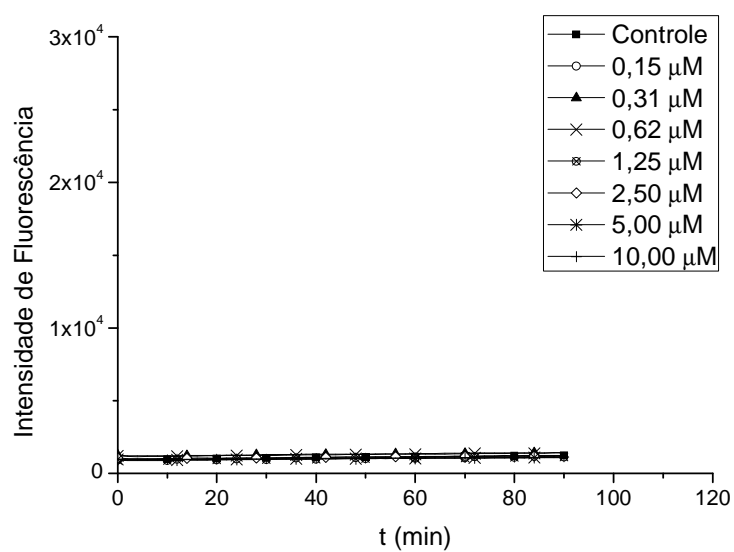


Figura A 13. Velocidade de oxidação da DHR 50 µM por MnCit 0 - 10 µM na presença de ascorbato 40 µM.

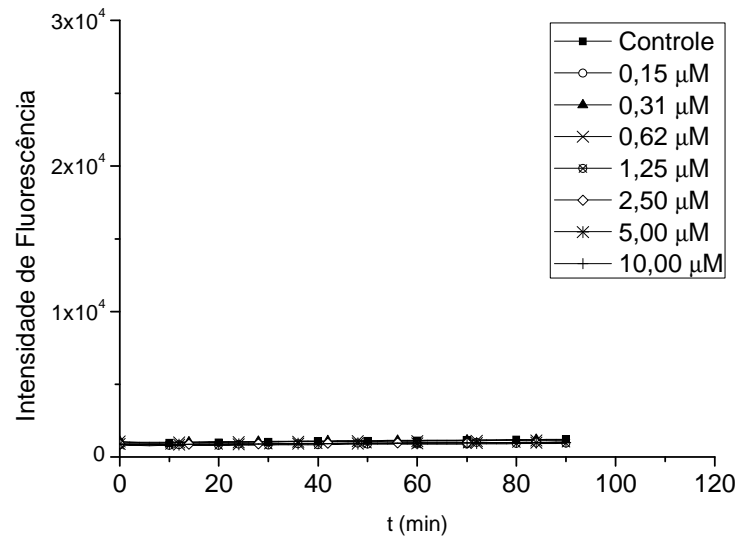


Figura A 14. Velocidade de oxidação da DHR 50  $\mu\text{M}$  por MnPPi 0 - 10  $\mu\text{M}$  na presença de ascorbato 40  $\mu\text{M}$ .

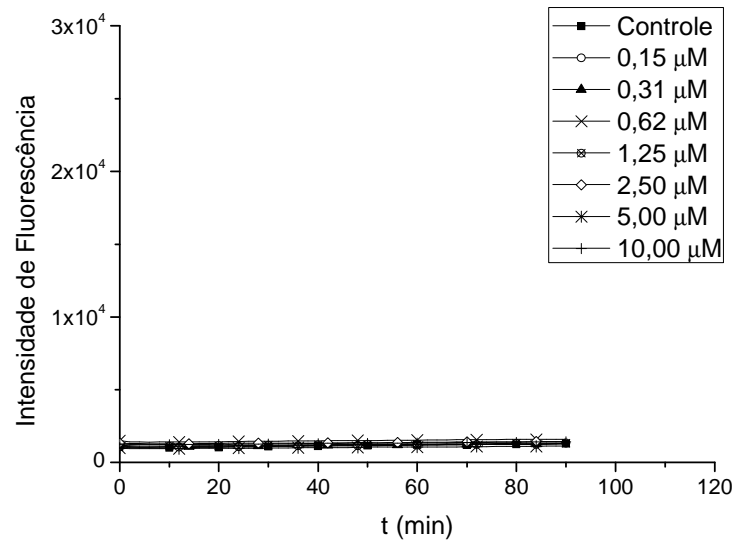


Figura A 15. Velocidade de oxidação da DHR 50  $\mu\text{M}$  por EUK8 0 - 10  $\mu\text{M}$  na presença de ascorbato 40  $\mu\text{M}$ .

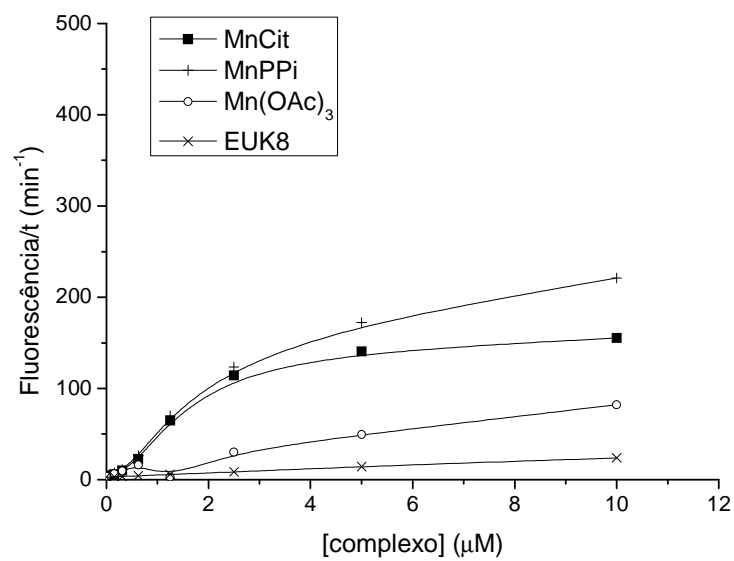


Figura A 16. Aceleração da oxidação da DHR 50 μM pelos complexos.

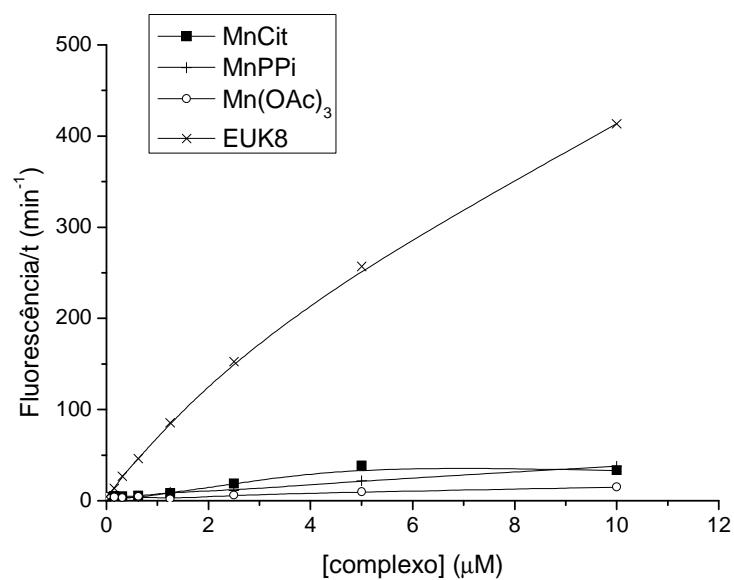


Figura A 17. Aceleração da oxidação da DHR 50 μM pelos complexos na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 μM.

