

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Tese de Doutorado

**Atividade ascorbato peroxidase e haloperoxidase de
agentes terapêuticos redox-ativos à base de
metaloporfirinas hidrossolúveis**



Rômulo Severo Sampaio

João Pessoa – PB – Brasil

Agosto/2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Tese de Doutorado

Atividade ascorbato peroxidase e haloperoxidase de agentes terapêuticos redox-ativos à base de metaloportfirinas hidrossolúveis

Rômulo Severo Sampaio^{*,}**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração em Química Inorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Júlio Santos Rebouças

2º Orientador: Dr. Ivan Spasojević

Coorientador: Dra. Ines Batinić-Haberle

***Bolsista DS da Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).**

****Bolsista SWE do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
na *Duke University School of Medicine*, Durham, NC, EUA.**

João Pessoa – PB – Brasil

Agosto/2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S192a Sampaio, Romulo Severo.

Atividade ascorbato peroxidase e haloperoxidase de agentes terapêuticos redox-ativos à base de metaloporfirinas hidrossolúveis / Romulo Severo Sampaio. - João Pessoa, 2019.
107f.

Orientação: Júlio Rebouças.

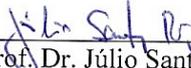
Coorientação: Ines Batinic-Haberle, Ivan Spasojevic.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCEN.

1. Metaloporfirinas de manganês, catálise. 2. oxidação de ascorbato, atividade haloperoxidase. I. Rebouças, Júlio. II. Batinic-Haberle, Ines. III. Spasojevic, Ivan. IV. Título.

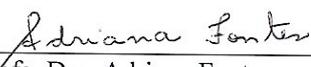
UFPB/BC

Atividade ascorbato peroxidase e haloperoxidase de agentes terapêuticos redox-ativos à base de Mn-porfirinas hidrossolúveis.

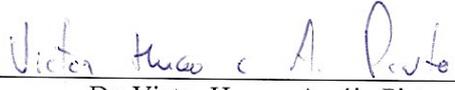
Tese de Doutorado apresentada pelo aluno Rômulo Severo Sampaio e aprovada pela banca examinadora em 29 de agosto de 2019.



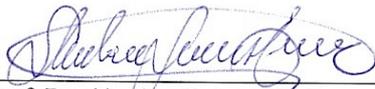
Prof. Dr. Júlio Santos Rebouças
Orientador/Presidente



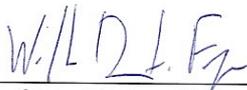
Profa. Dra. Adriana Fontes
Examinadora



Dr. Victor Hugo e Araújo Pinto
Examinador



Prof. Dr. Sherlan Guimarães Lemos
Examinador



Prof. Dr. Wallace Duarte Fragoso
Examinador

Agradecimentos

- ❖ A **Deus** pelo dom da vida e pela força concedida a mim para a realização de mais um projeto pessoal.
- ❖ À **minha família** por acreditar e apoiar minha iniciativa de seguir me qualificando a fim de alcançar metas ainda maiores. Em especial a **Sebastião Severo Sobrinho**, a **Maria Marly Sampaio Severo** e a **Sineide Severo Sampaio Souto**, por tornarem meu projeto educacional uma realidade através do suporte fornecido em todos os momentos da minha caminhada até este dia. A **Isabelle Cristinne Pinto Costa** e a **Sophia Severo Sampaio Costa** que estiveram comigo provendo carinho e força durante todo o período do Doutorado. Serei eternamente grato por ter vocês na minha vida.
- ❖ Ao Dr. **Júlio Santos Rebouças** por me julgar capaz de desempenhar um projeto educacional de tamanha grandeza, o qual desde o Mestrado seguiu como meu orientador. Afirmo, seguramente, que o senhor contribuiu sobremaneira para a minha educação.
- ❖ À Dra. **Ines Batinić-Haberle**, ao Dr. **Ivan Spasojević** e ao Dr. **Artak Tovmasyan** por todo o apoio fornecido durante a minha passagem na *Duke University School of Medicine*, onde eu aprendi e cresci bastante tanto pessoal quanto profissionalmente.
- ❖ Ao Dr. **Sherlan Guimarães Lemos** e à Dra. **Maria Gardênnia da Fonseca** pelas contribuições intelectuais oferecidas durante a banca de Qualificação do Doutorado, e aos meus amigos e colegas de laboratório na UFPB. Em especial ao meu grande amigo **Dayvision Ribeiro Rodrigues** pelas contribuições intelectuais.
- ❖ À **FINEP** pelo auxílio à aquisição e manutenção da infraestrutura e equipamentos multiusuários utilizados durante os estudos desenvolvidos nesta tese.
- ❖ À **CAPES** pelo auxílio à pós-graduação e pela bolsa concedida.
- ❖ Ao **CNPq** pelo auxílio financeiro e pela bolsa de doutorado sanduíche no exterior (SWE).

Sumário

A. Resumo	i
B. Abstract	ii
C. Lista de Figuras	iii
D. Lista de Tabelas	vi
E. Lista de Abreviaturas	vii
F. Apresentação da Tese	viii
Capítulo 1. Oxidação aeróbia do ascorbato por Mn-porfirinas hidrossolúveis de relevância clínica e biológica	1
1.1 Introdução	1
1.1.1 Estresse oxidativo <i>in vivo</i>	2
1.1.2 Mn-Porfirinas (MnP) como moduladores de estresse oxidativo	3
1.1.2.1 Atividade SOD das MnP	3
1.1.2.2 Reatividade das MnP direcionada aos marcadores biológicos (NADH, NADPH, lipídeos, proteínas, tióis, etc.) envolvendo H ₂ O ₂	6
1.1.2.3 O impacto do sistema MnP/H ₂ O ₂ em células cancerosas vs normais	7
1.2 Objetivos	8
1.2.1 Objetivo geral	8
1.2.2 Objetivos específicos	8
1.3 Metodologia experimental	9
1.3.1 Reagentes e solventes	9
1.3.2 Sínteses das MnPs	9
1.3.3 Catálise da oxidação do ascorbato pelas MnPs	9
1.3.3.1 Medidas espectrofotométricas das velocidades iniciais da oxidação do ascorbato ($v_0(\text{Asc})_{\text{ox}}$) catalisada pelas MnPs	9
1.3.3.2 Medidas eletroquímicas das velocidades iniciais do consumo de oxigênio ($v_0(\text{O}_2)_{\text{red}}$)	10
1.4 Resultados e discussão	10
1.4.1 A química do sistema MnP/Asc em meio aquoso - O potencial de redução das MnPs controla a velocidade de oxidação do ascorbato	13
1.5 Conclusões	17
Capítulo 2. Estudos iniciais da atividade haloperoxidase de MnPs hidrossolúveis de interesse como agentes terapêuticos redox-ativos	19
2.1 Introdução	19

2.2	Objetivos	25
2.2.1	Objetivo geral.....	25
2.2.2	Objetivos específicos	25
2.3	Metodologia experimental	26
2.3.1	Reagentes e solventes.....	26
2.3.2	Sínteses das MnPs	26
2.3.3	Síntese da monoclorodimedona (MCD).....	27
2.3.4	Metodologia de halogenação catalítica da MCD por MnPs.....	28
2.4	Resultados e discussão	29
2.4.1	Bromação catalítica da MCD por MnPs	34
2.4.2	Cloração catalítica da MCD por MnPs	36
2.5	Conclusões	38
	Referências.....	39
	Apêndices	46

A. Resumo

Neste trabalho buscou-se verificar o comportamento de diferentes metaloporfirinas, tipicamente utilizadas como agentes terapêuticos redox-ativos, em diferentes sistemas de interesse biológico. Os estudos iniciais permitiram a avaliação da eficiência de 14 metaloporfirinas de manganês (MnPs) hidrossolúveis em catalisar a reação de oxidação do ascorbato, onde foi possível determinar as velocidades iniciais ($v_0(\text{Asc})_{\text{ox}}$ e $v_0(\text{O}_2)_{\text{red}}$) para a catálise da reação de oxidação do ascorbato em dois distintos meios (tampões Tris e fosfato) utilizando medidas de espectrofotometria e eletroquímica, de forma que a MnTE-2-PyP⁵⁺ foi a mais eficiente para ambos os tampões avaliados. Os dados demonstraram que as velocidades iniciais estão relacionadas com o potencial de redução ($E_{1/2}$). Tal relação mostrou uma tendência na forma de sino, sendo a atividade catalítica crescente a partir de potenciais negativos ~ -200 mV vs NHE, e com valores ótimos em potenciais na faixa de $\sim +50$ mV a $\sim +300$ mV vs NHE. A cinética da reação catalítica do sistema MnP/ascorbato nos dois tampões foi influenciada pela capacidade de formação de ligações de hidrogênio entre o tampão e a MnP. Em outra parte sequencial dos estudos, buscou-se avaliar a atividade haloperoxidase de nove MnPs, tipicamente envolvidas em estudos de modulação redox de estresse oxidativo, fazendo uso do ensaio espectrofotométrico clássico de halogenação da monoclorodimedona (MCD). Os resultados demonstraram a habilidade de nove metaloporfirinas em catalisar a reação de halogenação da MCD, pelo que, tais compostos podem ser classificados como portadores de atividade haloperoxidase. Esse estudo foi capaz de determinar as velocidades iniciais para a catálise das reações de halogenação da MCD em tampão fosfato utilizando medidas de espectrofotometria. Os dados demonstraram que as velocidades iniciais e, conseqüentemente, as constantes observadas experimentalmente (k_{obs}) das MnPs estão relacionadas com o $E_{1/2}$ e com o efeito estérico das cadeias laterais dos anéis piridínicos das porfirinas. Tal relação não apresentou uma clara tendência para ambos os tipos de halogenação (bromação e cloração). No entanto, foi possível concluir que as MnPs são mais eficientes para as reações de bromação, e que elas apresentam atividade catalítica com valores ótimos em potenciais na faixa de $\sim +220$ mV a $\sim +240$ mV vs NHE, para ambos os tipos de halogenação. Os compostos mais eficientes para a halogenação catalítica da MCD foram a MnTM-2-PyP⁵⁺, tanto para as reações de bromação quanto para cloração, juntamente com a MnTM-3-PyP⁵⁺ apenas para as reações de bromação.

Palavras-chave: Metaloporfirinas de manganês, catálise, oxidação de ascorbato, atividade haloperoxidase.

B. Abstract

The study's main purpose has been to verify the behavior of different metalloporphyrins, typically used as redox-active therapeutic agents, in different systems of biological interest. The initial studies allowed to assess the efficiency of 14 water-soluble manganese metalloporphyrins (MnPs) in catalyzing the ascorbate oxidation reaction, where it was possible to determine the initial rates ($v_0(\text{Asc})_{\text{ox}}$ and $v_0(\text{O}_2)_{\text{red}}$) for the catalysis of ascorbate oxidation reaction in two different media (Tris and phosphate buffers) using spectrophotometric and electrochemical measurements. The compound named as MnTM-2-PyP⁵⁺ was the most efficient for both evaluated buffers. The data showed that the initial rates are related to the reduction potential ($E_{1/2}$). This relationship showed a bell-shaped trend, with catalytic activity increasing from negative potentials ~ -200 mV vs NHE, and with optimum potentials ranging from $\sim +50$ mV to $\sim +300$ mV vs NHE. The catalytic reaction kinetics of the MnP/ascorbate system in the two buffers was influenced by the hydrogen bonding capacity between the buffer and the MnP. Furthermore, it was also sought to evaluate the haloperoxidase activity of nine MnPs, typically involved in oxidative stress redox modulation studies, using the classical spectrophotometric monochlorodimedone (MCD) halogenation assay. The results have demonstrated the ability of nine metalloporphyrins to catalyze the halogenation reaction of MCD, therefore, such compounds showed haloperoxidase activity. This study was able to determine the initial rates for catalysis of MCD halogenation reactions in phosphate buffer using spectrophotometric measurements. Data analyses have demonstrated that the initial rates and, consequently, the MnPs' apparent rates (k_{obs}) are related to $E_{1/2}$ and also to the steric effect of the porphyrin pyridine ringside chains. This relationship did not show a clear tendency for both halogenation types (bromination and chlorination). Nonetheless, it was concluded that MnPs are more efficient for bromination reactions, and that they have catalytic activity with optimum potentials ranging from $\sim +220$ mV to $\sim +240$ mV vs NHE, for both halogenation types. The most efficient compounds for catalytic halogenation of MCD were MnTM-2-PyP⁵⁺ for both bromination and chlorination reactions, together with MnTM-3-PyP⁵⁺ for bromination reactions only. In an additional part of this work, it was pursued to analyze and quantify Mn (III) and Fe (III) metalloporphyrins in mammalian plasma and organs by LC-MS/MS in biological samples.