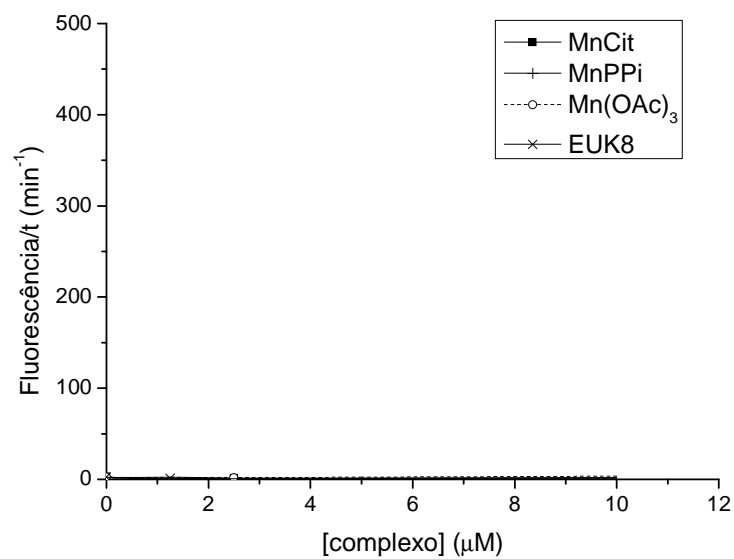


Figura A 18. Aceleração da oxidação da DHR 50 μM pelos complexos na presença de ascorbato 40 μM.

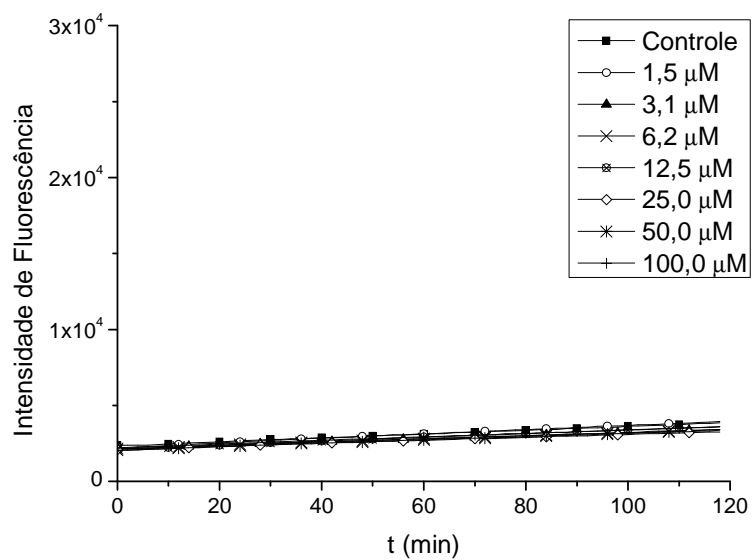


Figura A 19. Velocidade de oxidação da DHR 50 μM por NaOAc 0 – 100 μM.

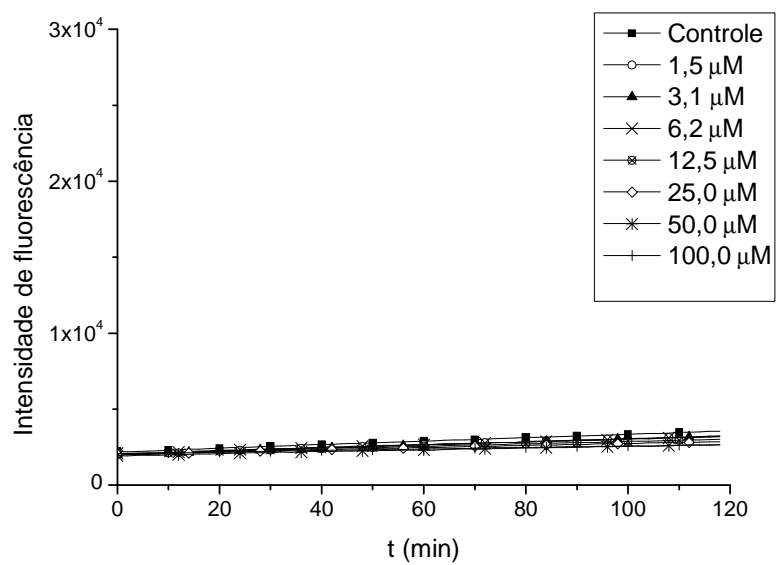


Figura A 20. Velocidade de oxidação da DHR 50 µM por Na<sub>3</sub>Cit 0 – 100 µM.

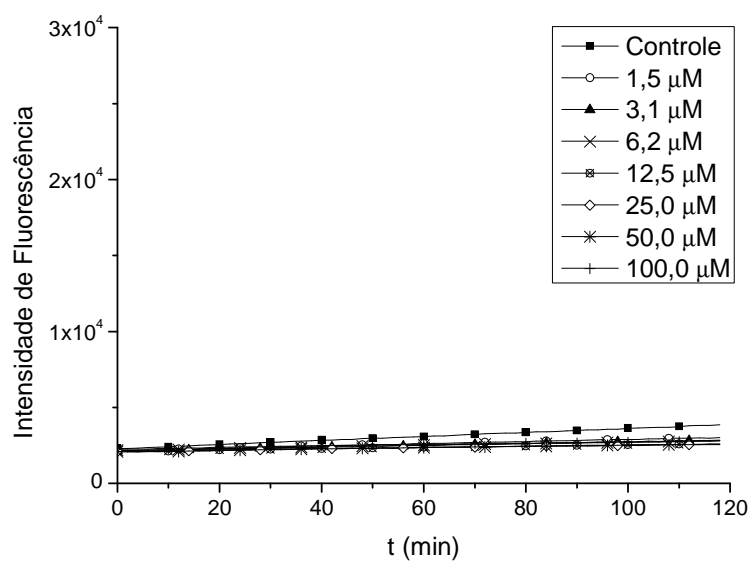


Figura A 21. Velocidade de oxidação da DHR 50 µM por Na<sub>4</sub>PPi 0 – 100 µM.

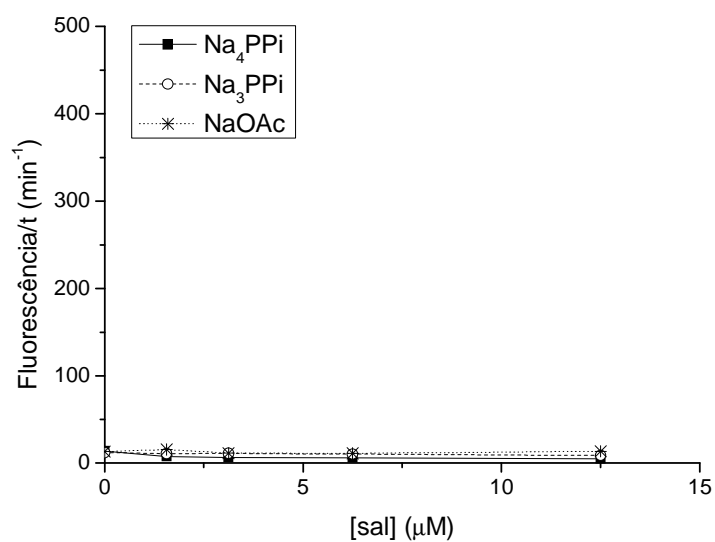


Figura A 22. Aceleração da oxidação da DHR 50  $\mu\text{M}$  pelos sais sódicos precursores dos complexos.

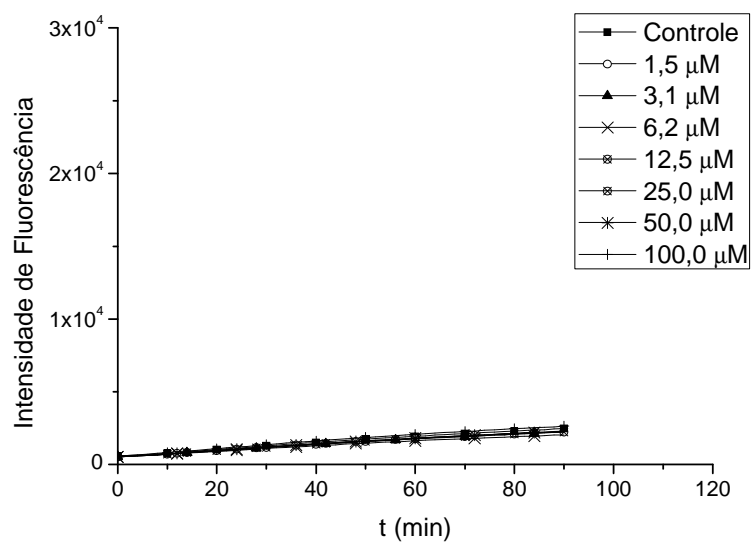


Figura A 23. Velocidade de oxidação da DHR 50  $\mu\text{M}$  por  $\text{Mn}(\text{OAc})_3$  10  $\mu\text{M}$  na presença de PAS 0 - 100  $\mu\text{M}$ .

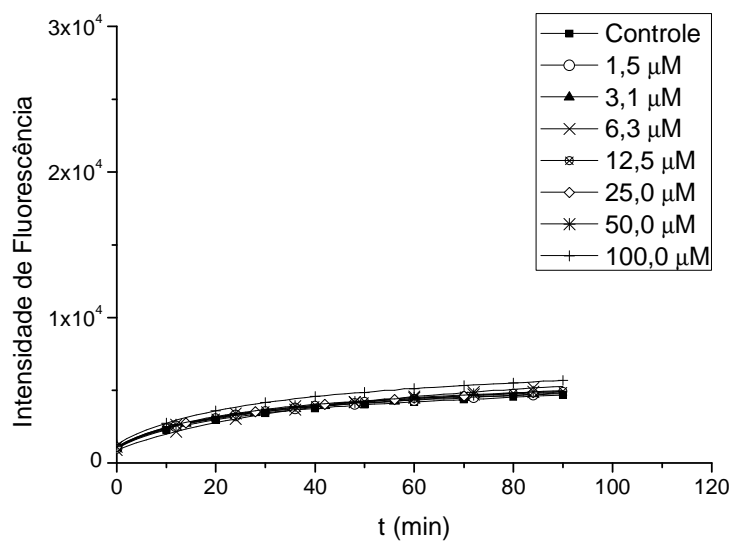


Figura A 24. Velocidade de oxidação da DHR 50  $\mu\text{M}$  por MnCit 10  $\mu\text{M}$  na presença de PAS 0 - 100  $\mu\text{M}$ .

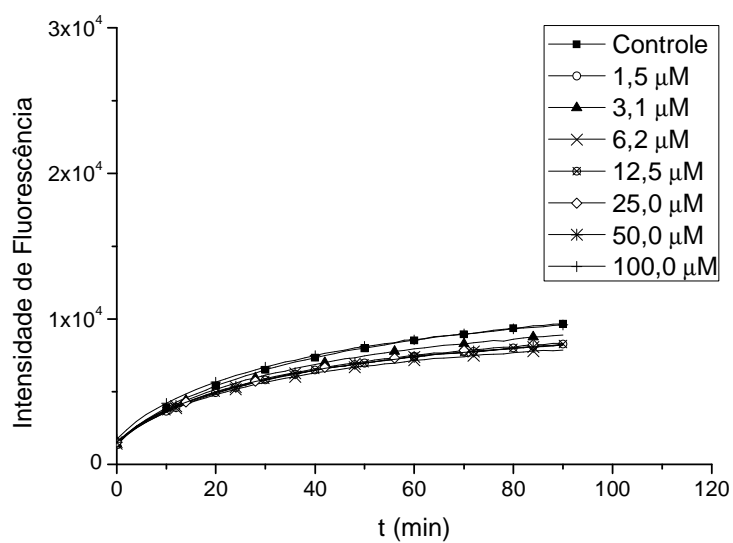


Figura A 25. Velocidade de oxidação da DHR 50  $\mu\text{M}$  por MnPPi 10  $\mu\text{M}$  na presença de PAS 0 - 100  $\mu\text{M}$ .



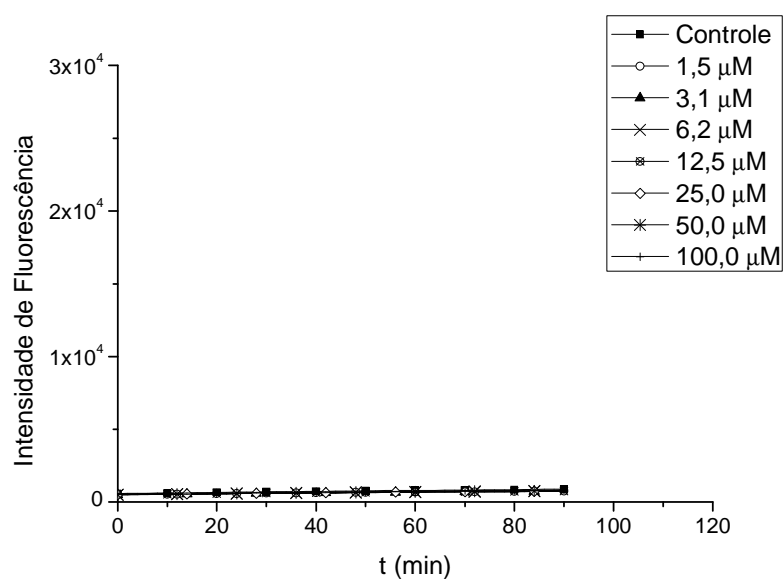


Figura A 26. Velocidade de oxidação da DHR 50  $\mu\text{M}$  por EUK8 10  $\mu\text{M}$  na presença de PAS 0 - 100  $\mu\text{M}$ .