Keywords: Manganese metalloporphyrins, catalysis, ascorbate oxidation, haloperoxidase activity.

C. Lista de Figuras

Capítulo 1

- Figura 1.1. Miméticos SOD baseados em MnP.** Verdadeiros miméticos SOD devem ser capazes de catalisar a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ (Eq. 1 e 2) com k_{cat} superior a $\sim 5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ em pH 7 (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). #Adaptado de BATINIĆ-HABERLE; TOVMASYAN; SPASOJEVIC, 2015.....4
- Figura 1.2. Representação de algumas MnP e seus relativos $k_{cat}(O_2^{\cdot-})$ e $E_{1/2}$.** O design das MnP influencia diretamente nos valores de $k_{cat}(O_2^{\cdot-})$ e $E_{1/2}$, e deste modo impacta diretamente no potencial de atuação como mimético SOD. #Adaptado de BATINIĆ-HABERLE; TOVMASYAN; SPASOJEVIC, 2015.....5
- Figura 1.3. A função do H_2O_2 em sinalizações celulares envolvendo MnP.** Os mais potentes mímicos SOD são capazes de oxidar um número considerável de moléculas biológicas na presença de H_2O_2 . *OA, oxidação do ascorbato; OT, oxidação de grupos tiol; Ox-NAD, oxidação de NAD^+ ; Ox-NADP, oxidação de $NADP^+$; Ox-L, oxidação de lipídeos; Px-L, peroxidação de lipídeos. #Adaptado de BATINIĆ-HABERLE; TOVMASYAN; SPASOJEVIC, 2015.....7
- Figura 1.4. Esquema reacional do sistema Ascorbato/MnP/ O_2 .** OA, oxidação do ascorbato.11
- Figura 1.5. Estruturas das Mn(III)-porfirinas cuja habilidade para catalisar a oxidação do ascorbato foi aqui avaliada.** Exceto MnTBAP³⁻ e MnTE-2-PyPhP⁵⁺, todas as demais MnPs estudadas são mímicos SOD de potências variadas com $\log k_{cat}(O_2^{\cdot-})$ variando numa faixa de 6,53 a 7,92.12
- Figura 1.6. Habilidade das MnPs para catalisar a oxidação do ascorbato, conforme determinação espectrofotométrica das velocidades iniciais da oxidação do ascorbato, $v_0(Asc)_{ox}$.** (A) A velocidade inicial da reação foi medida para várias MnPs que diferem entre si com respeito as suas propriedades redox, lipofilicidade/biodisponibilidade, polaridade, tamanho da cadeia lateral e volume. As v_0 velocidades iniciais foram determinadas com 5 μM da MnP e 0,15 mM de ascorbato de sódio, sob condições aeróbicas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ em pH 7,8 e mantidas com 0,05 M de tampão Tris ou fosfato de potássio. (B) As $v_0(Asc)_{ox}$ das MnPs guarda uma relação com os seus respectivos valores de $E_{1/2}$ na forma de sino. (C) Seis MnPs com $E_{1/2}$ numa faixa entre -65 a +340 mV vs NHE são apresentadas: (#1) MnTE-2-PyPhP⁵⁺, (#2) MnTE-3-PyP⁵⁺, (#3) MnTE-2-PyP⁵⁺, (#4) MnTPhE-2-PyP⁵⁺, (#5), MnTnHexOE-2-PyP⁵⁺, e (#6) MnTnOct-2-PyP⁵⁺.15

Figura 1.7. Habilidade das MnPs para catalisar a oxidação do ascorbato, conforme determinação eletroquímica das velocidades iniciais da redução do oxigênio, $v_0(\text{O}_2)_{\text{red}}$. (A) MnP/Asc reagem sob condições aeróbicas, de modo que o oxigênio é reduzido para gerar superóxido (Equação 2). A $v_0(\text{O}_2)_{\text{red}}$ foi medida com 10 μM da MnP e 1 mM de ascorbato de sódio, sob condições aeróbicas ($[\text{O}_2] = 0.255 \text{ mM}$) a $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ em pH 7,8 e mantidas com 0,05 M de tampão Tris ou fosfato de potássio. (B) As $v_0(\text{O}_2)_{\text{red}}$ das MnPs guarda uma relação com os seus respectivos valores de $E_{1/2}$ na forma de sino. (C) Seis MnPs com $E_{1/2}$ numa faixa entre -65 a +340 mV vs NHE são apresentadas: (#1) MnTE-2-PyPhP⁵⁺, (#2) MnTE-3-PyP⁵⁺, (#3) MnTE-2-PyP⁵⁺, (#4) MnTPhE-2-PyP⁵⁺, (#5), MnTnHexOE-2-PyP⁵⁺, e (#6) MnTnOct-2-PyP⁵⁺. 16

Capítulo 2

Figura 2.1. Estrutura de Composto I envolvido no mecanismo de reação atribuído às enzimas CPO e MPO. #Adaptado de FUJI, 2016. 21

Figura 2.2. Representação de estruturas moleculares: A) intermediário reacional e a molécula da caldariomicina durante a sua biosíntese pelo fungo *C. fumago*. B) ensaio clássico da halogenação da monoclorodimedona (MCD)..... 24

Figura 2.3. Esquema da reação reversível de transferência de um átomo de oxigênio (ligante oxo) entre uma MnP (no exemplo, MnTM-2-PyP⁵⁺) e um íon haleto (no exemplo, íon brometo). #Adaptado de JIN et al., 2000. 25

Figura 2.4. Estruturas das nove MnPs utilizadas nos ensaios de análise da atividade haloperoxidase das MnPs. O grupo R corresponde à cadeia lateral alquila das MnPs. 28

Figura 2.5. Esquema de síntese da monoclorodimedona (MCD). 29

Figura 2.6. Consumo da MCD durante reações de bromação (A) e cloração (B) na ausência (controle, ou seja, sem catalisador) e na presença de MnTE-2-PyP⁵⁺ 5 μM (catalisador). A análise espectrofotométrica (Shimadzu UV-2550 UV-vis) foi monitorada a 290 nm por 60 segundos. Reação em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 31

Figura 2.7. Exemplo de uma curva de regressão linear usada para o cálculo da ordem da reação (n) para as MnPs (neste exemplo, a MnTE-2-PyP⁵⁺). Medidas representativas a partir de reações de bromação da MCD em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. A velocidade inicial experimental

(v_0) foi calculada de 0-15s. A da ordem da reação (n) é dada como o coeficiente angular da equação: $\log v_0 = \log [\text{MnP}]_n + \log k_{\text{obs}}$32

Figura 2.8. Exemplo de uma curva de regressão linear usada para o cálculo das k_{obs} das MnPs (neste exemplo, a MnTE-2-PyP⁵⁺). Medidas representativas a partir de reações de bromação da MCD em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a 25±1°C.34

Figura 2.9. Perfil geral das MnPs nas reações de halogenação catalítica da MCD. Medidas realizadas em triplicata para a bromação e a cloração da MCD em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a 25±1°C35

Figura 2.10. Exemplos de curvas de absorção UV-vis durante uma reação de bromação da MCD realizada por 60 segundos acompanhando a absorbância em $\lambda_{\text{max}} = 290 \text{ nm}$. Medidas realizadas em meio ácido (~pH 4,02 a 25±1°C).37

D. Lista de Tabelas

Capítulo 1

Tabela 1.1. Caracterização espectrofotométrica e eletroquímica do sistema MnP/Asc. Os estudos foram realizados em tampão Tris e fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,8 a $25\pm 1^\circ\text{C}$	13
---	----

Capítulo 2

Tabela 2.1. Caracterização cinética do sistema empregando as MnPs na bromação da MCD. A velocidade inicial experimental (v_0) foi calculada de 0-15s. Os estudos foram realizados em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a $25\pm 1^\circ\text{C}$	36
Tabela 2.2. Caracterização cinética do sistema empregando as MnPs na cloração da MCD. A taxa inicial experimental (v_0) foi calculada de 0-15s. Os estudos foram realizados em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a $25\pm 1^\circ\text{C}$	38

E. Lista de Abreviaturas

MnP: Porfirinas de manganês

MCD: Monoclorodimedona

BPO: Bromoperoxidase

CPO: Cloroperoxidase

IPO: Iodoperoxidase

HPO: Haloperoxidase

NHE: Eletrodo Normal de Hidrogênio, do inglês, *Normal Hydrogen Electrode*

SOD: Superóxido dismutase

H₂T-2-PyP: *meso*-tetraquis(2-piridil)porfirina

H₂T-3-PyP: *meso*-tetraquis(3-piridil)porfirina

H₂T-4-PyP: *meso*-tetraquis(4-piridil)porfirina

MnTBAP³⁻: *meso*-tetraquis(4-carboxifenil)porfirinatomanganês(III)

MnTE-2-PyPhP⁵⁺: *meso*-tetraquis(fenil-4'-(*N*-etilpiridinio-2-il)porfinatomanganês(III)

MnTPhE-2-PyP⁵⁺: *meso*-tetraquis(*N*-(2'-feniletíl)piridinio-2-il)porfinatomanganês(III)

MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺: *meso*-tetraquis(*N*-(2'-*n*-butoxietíl)piridinio-2-il)porfinatomanganês(III)

MnTnHexOE-2-PyP⁵⁺: *meso*-tetraquis(*N*-(2'-*n*-hexoxietíl)piridinio-2-il)porfinatomanganês(III)

MnTDM-2-ImP⁵⁺: *meso*-tetraquis(*N,N'*-dimetilimidazolio-2-il)porfinatomanganês(III)

MnTM-2-PyP⁵⁺: *meso*-tetraquis(*N*-metilpiridinio-2-il)porfinatomanganês(III)

MnTE-2-PyP⁵⁺: *meso*-tetraquis(*N*-etilpiridinio-2-il)porfinatomanganês(III)

MnTPr-2-PyP⁵⁺: *meso*-tetraquis(*N*-propilpiridinio-2-il)porfinatomanganês(III)

MnTnPen-2-PyP⁵⁺: *meso*-tetraquis(*N*-*n*-pentilpiridinio-2-il)porfinatomanganês(III)

MnTnHex-2-PyP⁵⁺: *meso*-tetraquis(*N*-*n*-hexilpiridinio-2-il)porfinatomanganês(III)

MnTnOct-2-PyP⁵⁺: *meso*-tetraquis(*N*-*n*-octilpiridinio-2-il)porfinatomanganês(III)

MnTM-3-PyP⁵⁺: *meso*-tetraquis(*N*-metilpiridinio-3-il)porfinatomanganês(III)

MnTE-3-PyP⁵⁺: *meso*-tetraquis(*N*-etilpiridinio-3-il)porfinatomanganês(III)

MnTnOct-3-PyP⁵⁺: *meso*-tetraquis(*N*-*n*-octilpiridinio-3-il)porfinatomanganês(III)

MnTM-4-PyP⁵⁺: *meso*-tetraquis(*N*-metilpiridinio-4-il)porfinatomanganês(III)

MnTE-4-PyP⁵⁺: *meso*-tetraquis(*N*-etilpiridinio-4-il)porfinatomanganês(III)

MnTnHex-4-PyP⁵⁺: *meso*-tetraquis(*N*-*n*-hexilpiridinio-4-il)porfinatomanganês(III)

F. Apresentação da Tese

Os dados aqui apresentados incluem resultados de projetos maiores desenvolvidos em colaboração com outros grupos de pesquisa. É oportuno destacar que parte dos trabalhos desenvolvidos foram publicados recentemente na forma de 5 (cinco) artigos completos em revistas indexadas (Qualis A1). Os resultados referentes à minha contribuição foram utilizados na escrita da Tese de Doutorado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba. A organização dos dados foi feita em duas partes, a saber: O capítulo 1 envolve os estudos desenvolvidos num sistema empregando metaloporfirinas de manganês em reações de catálise em associação com ascorbato no tratamento de câncer em modelos animais. O capítulo 2 abrange os estudos realizados num espectrofotômetro UV-vis utilizando um sistema que emprega metaloporfirinas de manganês em reações de catálise, a fim de tanto identificar a existência como quantificar a atividade haloperoxidase das mesmas.