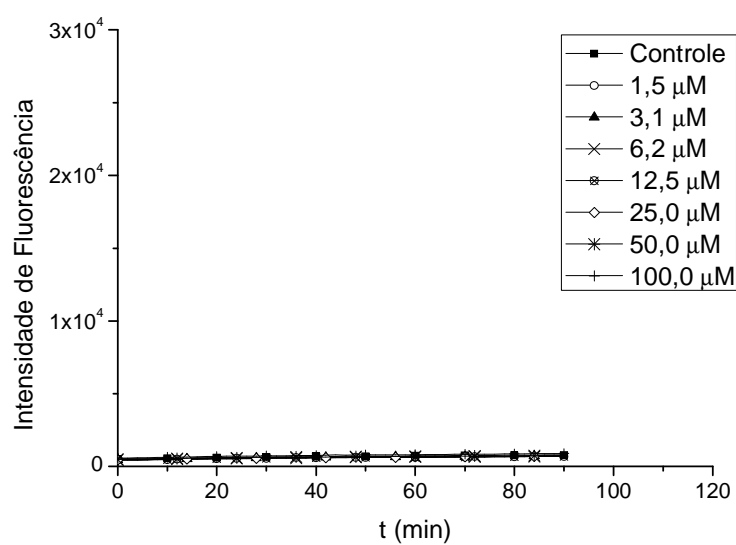


Figura A 27. Velocidade de oxidação da DHR 50  $\mu\text{M}$  por  $\text{Mn}(\text{OAc})_3$  10  $\mu\text{M}$  na presença  $\text{H}_2\text{O}_2$  50  $\mu\text{M}$  e PAS 0 - 100  $\mu\text{M}$ .

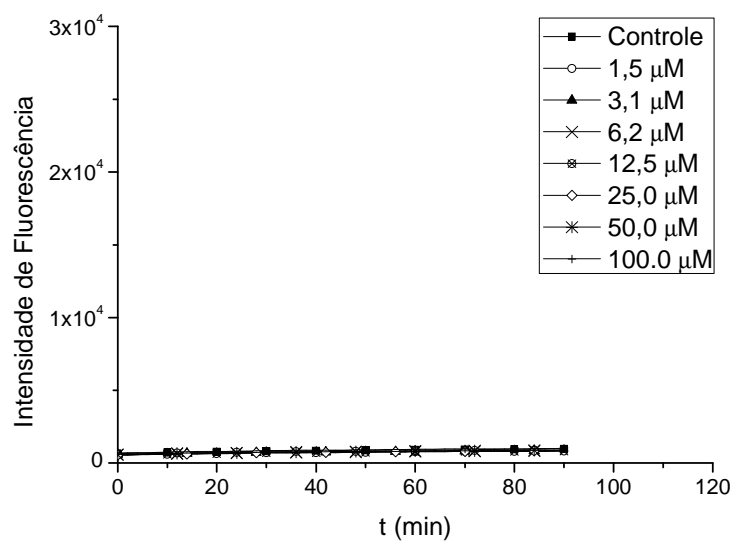


Figura A 28. Velocidade de oxidação da DHR 50 µM por MnCit 10 µM na presença H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 µM e PAS 0 - 100 µM.

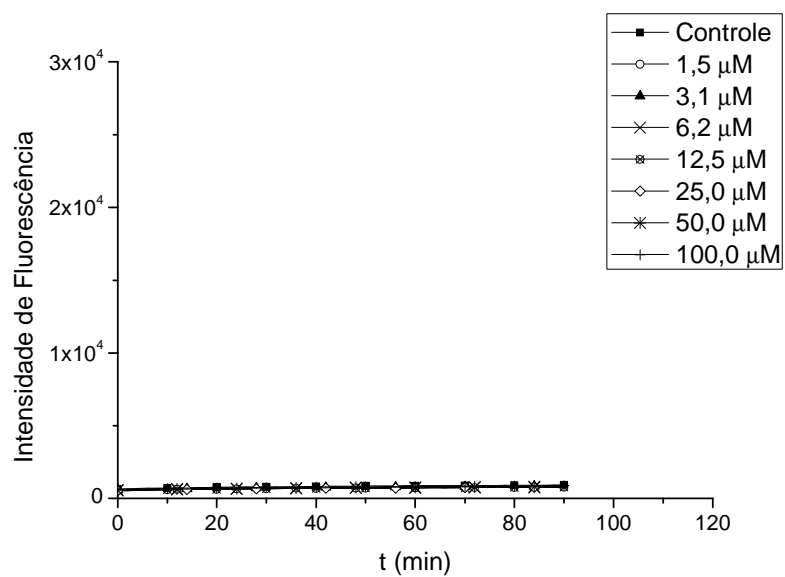


Figura A 29. Velocidade de oxidação da DHR 50 µM por MnPPi 10 µM na presença H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 µM e PAS 0 - 100 µM.

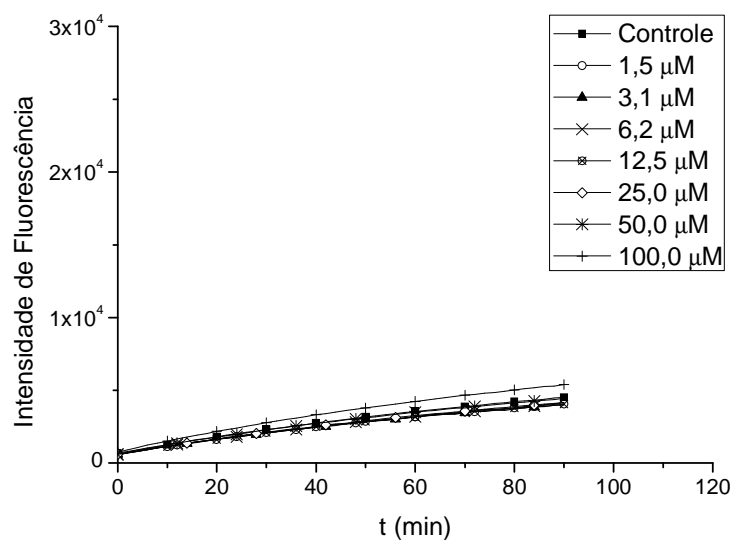


Figura A 30. Velocidade de oxidação da DHR 50  $\mu\text{M}$  por EUK8 10  $\mu\text{M}$  na presença  $\text{H}_2\text{O}_2$  50  $\mu\text{M}$  e PAS 0 - 100  $\mu\text{M}$ .

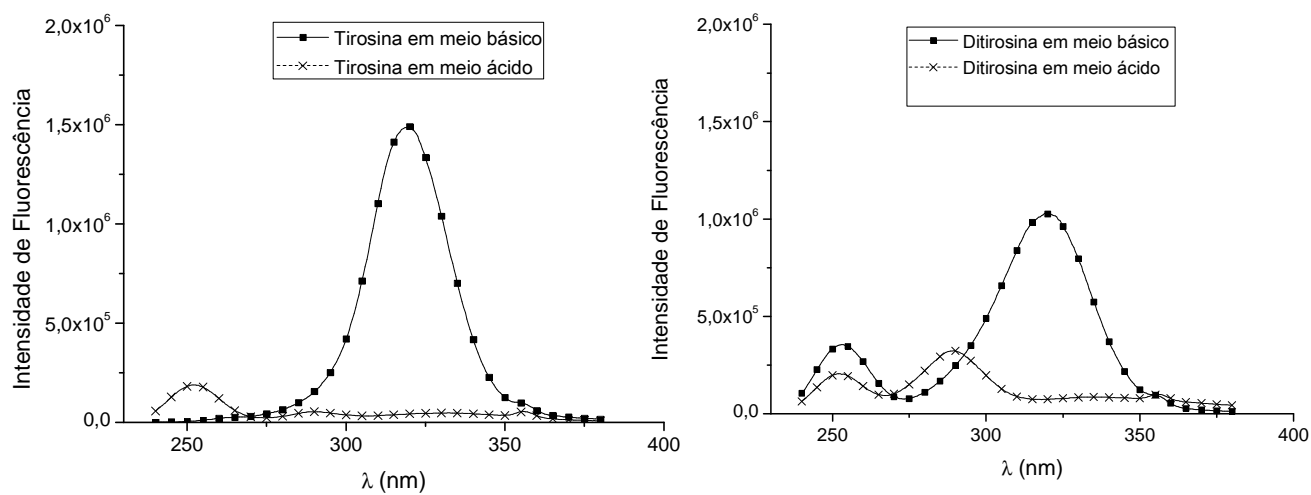


Figura A 31. Espectro de excitação ( $\lambda_{\text{emis}} = 406 \text{ nm}$ ) de soluções ácida e básica de tirosina 1 mM e de ditirosina gerada a partir de soluções de tirosina 1 mM reagida com acetato de Mn(III).

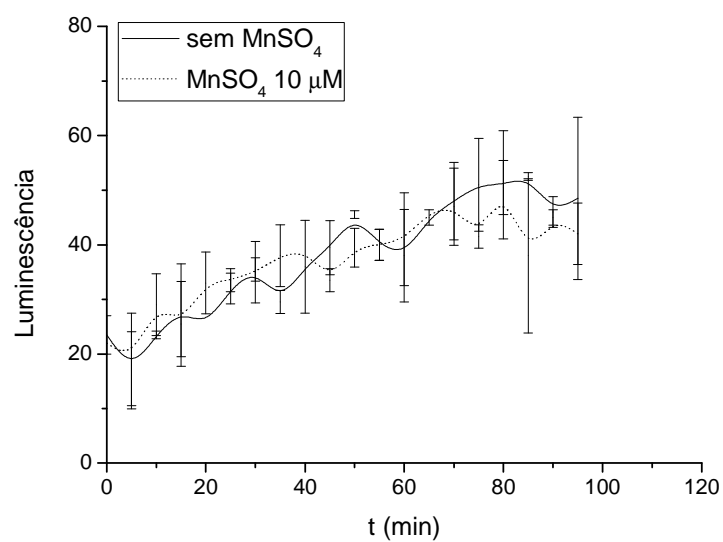


Figura A 32. Luminescência de soluções de DA 500 μM com e sem MnSO<sub>4</sub>.

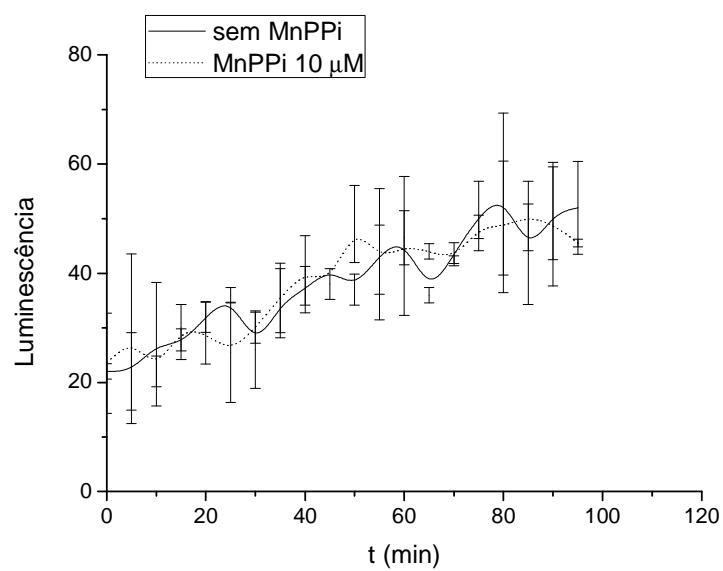


Figura A 33. Luminescência de soluções de DA 500 μM com e sem MnPPi.

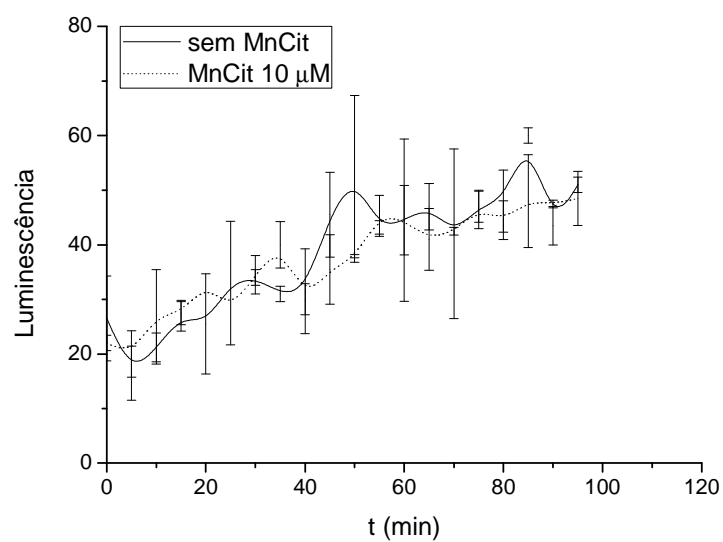


Figura A 34. Luminescência de soluções de DA 500  $\mu$ M com e sem MnCit.

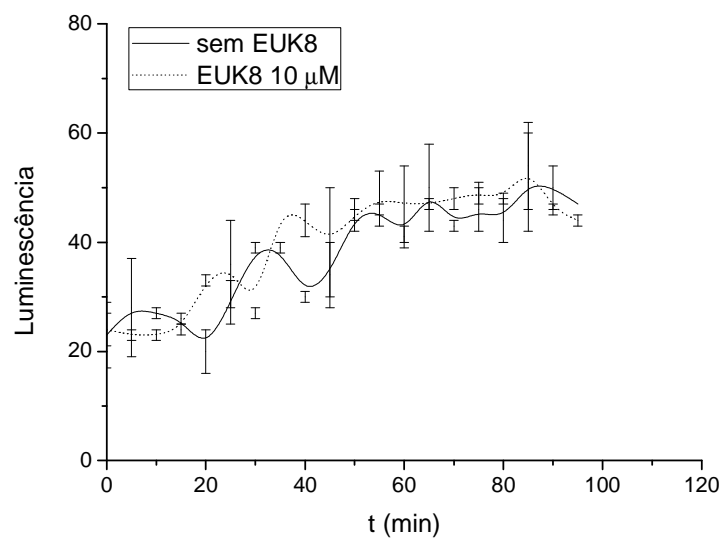


Figura A 35. Luminescência de soluções de DA 500  $\mu$ M com e sem EUK8.

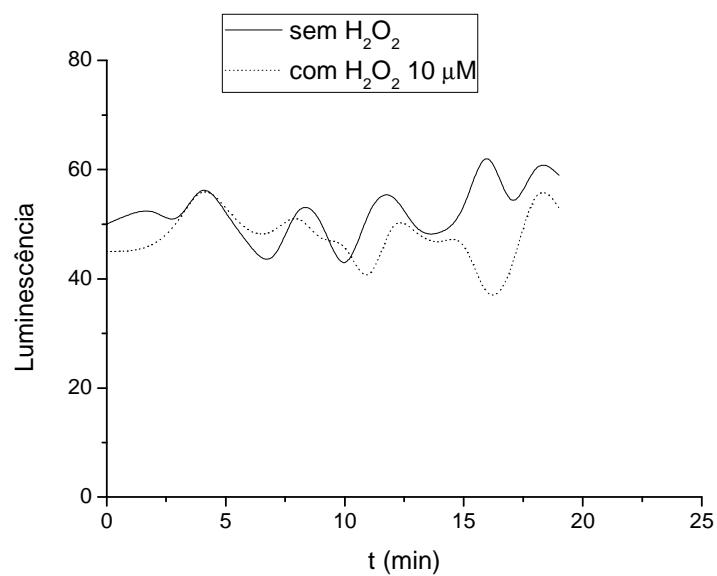


Figura A 36. Luminescência de soluções de DA 500  $\mu\text{M}$  com e sem peróxido de hidrogênio.