Capítulo 1

Oxidação aeróbia do ascorbato por Mn-porfirinas hidrossolúveis de relevância clínica e biológica¹

1.1 Introdução

As principais vias metabólicas, como a respiração mitocondrial, o ciclo de Krebs, a glicólise, a oxidação de ácidos graxos, e as ações de antioxidantes endógenos, são baseados em reações redox que envolvem a transferência de elétrons entre biomoléculas. Alguns dos processos podem eventualmente, de modo deliberado (suportando vias de sinalizações celulares) ou inesperado (tal como falhas nos complexos I e III da respiração mitocondrial onde um elétron pode reduzir uma molécula de oxigênio para produzir $O_2^{\cdot-}$), dar origem a espécies reativas de oxigênio, nitrogênio, enxofre, selênio e cloro (BATINIĆ-HABERLE; REBOUÇAS; SPASOJEVIC, 2010).

Por outro lado, as defesas antioxidativas endógenas, tais como as famílias das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), peroxirredoxinas (Prx) e as moléculas antioxidantes, são encarregadas de manter na ordem de nanomolar os níveis das espécies reativas eventualmente formadas, isto é, manter a homeostase fisiológica em ambiente redox. Caso os níveis das espécies reativas aumentem consideravelmente, como uma consequência de dano ou disfunção celular, então uma cascata de eventos de sinalização celular é acionada ‘*upregulation*’ (retroalimentação positiva), a fim de restaurar o ambiente redox normal. As vias de sinalização celular ativadas por reações redox, juntamente com as espécies reativas e as moléculas antioxidantes endógenas, de baixo e alto peso molecular, são atualmente reconhecidas como Redoxoma e definem o ambiente celular redox (BATINIĆ-HABERLE; REBOUÇAS; SPASOJEVIC, 2010; TOVMASYAN et al., 2013a; TOVMASYAN et al., 2013b).

¹ Os dados apresentados neste Capítulo foram recentemente publicados: TOVMASYAN, A.; SAMPAIO, R. S.; BOSS, M. K.; BUENO-JANICE, J. C.; BADER, B. H.; THOMAS, M.; REBOUCAS, J. S.; MICHAEL, O. R. R.; CHANDLER, J. D.; GO, Y. M.; JONES, D. P.; VENKATRAMAN, T. N.; HABERLE, S.; KYUI, N.; LASCOLA, C.; DEWHIRST, M. W.; SPASOJEVIĆ, I.; BENOVA, L.; BATINIĆ-HABERLE, I.. Anticancer therapeutic potential of Mn porphyrin/ascorbate system. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 89, p. 1231-1247, 2015. (DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.416).

O ambiente redox fisiológico é mantido por um balanço entre as defesas antioxidativas endógenas de baixo (moléculas como glutathiona (GSH), ácido ascórbico (AA), tetrahidrobiopterina, α -tocoferol, NADPH) e alto peso molecular (enzimas como SOD, CAT, GPx, Prx, etc.), juntamente com as espécies reativas.

1.1.1 Estresse oxidativo *in vivo*

O equilíbrio dinâmico estabelecido entre antioxidantes endógenos e espécies reativas envolve a transferência de elétrons entre as espécies envolvidas no processo e reflete a capacidade do sistema de se manter em homeostase. Quando por algum motivo (endógeno ou exógeno) ocorre uma perturbação desse equilíbrio, levando ao aumento em concentração (níveis superiores a nanomolar) de certas espécies reativas, tem-se uma condição amplamente reconhecida como estresse oxidativo (ALVAREZ et al., 2004; BAO; LIU, 2004; BATINIĆ-HABERLE; REBOUÇAS; SPASOJEVIC, 2010). A longo prazo, níveis desequilibrados entre espécies reativas e defesas antioxidantes endógenas representa um estado extremamente danoso às células, sendo atualmente associado com doenças como câncer, diabetes mellitus, lesões pulmonares, osteoartrites, danos cardíacos, alterações neurodegenerativas, entre outras (BATINIĆ-HABERLE; REBOUÇAS; SPASOJEVIC, 2010; DHAR et al., 2011; SAGAMURA; KEANEY, 2011; BATINIĆ-HABERLE; RAJIC; BENOVA, 2011; BUETTNER, 2011; SHENG et al., 2014).

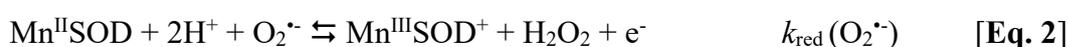
Faz-se de crítica importância destacar que nem todas as espécies reativas são radicais, isto é, têm pelo menos um elétron desemparelhado. Dentre as espécies reativas não- radicais estão: o peroxinitrito ($pK_a = 6,14$, formas protonada e desprotonada ambas presentes *in vivo*, $ONOOH + ONOO^-$), o aduto entre peroxinitrito e CO_2 ($ONOOCO_2^-$), peróxido de hidrogênio ($pK_a = 11,65$; com a espécie desprotonada, HO_2^- , sendo muito mais reativa, porém encontrada em níveis muito baixos *in vivo*), hipoclorito ($pK_a = 7,5$; formas protonada e desprotonada ambas presentes *in vivo*, $HClO + ClO^-$), tióis (formas protonada e desprotonada ambas presentes *in vivo*, $RSH + RS^-$), ascorbato (presente *in vivo* predominantemente na forma desprotonada monoaniônica, HA^-), etc. Dentre os radicais estão: radical superóxido ($pK_a = 4,8$; $O_2^{\cdot-}$), óxido nítrico ($\cdot NO$), radical carbonato ($CO_3^{\cdot-}$), radical dióxido de nitrogênio ($\cdot NO_2$), radical hidroxila ($\cdot OH$, espécie muito reativa com tempo de meia-vida da ordem de femtosegundo, sendo apenas menos deletéria do que a forma oxigênio singlete (1O_2), radical tiil (RS^{\cdot}), radical ascorbato

(HA[•]), íons metálicos como Cu²⁺, Mn^{2+/3+}, Fe^{2+/3+}, entre outros. Assim, tomando por base os conceitos apresentados, é preferível se utilizar o termo espécies reativas ao invés de “radicais livres” (BATINIĆ-HABERLE; REBOUÇAS; SPASOJEVIC, 2010; BATINIĆ-HABERLE; RAJIC; BENOVA, 2011; SHENG et al., 2014).

1.1.2 Mn-Porfirinas (MnP) como moduladores de estresse oxidativo

1.1.2.1 Atividade SOD das MnP

Enzimas importantes que compreendem a primeira linha de defesa contra estresse oxidativo em todos os organismos vivos são aquelas pertencentes à família superóxido dismutase (SOD). Nos mamíferos existem três isoformas: extracelular CuZnSOD (SOD1); matriz mitocôndrial MnSOD (SOD2); citosólica e intermembrar CuZnSOD (SOD3); Estudos mostram que a vida não é possível sem MnSOD, onde ratos ‘*knock-out*’ (geneticamente modificados pela inibição um gene existente) vivem apenas poucas horas após o nascimento, ao passo que ratos heterozigotos com 50% menos MnSOD apresentam aumento da taxa de envelhecimento dependente do dano oxidativo ao DNA (CANDAS; LI, 2014; SARSOOR; KALEN; GOSWAMI, 2014). As três isoformas da SOD catalisam a dismutação do radical superóxido (O₂^{•-}) como descrito nas **Equações 1 e 2** a seguir, onde ambos os passos de oxidação e redução, tanto do radical superóxido quanto da enzima, acontecem com constantes velocidades de $\sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.



Várias classes de modelos biomiméticos das enzimas SOD, tais como complexos do tipo salen e metaloporfirinas, foram desenvolvidos e explorados durante décadas desde a descoberta das superóxidos dismutase por McCord e Fridovich no final da década de 1960 (MCCORD; FRIDOVICH, 1969). É importante notar que um composto somente é considerado mimético das enzimas SOD se este for capaz de catalisar a dismutação do O₂^{•-} (**Eq. 1 e 2**) com taxa da constante catalítica (k_{cat}) superior a $\sim 5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [$\log k_{\text{cat}}(\text{O}_2^{\cdot-}) \geq 5,70$] em pH 7. Algumas das MnPs mais frequentemente estudadas capazes de mimetizar a reatividade das enzimas SOD estão representados na **Figura 1.1**.