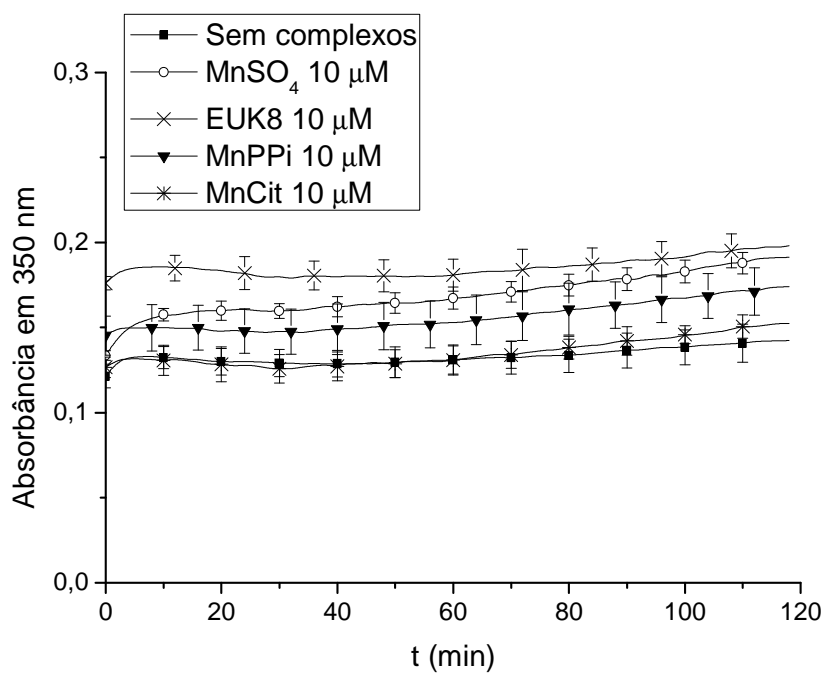


Figura A 37. Absorbância das soluções de DA 500  $\mu\text{M}$  com e sem os complexos ( $\lambda = 350$  nm) após 2 horas.

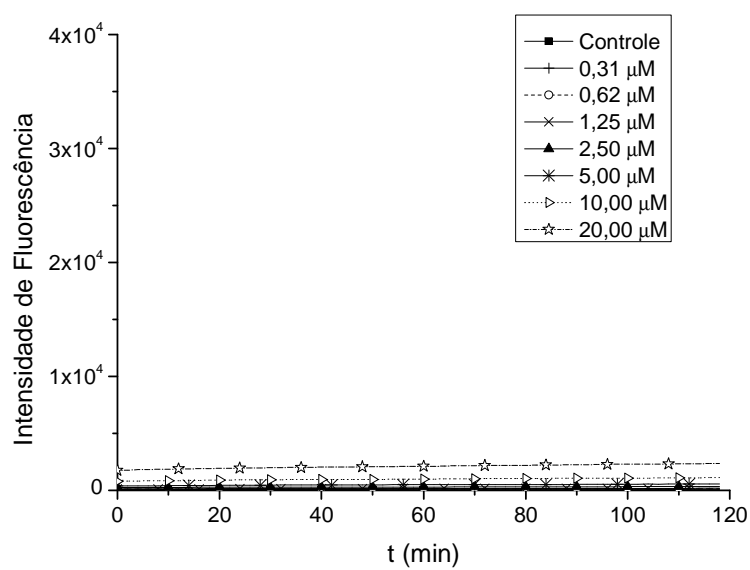


Figura A 38. Velocidade de oxidação da DHR 50 µM por MnSO<sub>4</sub> 0 - 20 µM na ausência de DA 500 µM.

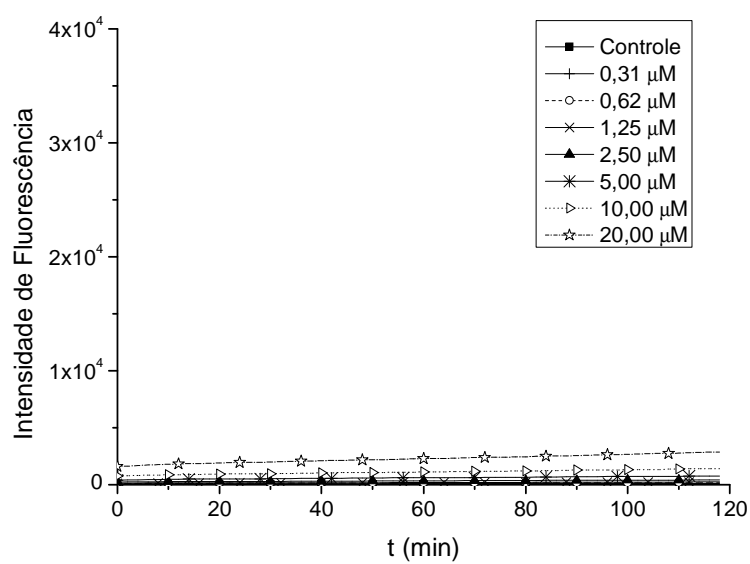


Figura A 39. Velocidade de oxidação da DHR 50 µM por EUK8 0 - 20 µM na ausência de DA 500 µM.

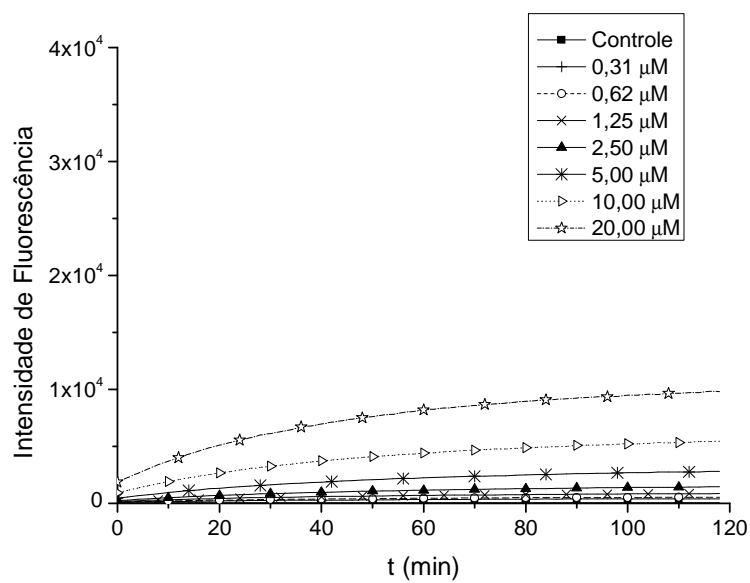


Figura A 40. Velocidade de oxidação da DHR 50  $\mu\text{M}$  por MnCit 0 - 20  $\mu\text{M}$  na ausência de DA 500  $\mu\text{M}$ .

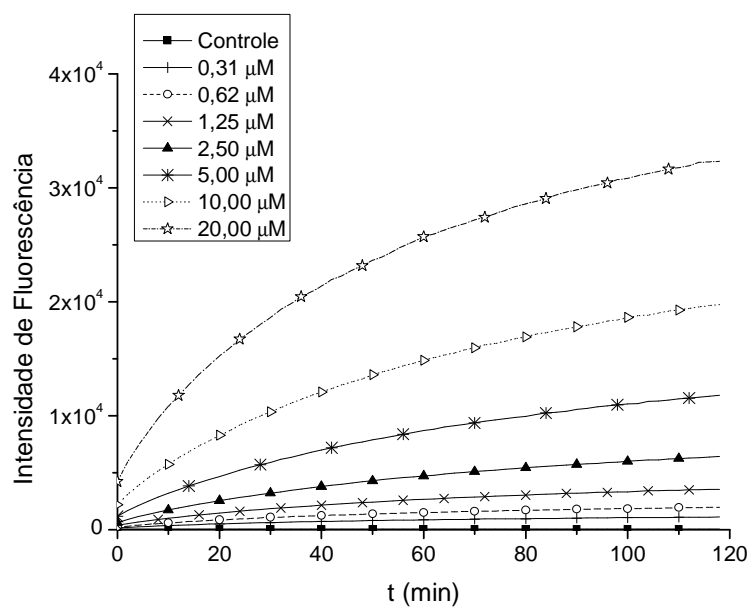


Figura A 41. Velocidade de oxidação da DHR 50  $\mu\text{M}$  por MnPPi 0 - 20  $\mu\text{M}$  na ausência de DA 500  $\mu\text{M}$ .



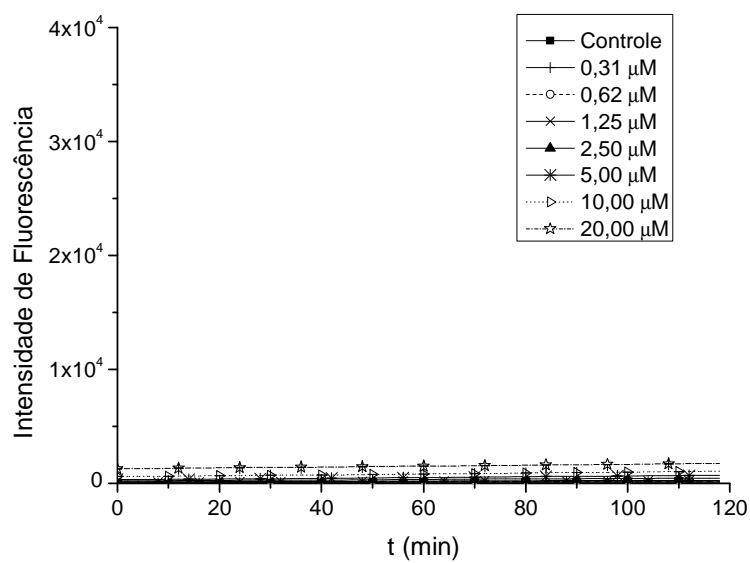


Figura A 42. Velocidade de oxidação da DHR 50  $\mu\text{M}$  por  $\text{MnSO}_4$  0 - 20  $\mu\text{M}$  na presença de DA 500  $\mu\text{M}$ .

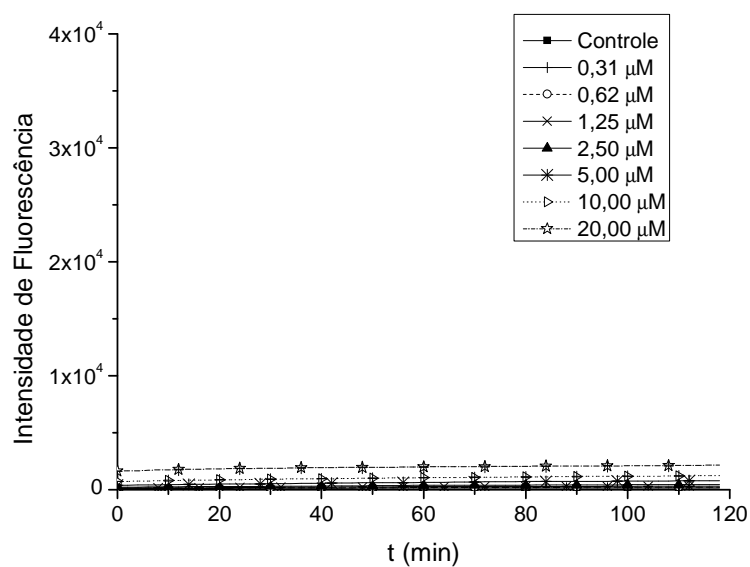


Figura A 43. Velocidade de oxidação da DHR 50  $\mu\text{M}$  por EUK8 0 - 20  $\mu\text{M}$  na presença de DA 500  $\mu\text{M}$ .

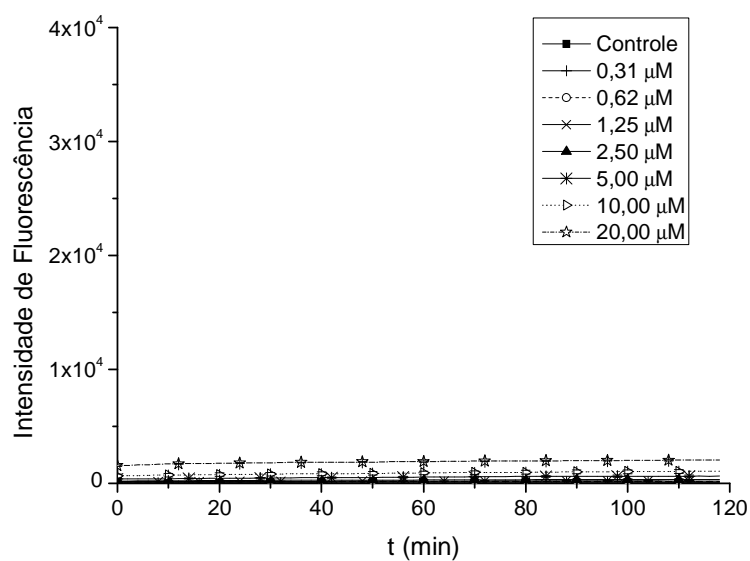


Figura A 44. Velocidade de oxidação da DHR 50 µM por MnCit 0 - 20 µM na presença de DA 500 µM.

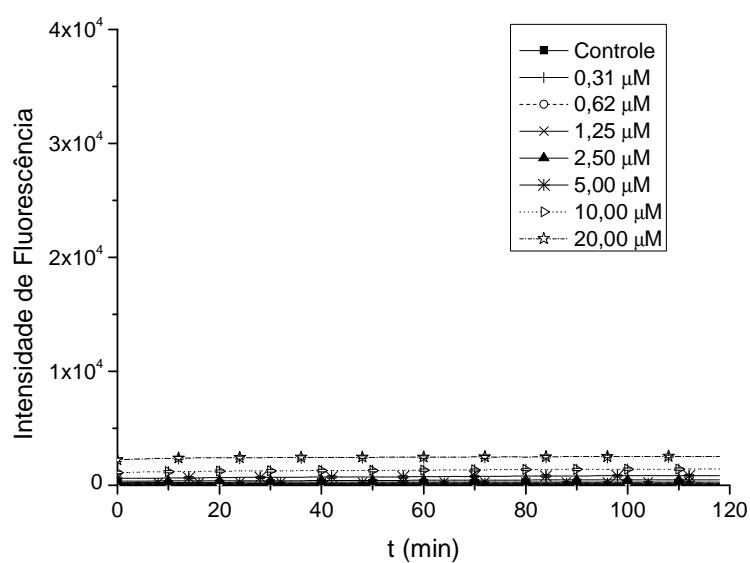


Figura A 45. Velocidade de oxidação da DHR 50 µM por MnPPi 0 - 20 µM na presença de DA 500 µM.