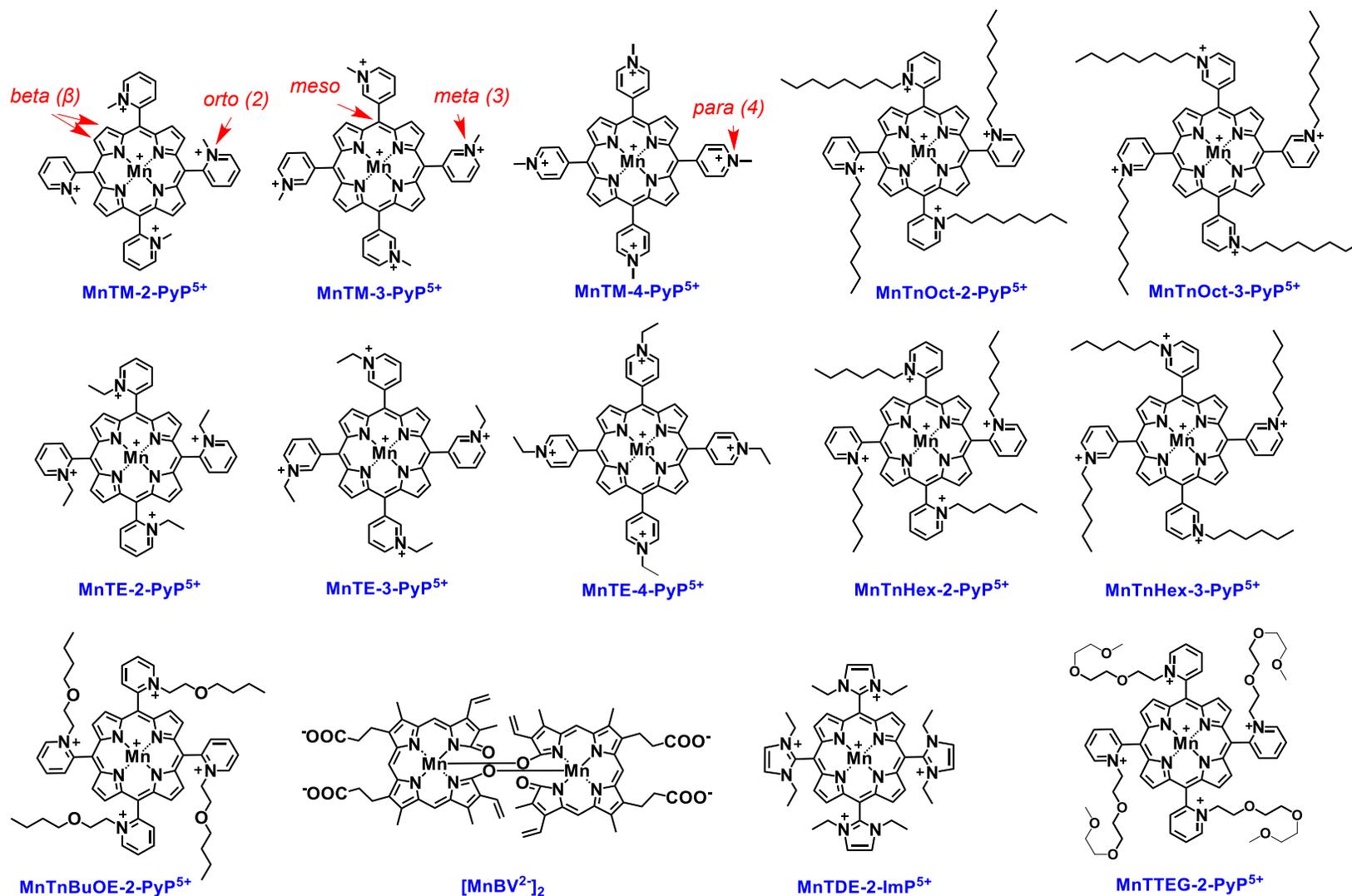


Figura 1.1. Miméticos SOD baseados em MnP. Verdadeiros miméticos SOD devem ser capazes de catalisar a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ (Eq. 1 e 2) com k_{cat} superior a $\sim 5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ em pH 7 (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). #Adaptado de BATINIĆ-HABERLE; TOVMASYAN; SPASOJEVIC, 2015.

A fim de realizar o ciclo catalítico de dismutação do superóxido eficientemente, além de possuir razoável $\log k_{\text{cat}}(\text{O}_2^{\cdot-})$, as MnP devem apresentar potencial de redução ($E_{1/2}$) equivalente ao da enzima. Quanto mais próximo do potencial $\sim +300$ mV vs NHE mais potente será o mímico SOD, o qual será capaz de reduzir e oxidar o superóxido sob taxas catalíticas relativamente iguais. Atualmente, estudos suportam a eficiência e potencial mimético SOD das MnP (Fig. 1.2) (REBOUÇAS et al., 2008; REBOUÇAS; SPASOJEVIĆ; BATINIĆ-HABERLE, 2008; BATINIĆ-HABERLE; REBOUÇAS; SPASOJEVIC, 2010; SPASOJEVIĆ et al., 2011; SHENG et al., 2014).

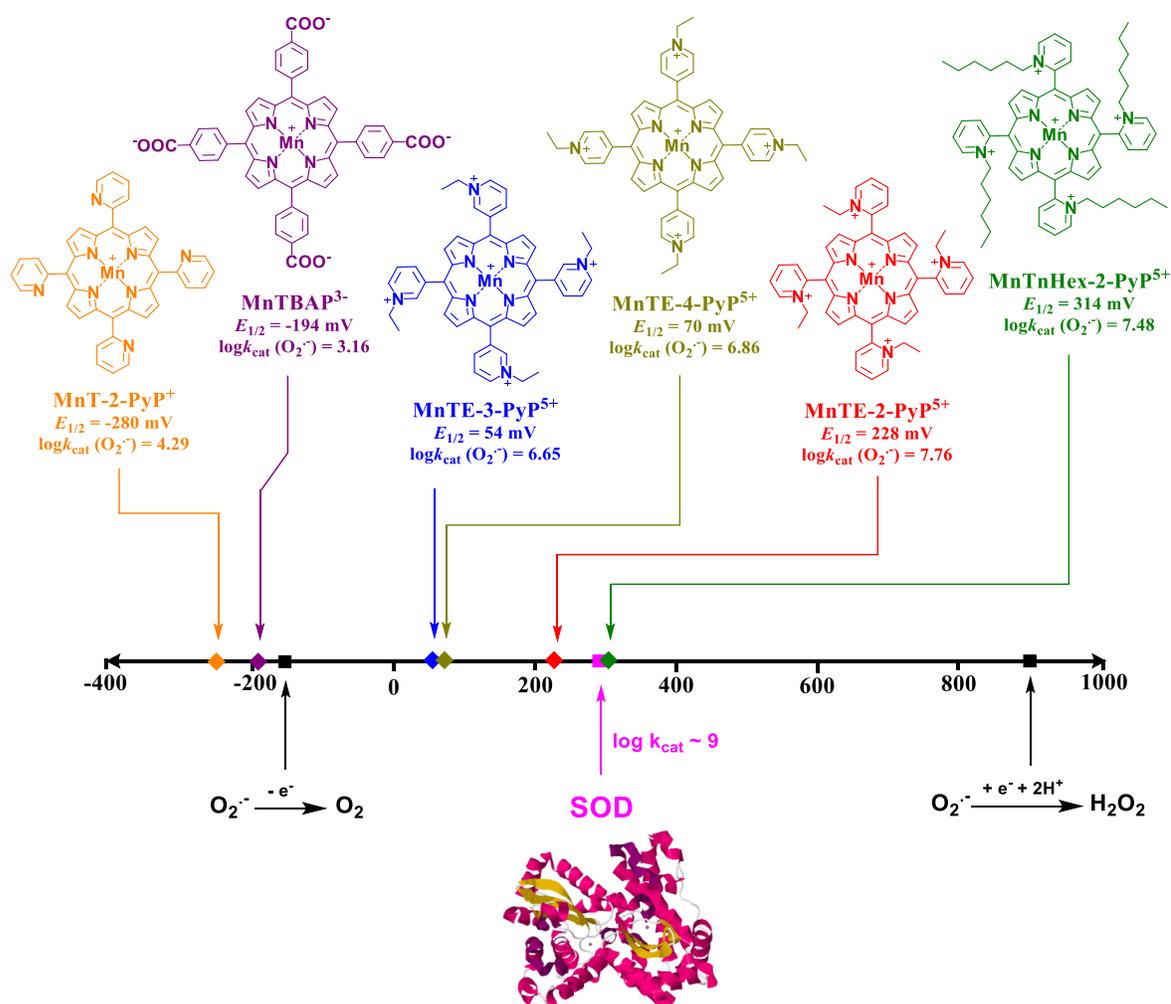


Figura 1.2. Representação de algumas MnP e seus relativos $k_{\text{cat}}(\text{O}_2^{\cdot-})$ e $E_{1/2}$. O design das MnP influencia diretamente nos valores de $k_{\text{cat}}(\text{O}_2^{\cdot-})$ e $E_{1/2}$, e deste modo impacta diretamente no potencial de atuação como mímico SOD. #Adaptado de BATINIĆ-HABERLE; TOVMASYAN; SPASOJEVIC, 2015.

1.1.2.2 Reatividade das MnP direcionada aos marcadores biológicos (NADH, NADPH, lipídeos, proteínas, tióis, etc.) envolvendo H₂O₂

Considerando que a atividade de MnP como miméticos das enzimas catalase mostrou-se biologicamente irrelevante (TOVMASYAN et al., 2015a), tem sido sugerido o envolvimento de peróxido de hidrogênio celular no mecanismo de ação de compostos denominados tipicamente de mímicos SOD, via atividade glutathiona peroxidase e cisteína oxidase (BATINIĆ-HABERLE; RAJIC; BENOVA, 2011; TOVMASYAN et al., 2013b; BATINIĆ-HABERLE; SPASOJEVIĆ, 2014). Esse processo foi inicialmente sugerido considerando-se que MnP podem oxidar resíduos de cisteína da subunidade p50 do fator nuclear κ B (NF- κ B), onde os dados demonstraram o envolvimento chave do H₂O₂ e da glutathiona (JARAMILLO et al., 2012).

Recentemente, esse processo tem sido substanciado por pesquisas adicionais onde se verificou que MnP podem realizar S-glutathionilação de grupos tióis das subunidades p50 e p65 do NF- κ B, bem como nos complexos I, III e IV mitocondriais (BATINIĆ-HABERLE; RAJIC; BENOVA, 2011; BATINIĆ-HABERLE; SPASOJEVIĆ, 2014). Estudos procurando explorar a química do H₂O₂ relacionada a sistemas aquosos e seu envolvimento nas ações de MnP mostraram que na presença do peróxido as metaloporfirinas de Mn podem oxidar variados marcadores tais como NADH, NADPH e lipídeos (**Fig. 1.3**) (TOVMASYAN et al., 2013b).

Adicionalmente, as MnP também podem produzir H₂O₂ (durante o ciclo reativo envolvendo redutores celulares e o superóxido) e subsequentemente reusá-lo para oxidar biomarcadores (**Fig. 1.3**). Tal comportamento está em concordância com resultados encontrados durante o tratamento de células de linfoma empregando MnP e dexametasona (um sistema produtor de H₂O₂), onde nenhuma mudança considerável nos níveis de peróxido foi encontrada (JARAMILLO et al., 2012; JARAMILLO et al., 2015). Isso indica o H₂O₂ formado é consumido em passos subsequentes de processos de oxidação/peroxidação.

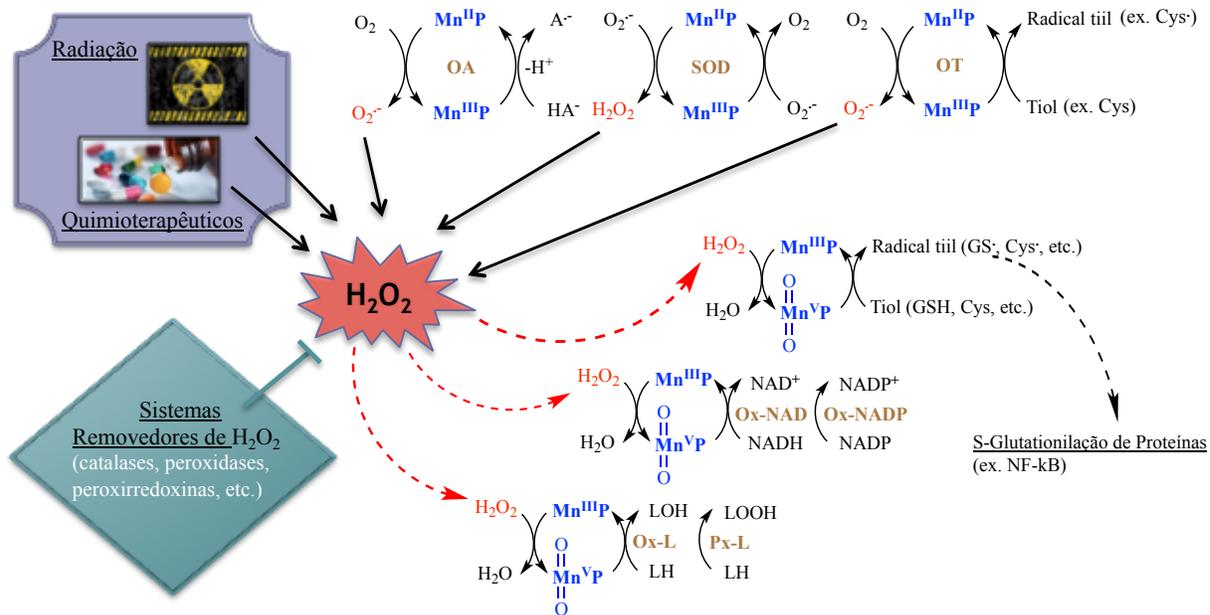


Figura 1.3. A função do H₂O₂ em sinalizações celulares envolvendo MnP. Os mais potentes mímicos SOD são capazes de oxidar um número considerável de moléculas biológicas na presença de H₂O₂. *OA, oxidação do ascorbato; OT, oxidação de grupos tiol; Ox-NAD, oxidação de NAD⁺; Ox-NADP, oxidação de NADP⁺; Ox-L, oxidação de lipídeos; Px-L, peroxidação de lipídeos. #Adaptado de BATINIĆ-HABERLE; TOVMASYAN; SPASOJEVIC, 2015.

Outra reação das MnP reconhecida como relevante biologicamente é a reação com o oxigênio. Uma vez que Mn^{III}P é reduzida para Mn^{II}P seja reagindo com ascorbato, com grupo tiol ou com superóxido, ela pode prontamente ser reoxidada para Mn^{III}P pela reação com o oxigênio molecular. Tal processo envolve um elétron e produz radical superóxido; por sua vez, o O₂^{•-} pode gerar H₂O₂ tanto por via enzimática quanto por auto-dismutação (Fig. 1.3). Em ambos os casos, o H₂O₂ será produzido como demonstrado em vários estudos (YE et al., 2011; JARAMILLO et al., 2012; EVANS et al., 2014).

1.1.2.3 O impacto do sistema MnP/H₂O₂ em células cancerosas vs normais

O peróxido de hidrogênio produzido *in vivo*, seja por MnP ou por outros meios, pode ser usado por MnP para catalisar a oxidação de marcadores biológicos, tal como grupos tíos nas subunidades p50 e p65 do NF-κB, o qual é subsequentemente inativado (YE et al., 2011;

JARAMILLO et al., 2012; TOVMASYAN et al., 2013b). Numa oxidação modesta, as vias de estresse oxidativo secundárias dependentes de NF- κ B serão suprimidas e a célula recupera-se do estresse oxidativo (ARCHAMBEAU et al., 2013). No entanto, quando os níveis de H₂O₂ são altos como, em células cancerígenas (maiores ainda quando sob efeito de radio ou quimioterapia), a supressão do NF- κ B pode ser tão pronunciada que causa a morte da célula. Dados recentes mostraram que a presença de MnP no meio foi capaz de potencializar a morte celular via inativação dos complexos I e III da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria (JARAMILLO et al., 2012).

Relativamente às células normais, as células cancerígenas encontram-se sob constante estresse oxidativo e com os níveis de H₂O₂ acima do normal, causando alta sensibilidade a adicionais aumentos nos níveis de espécies reativas (BATINIĆ-HABERLE; RAJIC; BENOVA, 2011; MIRIYALA et al., 2012). Tal sensibilidade vem sendo frequentemente explorada pelo uso de radio e quimioterapia, visando causar a morte da célula com câncer pelo excesso de produção de espécies reativas. Baseados nesses sistemas redox celulares, estudos envolvendo o sistema ascorbato/MnP/radiação no tratamento de câncer têm sido desenvolvidos (TOVMASYAN et al., 2015b).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

- Verificar a habilidade de diferentes metaloporfirinas de manganês hidrossolúveis tipicamente utilizadas como agentes terapêuticos redox ativos em catalisar a oxidação aeróbia do ascorbato com vistas à produção de H₂O₂ citotóxico.

1.2.2 Objetivos específicos

- Investigar a eficiência catalítica de metaloporfirinas de manganês como catalisadores da oxidação aeróbia do ascorbato;
- Identificar o composto com a melhor eficiência catalítica para a oxidação do ascorbato como potencial de utilização em estudos pré-clínicos *in vivo*;
- Investigar a influência de efeito estérico das cadeias laterais alquilas das MnPs na cinética da reação.

1.3 Metodologia experimental

1.3.1 Reagentes e solventes

As porfirinas precursoras (H₂T-2-PyP, H₂T-3-PyP e H₂T-4-PyP) foram adquiridas da Frontier Scientific. Os demais reagentes e solventes foram adquiridos da Sigma-Aldrich, e utilizados sem purificação adicional.

1.3.2 Sínteses das MnPs

As MnPs foram sintetizadas e caracterizadas (cloreto como contraíon) de acordo com os procedimentos descritos na literatura (REBOUÇAS et al., 2009; RAJIC et al., 2012; TOVMASYAN et al., 2013c; TOVMASYAN et al., 2014). Os principais métodos de caracterização utilizados foram: espectrofotometria (UV-vis), análise elementar, cromatografia de camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por massas (LC-MS). Para os estudos desenvolvidos neste capítulo, as MnPs foram sintetizadas e caracterizadas pelo aluno de Pós-Doutorado da *Duke University School of Medicine*, Dr. Artak Tovmasyan.

1.3.3 Catálise da oxidação do ascorbato pelas MnPs

1.3.3.1 Medidas espectrofotométricas das velocidades iniciais da oxidação do ascorbato ($v_0(\text{Asc})_{\text{ox}}$) catalisada pelas MnPs

As velocidades iniciais da reação de oxidação do ascorbato foram determinadas em triplicatas com 5 μM de MnP e 0,15 mM ascorbato de sódio sob condições aeróbicas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e pH 7,8 (mantido com 0,05 M de tampão Tris ou tampão fosfato de potássio). Os tampões foram inicialmente tratados com resina de troca iônica Chelex-100 (200-400 mesh, forma Na⁺, Bio-Rad Life Science) a fim de remover metais de transição que possam existir em solução. A oxidação do ascorbato foi acompanhada em um espectrofotômetro Shimadzu UV-2550 UV-vis a partir do decaimento da banda a 265 nm. A absorvidade molar do ascorbato foi obtida espectrofotometricamente considerando $\epsilon_{265\text{nm}} = 14.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. As velocidades iniciais ($v_0(\text{Asc})_{\text{ox}}$) foram calculadas baseadas no monitoramento da diminuição da concentração do ascorbato (em nMs⁻¹) durante os

primeiros 60 segundos de reação. A velocidade para a oxidação de ascorbato não catalisada (controle) foi subtraído das velocidades para a reação catalisada (EVANS et al., 2014).

1.3.3.2 Medidas eletroquímicas das velocidades iniciais do consumo de oxigênio ($v_0(\text{O}_2)_{\text{red}}$)

O oxigênio foi consumido via redução, assim as velocidades iniciais do consumo de oxigênio foram descritas como $(v_0(\text{O}_2)_{\text{red}})$. Os experimentos foram realizados eletroquimicamente com o eletrodo de Clark a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e pH 7,8. Antes de cada medida as soluções foram purgadas com ar (~21% oxigênio). O eletrodo de Clark sensível ao O_2 (0,1 M KCl como solução de preenchimento) foi conectado a um potenciostato. Um potencial de -0.8 V vs. Ag/AgCl foi aplicado ao eletrodo e uma vez que a corrente inicial foi estabilizada (I_{max} , correspondendo a $[\text{O}_2] = 0,255 \text{ mM}$ em solução saturada de ar (BENSON; KRAUSE JR, 1980)) a solução de ascorbato na concentração de 1 mM foi adicionada, seguida pela adição da solução 10 μM da MnP. O decréscimo na corrente (I_{obs}) correspondendo ao decréscimo na concentração de oxigênio ($\Delta[\text{O}_2]$) foi monitorado por pelo menos 300 segundos. A solução foi então submetida à purga com N_2 até que a corrente se estabilizasse novamente (I_{min} , correspondendo a $[\text{O}_2] \approx 0 \text{ mM}$). Isso permitiu o cálculo da concentração de oxigênio em solução (em nM) como $[\text{O}_2]_{\text{obs}} = [(I_{\text{obs}} - I_{\text{min}}) \times 2.55 \times 10^5] / (I_{\text{max}} - I_{\text{min}})$, onde I_{obs} é o valor para a corrente em qualquer dado momento da medida. A velocidade inicial da reação, $v_0 = -\Delta [\text{O}_2]_{\text{obs}} / \Delta t = -[(I_{\text{obs}2} - I_{\text{obs}1}) \times 2.55 \times 10^5] / [(I_{\text{max}} - I_{\text{min}}) \times (t_{\text{obs}2} - t_{\text{obs}1})]$, onde $I_{\text{obs}2}$ e $I_{\text{obs}1}$ são as correntes nos tempos observados ($t_{\text{obs}2}$ e $t_{\text{obs}1}$) relacionados a um intervalo linear de 60 segundos após a adição da MnP. As velocidades iniciais da oxidação do ascorbato e do consumo de oxigênio são dadas em nMs^{-1} .

1.4 Resultados e Discussão

O presente estudo avaliou 14 MnPs hidrossolúveis tipicamente empregadas em estudos de desenvolvimento de agentes terapêuticos redox-ativos com o objetivo de identificar o composto com maior eficiência catalítica para a oxidação aeróbia do ascorbato. Essas MnPs diferem largamente com relação ao potencial de meia-onda ($E_{1/2}$), carga, tamanho, forma, estereoquímica, polaridade e lipofilia. Sob as condições experimentais aqui empregadas (pH 7,8), a forma monoprotonada do ascorbato (HA^-) é a

principal espécie do ascorbato de sódio em solução aquosa. Na reação com $\text{Mn}^{\text{II}}\text{P}$ o ascorbato (HA^-) é oxidado uni-eletronicamente para a forma radical ascorbil (HA^\bullet), o qual é prontamente desprotonado para a espécie A^- (BATINIĆ-HABERLE et al., 2014; EVANS et al., 2014; BATINIĆ-HABERLE; TOVMASYAN; SPASOJEVIC, 2015) (Fig. 1.4). Exceto pela MnTBAP^{3-} , que é uma metaloporfirina aniônica, e assim desfavorece a reação com o ascorbato tanto por questões termodinâmicas quanto eletrostáticas, todas as demais MnPs testadas são carregadas positivamente.

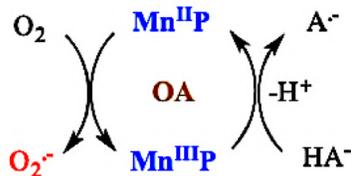


Figura 1.4. Esquema reacional do sistema Ascorbato/ MnP/O_2 . OA, oxidação do ascorbato.

Dentre as *N*-piridilporfirinas de Mn(III) existem representantes com substituintes lineares com cadeias alquilas longas e curtas, algumas delas contém átomos de oxigênio no meio da cadeia linear, outras com substituintes cíclicos, o que podem potencializar efeitos estéricos (Fig. 1.5).

A habilidade das MnPs de catalisar a reação de oxidação do ascorbato foi aqui descrita como a velocidade inicial da reação ($v_0(\text{Asc})_{\text{ox}}$), e a velocidade inicial de consumo (redução) do oxigênio ($v_0(\text{O}_2)_{\text{red}}$). A reação de oxidação do ascorbato foi monitorada por via espectrofotométrica, e a redução do oxigênio foi monitorada por via eletroquímica. Os dados de cinética foram discutidos com respeito às propriedades termodinâmicas das MnPs, em particular o par redox $\text{Mn}^{\text{III}}\text{P}/\text{Mn}^{\text{II}}\text{P}$ ($E_{1/2}$).