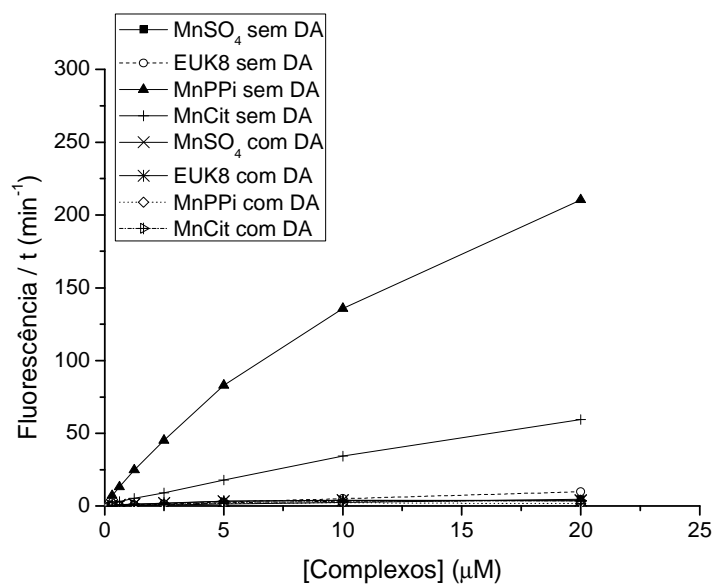


Figura A 46. Aceleração da oxidação da DHR 50  $\mu\text{M}$  pelos complexos na presença e ausência de DA 500  $\mu\text{M}$ .

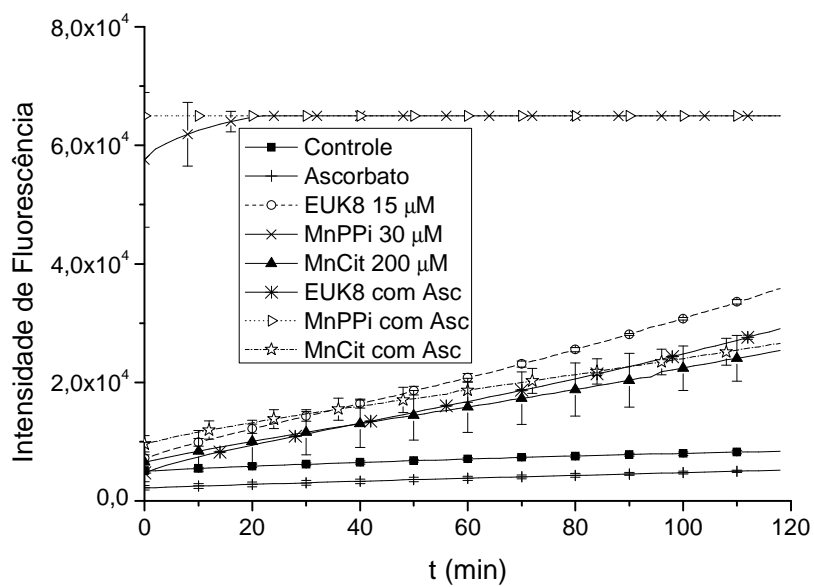


Figura A 47. Velocidade de oxidação da DHR 50  $\mu\text{M}$  pelos complexos com e sem ascorbato 40  $\mu\text{M}$  em meio DMEM não irradiado.

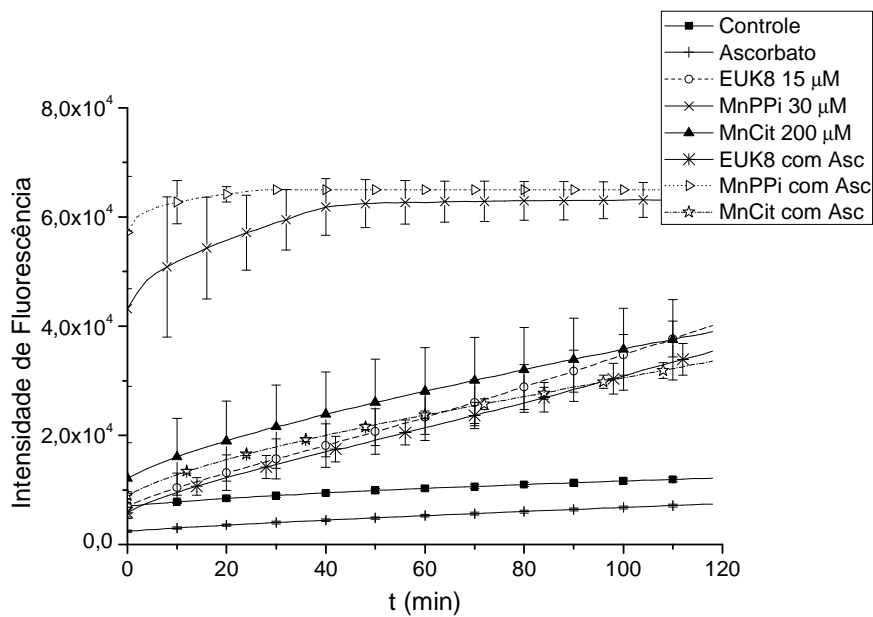


Figura A 48. Velocidade de oxidação da DHR 50  $\mu\text{M}$  pelos complexos com e sem ascorbato 40  $\mu\text{M}$  em meio DMEM irradiado com UVA.

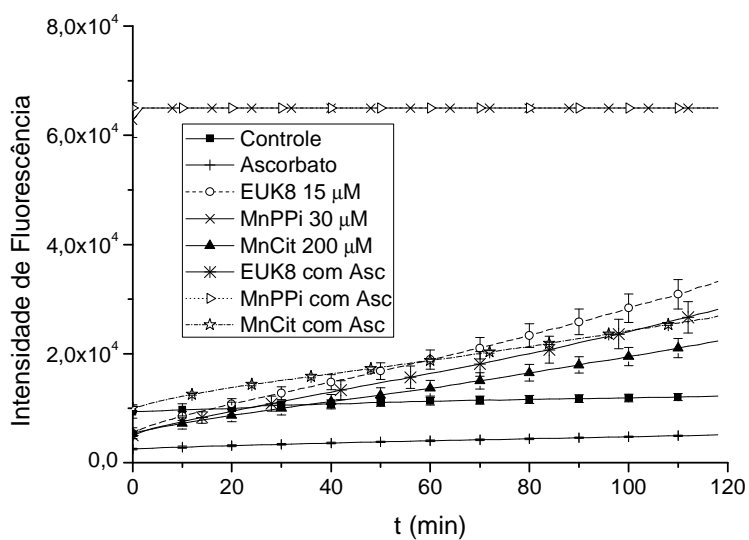


Figura A 49. Velocidade de oxidação da DHR 50  $\mu\text{M}$  pelos complexos com e sem ascorbato 40  $\mu\text{M}$  em meio DMEM irradiado com UVB.