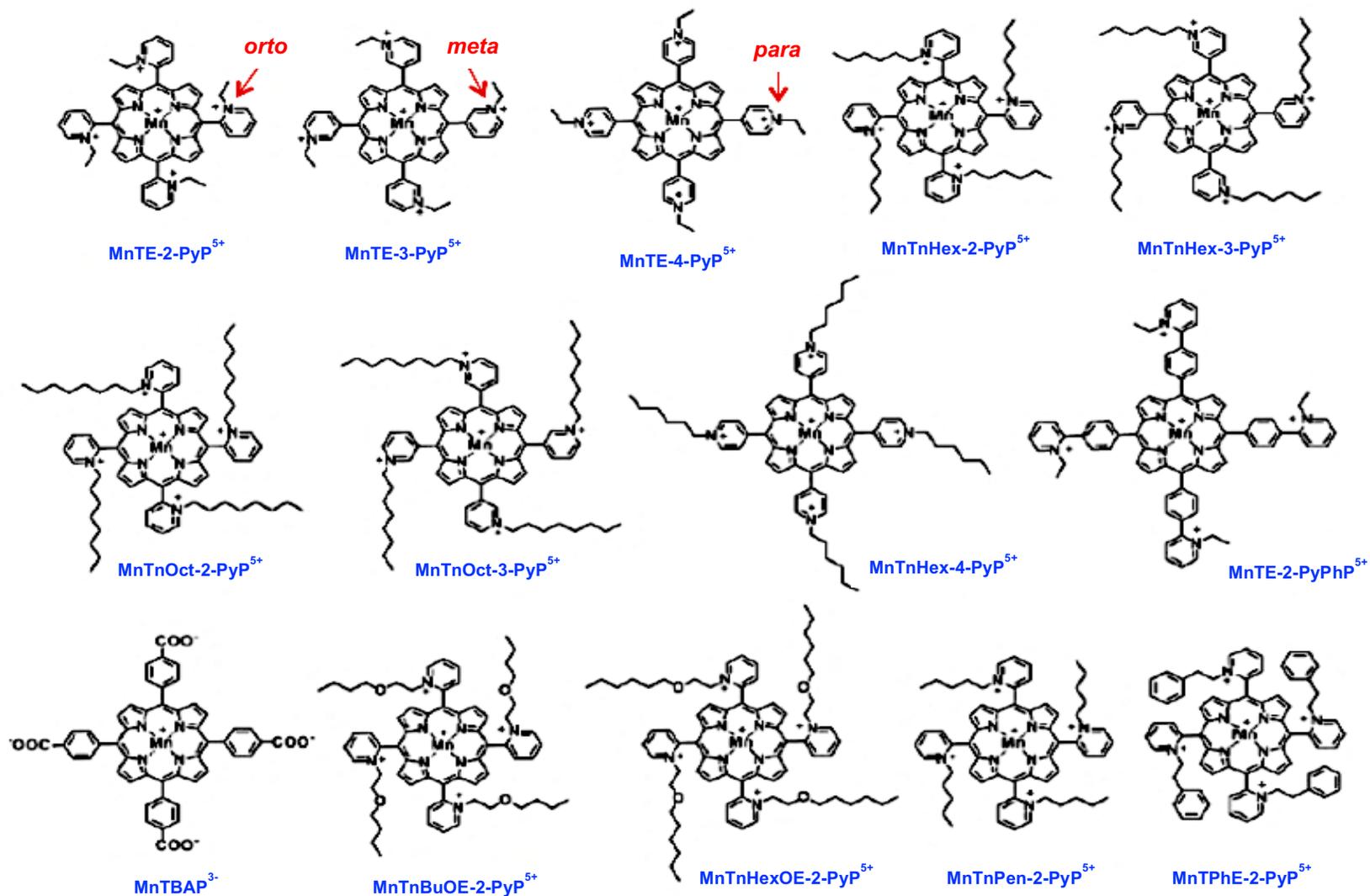


Figura 1.5. Estruturas das Mn(III)-porfirinas cuja habilidade para catalisar a oxidação do ascorbato foi aqui avaliada. Exceto MnTBAP³⁻ e MnTE-2-PyPhP⁵⁺, todas as demais MnPs estudadas são mímicos SOD de potências variadas com $\log k_{\text{cat}}(\text{O}_2^{\cdot-})$ variando numa faixa de 6,53 a 7,92.

1.4.1 A química do sistema MnP/Asc em meio aquoso - O potencial de redução das MnPs afeta a velocidade de oxidação do ascorbato

A habilidade das MnPs de catalisar a oxidação do ascorbato foi avaliada por meio direto (monitoramento espectrofotométrico do consumo de ascorbato) e indireto (monitoramento eletroquímico do consumo de O₂), através de medidas das velocidades iniciais da reação de oxidação do ascorbato ($v_0(\text{Asc})_{\text{ox}}$, **Tab. 1.1** e **Fig. 1.6**), e das velocidades iniciais da redução do oxigênio ($v_0(\text{O}_2)_{\text{red}}$, **Tab. 1.1** e **Fig. 1.7**). O potencial de redução centrado no metal (potencial de meia-onda, $E_{1/2}$), usado como medida das propriedades redox das MnPs, encontra-se listado na **Tabela 1.1** para cada MnP.

Tabela 1.1. Caracterização espectrofotométrica e eletroquímica do sistema MnP/Asc. Os estudos foram realizados em tampão Tris e fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,8 a 25±1°C.

MnPs	Mn ^{III} /Mn ^{II} $E_{1/2}$, mV vs NHE*	$v_0(\text{O}_2)_{\text{red}}$, nMs ⁻¹		$v_0(\text{Asc})_{\text{ox}}$, nMs ⁻¹	
		Tampão Fosfato	Tampão Tris	Tampão Fosfato	Tampão Tris
MnTBAP ³⁻ **	-194	-	-	-	-
MnTE-2-PyP ⁵⁺	-65	49,6±8,7	70,8±7,5	15,2±2,8	11,8±1,4
MnTE-3-PyP ⁵⁺	+54	753,9±90,3	972,2±32,0	201,4±21,2	203,9±19,8
MnTnHex-3-PyP ⁵⁺	+66	639,2±7,2	864,5±41,1	193,1±40,2	191,7±10,8
MnTE-4-PyP ⁵⁺	+70	696,0±52,2	887,0±31,4	185,6±27,9	204,5±31,1
MnTnOct-3-PyP ⁵⁺	+74	838,0±7,1	993,6±10,0	225,4±44,5	216,5±20,0
MnTnHex-4-PyP ⁵⁺	+80	670,5±2,2	887,5±50,8	199,6±25,8	206,7±29,4
MnTE-2-PyP ⁵⁺	+228	679,5±28,0	922,0±89,6	285,7±37,1	307,7±35,1
MnTPhE-2-PyP ⁵⁺	+259	571,1±36,2	575,6±83,6	164,5±21,0	176,3±16,4
MnTnBuOE-2-PyP ⁵⁺	+277	474,1±26,3	856,9±21,0	159,8±28,9	256,5±45,7
MnTnPen-2-PyP ⁵⁺	+278	414,1±32,0	532,9±36,3	152,5±24,0	164,5±21,3
MnTnHexOE-2-PyP ⁵⁺	+313	226,9±5,0	469,7±78,7	81,3±14,3	135,6±10,2
MnTnHex-2-PyP ⁵⁺	+314	310,7±22,9	358,0±14,9	102,7±23,8	95,0±11,3
MnTnOct-2-PyP ⁵⁺	+367	306,3±65,3	304,4±36,8	74,5±15,5	72,1±6,9

*Fonte: KOS et al., 2009; BATINIĆ-HABERLE; REBOUÇAS; SPASOJEVIC, 2010. **Os valores de $v_0(\text{O}_2)_{\text{red}}$ e $v_0(\text{Asc})_{\text{ox}}$ não são aplicáveis, tendo em vista que o composto não apresenta atividade catalítica nesse sistema.

A relação entre as velocidades iniciais $v_0(\text{Asc})_{\text{ox}}$ e $v_0(\text{O}_2)_{\text{red}}$ e o $E_{1/2}$ mostram um perfil na forma de sino (**Figs. 1.6B e 1.7B**). As MnPs com $E_{1/2}$ negativo (tais como MnTBAP^{3-} e MnTE-2-PyPhP^{5+}) têm velocidades iniciais muito baixas. Tais compostos não podem ser facilmente reduzidos com o ascorbato no primeiro passo do ciclo catalítico (**Eq. 1**). Adicionalmente, a MnP aniônica MnTBAP^{3-} poderia repelir o ascorbato na forma HA^- predominante em pH 7,8 (BATINIĆ-HABERLE et al., 2014; BATINIĆ-HABERLE; TOVMASYAN; SPASOJEVIC, 2015). No extremo oposto, aquelas MnPs com potencial de meia-onda muito positivos, por exemplo a $\text{MnTnOct-2-PyP}^{5+}$, são prontamente reduzidas para o estado de oxidação Mn(II), mas são dificilmente reoxidadas ao estado Mn(III) no segundo passo do ciclo catalítico (**Eq. 2, Figs. 1.6 e 1.7**).



Sob condições aeróbicas, devido aos altos níveis de oxigênio disponível no meio, a reoxidação das MnPs cujo potencial é menor que aprox. 300 mV vs. NHE irá provavelmente ocorrer (EVANS et al., 2014). O impedimento estérico relacionado à aproximação do ascorbato ao sítio do Mn em compostos volumosos, tais como a MnTPhE-2-PyP^{5+} (**Figs. 1.6C e 1.7C**), $\text{MnTnHexOE-2-PyP}^{5+}$ e $\text{MnTnOct-2-PyP}^{5+}$, também contribui para os baixos valores observados de $v_0(\text{Asc})_{\text{ox}}$ relativos aos da MnTE-2-PyP^{5+} .

O impacto do $E_{1/2}$ na oxidação do ascorbato coincide com o potencial de meia-onda ótimo para a catálise da dismutação do superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$); e a razão para tal é similar. Tal qual a enzima SOD, onde seus mímicos devem ser igualmente eficientes em oxidar e reduzir o $\text{O}_2^{\bullet-}$, e assim operar com $E_{1/2}$ entre a faixa de $\sim +200$ a $\sim +400$ mV vs NHE (TOVMASYAN et al., 2014), a reação de oxidação do ascorbato também segue a mesma racionalização. É importante se destacar que a habilidade das MnPs em mimetizar as enzimas SOD segue tendências paralelas em todas as reações até então estudadas, tais como atividade catalase (TOVMASYAN et al., 2015a), a redução de ONOO^- (EDHOLM et al., 1988), habilidade de catalisar a oxidação do ascorbato (este trabalho), e a capacidade de mimetizar as enzimas GPx (TOVMASYAN et al., 2018).

A oxidação do ascorbato nos tampões Tris e fosfato de potássio foi realizada em pH 7,8. Tais tampões diferem com relação à capacidade de formação de ligações de hidrogênio. A diferença entre as cinéticas do sistema MnP/ascorbato nos dois tampões foi significativa para aquelas MnPs que têm alta afinidade por formação de ligações de hidrogênio: MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺ e MnTnHexOE-2-PyP⁵⁺ (Figs. 1.6 e 1.7).

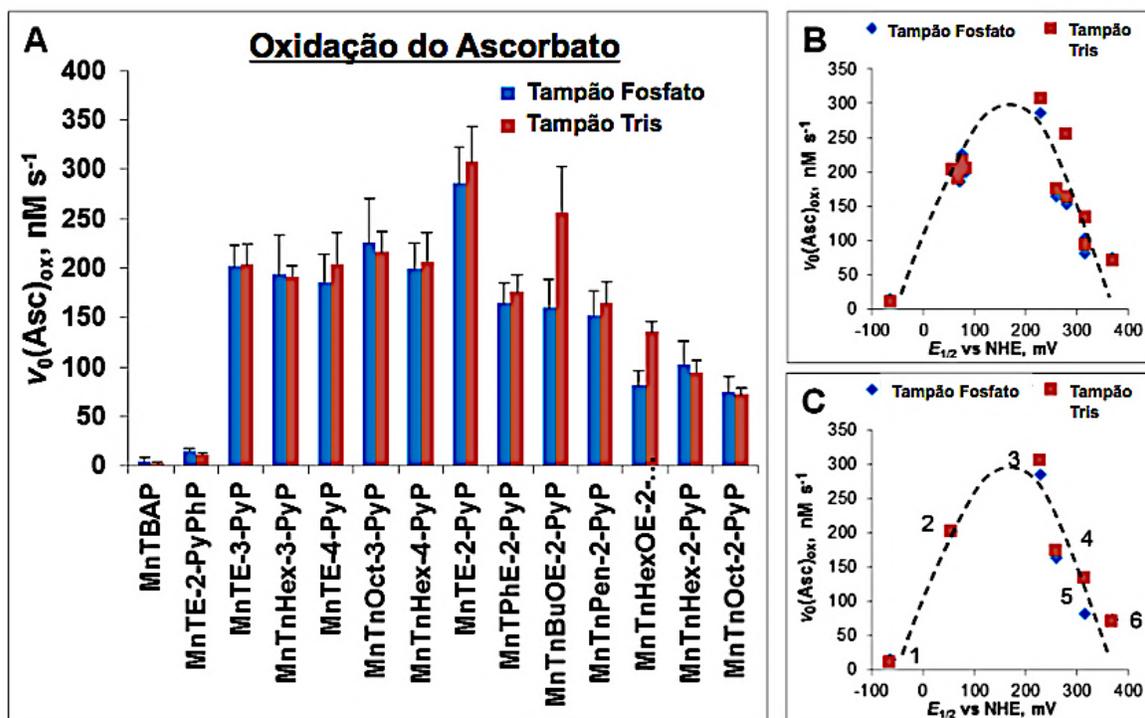


Figura 1.6. Habilidade das MnPs para catalisar a oxidação do ascorbato, conforme determinação espectrofotométrica das velocidades iniciais da oxidação do ascorbato, $v_0(\text{Asc})_{\text{ox}}$. (A) A velocidade inicial da reação foi medida para várias MnPs que diferem entre si com respeito as suas propriedades redox, lipofilia/biodisponibilidade, polaridade, tamanho da cadeia lateral e volume. As v_0 velocidades iniciais foram determinadas com 5 μM da MnP e 0,15 mM de ascorbato de sódio, sob condições aeróbicas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ em pH 7,8 e mantidas com 0,05 M de tampão Tris ou fosfato de potássio. (B) As $v_0(\text{Asc})_{\text{ox}}$ das MnPs guarda uma relação com os seus respectivos valores de $E_{1/2}$ na forma de sino. (C) Seis MnPs com $E_{1/2}$ numa faixa entre -65 a +340 mV vs NHE são apresentadas: (#1) MnTE-2-PyPhP⁵⁺, (#2) MnTE-3-PyP⁵⁺, (#3) MnTE-2-PyP⁵⁺, (#4) MnTPhE-2-PyP⁵⁺, (#5), MnTnHexOE-2-PyP⁵⁺, e (#6) MnTnOct-2-PyP⁵⁺.

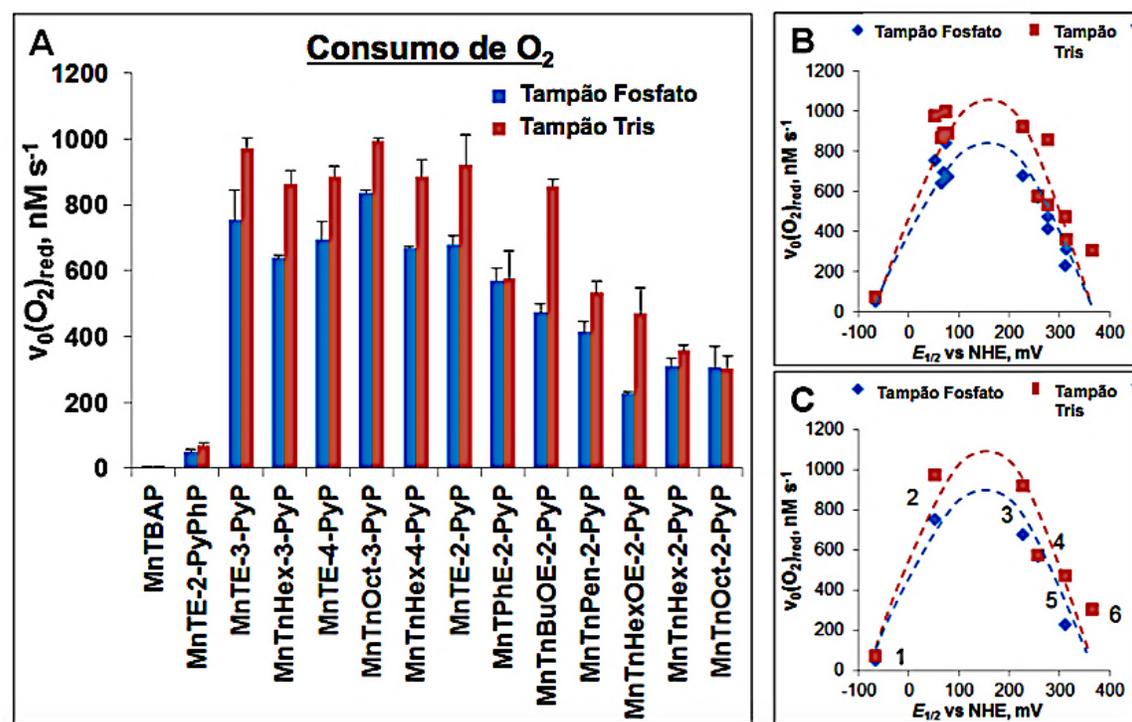


Figura 1.7. Habilidade das MnPs para catalisar a oxidação do ascorbato, conforme determinação eletroquímica das velocidades iniciais da redução do oxigênio, $v_0(\text{O}_2)_{\text{red}}$. (A) MnP/Asc reagem sob condições aeróbicas, de modo que o oxigênio é reduzido para gerar superóxido (Equação 2). A $v_0(\text{O}_2)_{\text{red}}$ foi medida com 10 μM da MnP e 1 mM de ascorbato de sódio, sob condições aeróbicas ($[\text{O}_2] = 0.255 \text{ mM}$) a $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ em pH 7,8 e mantidas com 0,05 M de tampão Tris ou fosfato de potássio. (B) As $v_0(\text{O}_2)_{\text{red}}$ das MnPs guarda uma relação com os seus respectivos valores de $E_{1/2}$ na forma de sino. (C) Seis MnPs com $E_{1/2}$ numa faixa entre -65 a +340 mV vs NHE são apresentadas: (#1) MnTE-2-PyPhP⁵⁺, (#2) MnTE-3-PyP⁵⁺, (#3) MnTE-2-PyP⁵⁺, (#4) MnTPHE-2-PyP⁵⁺, (#5), MnTnHexOE-2-PyP⁵⁺, e (#6) MnTnOct-2-PyP⁵⁺.

O hidrogênio do tampão Tris protonado pode formar ligações de hidrogênio com o oxigênio da cadeia lateral butóxietil ou hexóxietil dos complexos MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺ e MnTnHexOE-2-PyP⁵⁺, respectivamente. Isso aumentaria a carga positiva total da MnP, a qual, por sua vez, poderia melhorar o direcionamento do ascorbato negativamente carregado em direção ao sítio de Mn. O impacto mais relevante do tampão Tris relativo ao tampão fosfato na cinética de oxidação do ascorbato por derivados alcóxiálquila, sugere que ainda

é difícil de prever inteiramente a magnitude do efeito terapêutico das MnPs em um ambiente celular complexo. Tal fato é particularmente verdadeiro, pois as MnPs apresentam distintas características anfifílicas, as quais permitem uma grande diversidade de interações com várias biomoléculas: cinco cargas positivas, cadeias alquílicas, átomos de oxigênio e sítio metálico catiônico deficiente em elétrons favorecendo coordenação axial de diferentes espécies.

1.5 Conclusões

Os dados aqui apresentados fazem parte de um estudo que inclui a avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial anticancer do sistema MnP/Asc (TOVMASYAN et al., 2015b). Os resultados obtidos no escopo do estágio de doutorado sanduíche no exterior (SWE) permitiram a avaliação da eficiência de 14 metaloporfirinas em catalisar a reação de oxidação do ascorbato. O presente estudo foi capaz de determinar as velocidades iniciais ($v_0(\text{Asc})_{\text{ox}}$ e $v_0(\text{O}_2)_{\text{red}}$) para a catálise da reação de oxidação do ascorbato em dois distintos meios (tampões Tris e fosfato) utilizando medidas de espectrofotometria e eletroquímica, de forma que a MnTE-2-PyP⁵⁺ foi a mais eficiente para ambos os tampões avaliados. Os dados demonstraram que as velocidades iniciais estão relacionadas com o $E_{1/2}$ em função da atividade eletrorretiradora associada aos grupos piridínicos catiônicos próximos ao sítio metálico, o que por sua vez controla a termodinâmica e a cinética das reações das MnPs com espécies reativas. Tal relação mostrou uma tendência na forma de sino, sendo a atividade catalítica crescente a partir de potenciais negativos ~ -200 mV *vs* NHE, e com valores ótimos em potenciais na faixa de $\sim +50$ mV a $\sim +300$ mV *vs* NHE.

A cinética da reação catalítica do sistema MnP/ascorbato nos dois tampões foi influenciada pela capacidade de formação de ligações de hidrogênio entre o tampão e a MnP. Do ponto de vista biológico pode-se supor que, quando as MnPs reagem com o ascorbato/O₂ de modo catalítico no espaço extracelular, pode-se formar H₂O₂ que prontamente entra na célula. Uma vez na célula, o H₂O₂ pode então ser utilizado pela própria MnP distribuída intracelularmente em reações de catálise de oxidação de grupos tióis em proteínas específicas ou em reações de S-glutationilação, o que, por sua vez, pode levar à ativação de vias de sinalização celular pró-apoptóticas. Similarmente aos sistemas MnP/radioterapia e/ou MnP/quimioterapia, o sistema MnP/Asc foi explorado com sucesso como uma estratégia anticâncer através do aumento

dos níveis de H₂O₂ em células tumorais (TOVMASYAN et al., 2018), dando continuidade aos estudos físico-químicos descritos nesta tese.

Capítulo 2

Estudos iniciais da atividade haloperoxidase de MnPs hidrossolúveis de interesse como agentes terapêuticos redox-ativos

2.1 Introdução

Na natureza, os metabólitos halogenados são amplamente difundidos e apresentam variadas atividades biológicas. Cerca de 4.000 compostos organo-halogenados são conhecidos por serem produzidos por organismos vivos (GRIBBLE, 2003; ANDERSON; CHAPMAN, 2006). As reações de halogenação em sistemas biológicos são catalisadas principalmente por enzimas e são essenciais para a biossíntese de muitos produtos naturais (GRIBBLE, 2003). Devido à ampla distribuição de compostos naturais halogenados, as enzimas envolvidas na bio-halogenação foram descobertas a partir de uma ampla gama de organismos, incluindo fungos, algas e bactérias. A primeira enzima halogenante foi descrita a partir do fungo *Caldariomyces fumago*, produtor de caldariomicina, como uma haloperoxidase contendo o grupo heme (MORRIS; HAGER, 1966) e, posteriormente, várias haloperoxidasas foram descobertas a partir de diversos fungos, outros microorganismos e seres humanos (JAKOPITSCH et al., 2001; HENDERSON; HEINECHE, 2003; ULLRICH et al., 2004).

Atualmente, duas classes distintas de enzimas halogenantes foram categorizadas com base na natureza do seu substrato: haloperoxidasas (HPO) e halogenases (KLING et al., 2005). As enzimas HPOs contêm o grupo prostético heme (heme-HPO) ou o íon vanádio (vHPO) como cofator no sítio ativo e usam o H₂O₂ como co-substrato. Em contraste, as enzimas dependentes de flavina e não heme, são dependentes de Fe²⁺ e requerem o O₂ como acceptor de elétrons, por isso elas foram denominadas halogenases dependentes de O₂ (VAILLANCOURT et al., 2006). Demonstrou-se que as HPOs eram menos específicas, enquanto as halogenases poderiam ser altamente específicas para substratos (KLING et al., 2005; VAN PEE; PATALLO, 2006).

As HPOs geram hipohaleto (ácidos fracos) que, na maioria dos casos, são liberados das enzimas para halogenar substratos orgânicos. Essas enzimas catalisam a oxidação de haleto via transferência de dois elétrons na presença de peróxido de hidrogênio. Elas são nomeadas de acordo com o haleto mais eletronegativo que podem oxidar. As enzimas com atividade cloroperoxidase (CPO) catalisam a oxidação de cloreto, brometo e iodeto; as bromoperoxidase (BPO) catalisam a oxidação de brometo e iodeto, e as iodoperoxidase (IPO) são específicas para o iodeto. Desde a descoberta há 53 anos da primeira CPO fúngica proveniente do *C. fumago* (MORRIS; HAGER, 1966), as heme-HPO têm sido caracterizadas em animais e o metabolismo de halogenetos mostrou-se essencial na fisiologia dos vertebrados. A tireóide peroxidase (enzima semelhante à IPO) desempenha um papel fundamental na síntese dos hormônios tireoidianos T3 (triiodotironina) e T4 (tiroxina), que são essenciais para o desenvolvimento e maturação de muitos órgãos, especialmente do sistema nervoso (PORTERFIELD; HEINDRICH, 1993).

Adicionalmente, foram descobertas outras HPOs envolvidas na defesa do hospedeiro e efeitos antimicrobianos, como a mieloperoxidase (MPO, enzima semelhante à CPO) encontrada em neutrófilos, a peroxidase eosinofílica (enzima semelhante a BPO) encontrada em fagócitos, e a lactoperoxidase (enzima semelhante à BPO) encontrada em secreções exócrinas humanas (FURTMÜLLER et al., 2006). Em algas marinhas, as vHPO são apontadas como enzimas de fundamental importância na produção de halocarbonos voláteis e mecanismos de defesa. Em uma escala maior, acredita-se que esses compostos halogenados, especialmente os iodados e o iodo molecular, tenham um impacto significativo na química atmosférica (LEBLANC et al., 2006). A importância fisiológica e ambiental dos processos de halogenação, bem como o crescente interesse nos haleto orgânicos como potenciais fármacos, têm incentivado estudos bioquímicos e químicos (BUTLER; CARTER-FRANKLIN, 2004; VAILLANCOURT et al., 2006).

A CPO (*C. fumago*), que é uma heme-HPO, apresenta um ligante axial tiolato no grupo heme e, assim, assemelha-se estruturalmente ao citocromo P450. Quando se considera o mecanismo de reação, a CPO assemelha-se à MPO, onde partindo do seu estado de repouso, a CPO reage com o H_2O_2 e proporciona a formação de uma espécie radical ferro(IV)oxo porfirina π -cátion chamada de Composto I (Fig. 2.1). Tal complexo é o responsável pela oxidação do íon cloreto levando à formação do intermediário reacional

hipoclorito férrico ($\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OCl})$) (DUNFORD, 1999). O Composto I da CPO já foi bem caracterizado por meio de análises de absorção e medidas espectroscópicas (GREEN et al., 2004).

Acredita-se que o $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OCl})$ é o composto-chave para a cloração de substratos orgânicos pela CPO, bem como para a atividade antimicrobiana da MPO, porém, isso ainda não foi comprovado. No entanto, hoje em dia está bem estabelecido que a modificação do grupo heme e a formação da ligação covalente ocorre de forma autocatalítica, ou seja, necessita de oxidação da enzima para o Composto I mediada por um peróxido. Estudos reportaram a identificação de ligação covalente de um grupo heme modificado autocataliticamente a um resíduo glutâmico na família CYP4 das enzimas dos citocromos P450 (HENNE et al., 2001; LEBRUN et al., 2002).

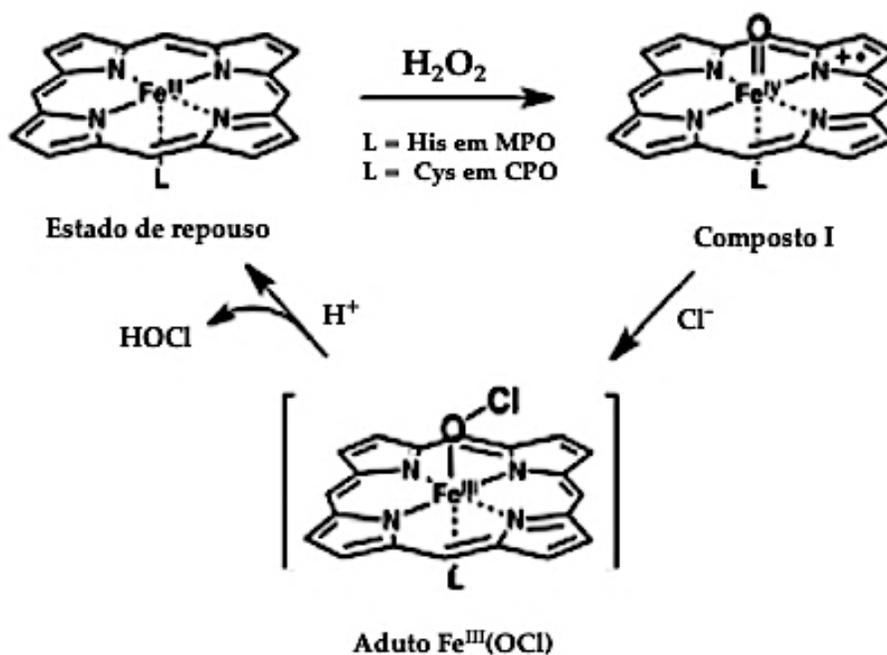


Figura 2.1. Estrutura de Composto I envolvido no mecanismo de reação atribuído às enzimas CPO e MPO. #Adaptado de FUJI, 2016.

Um mecanismo de reação proposto para as enzimas peroxidase por meio de estudos prévios destaca as peroxidases de mamíferos, as quais catalisam eficientemente as reações de oxidação envolvendo a transferência de um ou dois elétrons (FURTMÜLLER et al., 2006). Em ambos os ciclos, o Composto I é o intermediário redox central formado pela

reação do Fe(III) com o H₂O₂, tal complexo contém dois equivalentes oxidantes a mais do que a enzima em repouso (**Eq. 1**). O par histidina-arginina distal típico das enzimas heme-peroxidase desempenha um papel crítico na ligação, orientação e ativação do H₂O₂ na bolsa distal. Considerando a ligação O-O (H₂O₂), a histidina distal das heme-peroxidases atua como um receptor do próton a partir de um oxigênio e como um doador para o outro, enquanto a arginina distal modula a ionização da histidina diminuindo o pK_a do N_δ do imidazol, e assim polariza a ligação O-O a fim de promover um ataque nucleofílico no grupo heme e, subsequentemente, causar uma clivagem heterolítica (POULOS; KRAUT, 1980; RODRIGUEZ-LOPEZ et al., 2001; LIU et al., 2002). Desta forma, um oxigênio sai como água, enquanto o outro permanece coordenado ao ferro (**Eq. 1**). O oxigênio ligado ao ferro contém formalmente apenas seis elétrons de valência e é, portanto, um potente agente oxidante (DUNFORD, 1999). Um elétron é removido do ferro para gerar o intermediário ferro(IV)oxo [Fe(IV)=O], e um segundo elétron é removido da porfirina para gerar a espécie radical ferro(IV)oxo porfirina π-cátion (DUNFORD, 1999).



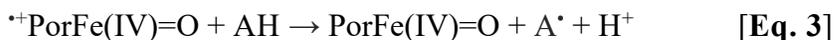
Em contraste com a formação do Composto I, as ligações heme à proteína desempenham um papel importante na redução do Composto I. As peroxidases de mamíferos são únicas na sua capacidade de oxidar pseudo-haletos em pseudo-hipohaletos a elevadas velocidades, sendo o Composto I reduzido num passo de dois elétrons para a forma da enzima férrica. Tal reação é dada como na **Equação 2**.



Na **Eq. 2**, X⁻ denota os substratos fisiológicos dessas enzimas, a saber, Cl⁻, Br⁻, I⁻ ou SCN⁻. A ordem de oxidação desses doadores de elétrons é a seguinte: SCN⁻ > I⁻ > Br⁻ > Cl⁻ (ARNHOLD et al., 2006). Em pH 7, os potenciais de redução padrão para o par redox HXO/X⁻, H₂O são: 1,27 V (Cl⁻), 1,13 V (Br⁻), 0,78 V (I⁻) e 0,56 V (SCN⁻) (ARNHOLD et al., 2006).

O Composto I das peroxidases de mamíferos também pode ser reduzido por dois passos consecutivos com transferência de um elétron por etapa para a enzima férrica via o

composto intermediário complexo II [PorFe(IV)=O], pelo qual numerosos pequenos substratos moleculares podem ser oxidados, a saber, aminoácidos aromáticos, ácidos, nitrito, derivados indólicos e outros compostos (**Eq. 3** e **Eq. 4**) (MARQUEZ; DUNFORD, 1995; BURNER; JANTSCHKO; OBINGER, 1999; BURNER et al., 2000; JANTSCHKO et al., 2002).



Essas reações, juntamente com a oxidação da enzima por peróxido de hidrogênio (**Eq. 1**), formam o ciclo das enzimas peroxidase.

É notório que as enzimas CPO podem utilizar íons cloreto, brometo e iodeto para catalisar a formação de uma ligação carbono-halogênio na presença de moléculas receptoras adequadas, onde as moléculas com esta finalidade são: β -ceto ácidos, β -dicetonas cíclicas e fenóis substituídos. O método clássico para determinar a existência da atividade CPO baseia-se na halogenação da monoclorodimedona (MCD) pelo hipoclorito ou hipobromito que são formados no meio reacional (HAGER et al., 1966).

A MCD (β -dicetona cíclica) é estudada como um mímico do precursor natural da caldicaromicina, o composto clorado isolado de *C. fumago* (HAGER et al., 1966). O método é baseado na conversão da β -dicetona monohalogenada (MCD) em um produto dihalogenado (halo-MCD) (**Fig. 2.2**). Como as absorções ópticas de MCD ($\epsilon_{290\text{nm}} = 20.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e halo-MCD ($\epsilon_{290\text{nm}} = 100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) são claramente distintas uma da outra, essa reação forneceu um ensaio simples que foi usado para investigar o mecanismo cinético da enzima vHPO (DE BOER; WEVER, 1988; EVERETT; SOEDJAK; BUTLER, 1990). Desta forma, a conversão pode ser facilmente monitorada espectrofotometricamente pela diminuição da absorção de UV-vis, que é diretamente proporcional à atividade enzimática. O ensaio com a MCD tornou-se o método analítico rotineiramente usado para identificar HPOs e para caracterizar sua atividade halogenante. Nessa reação iniciada enzimaticamente, a halogenação real é inespecificamente conduzida por meio do hipohaletto difusível livre e, portanto, em substratos geralmente susceptíveis à halogenação, observam-se padrões semelhantes de halogenação para reações não enzimáticas com o hipohaletto livre em solução (WEVER; HEMRIKA, 2001; VAN PEE et al., 2006).

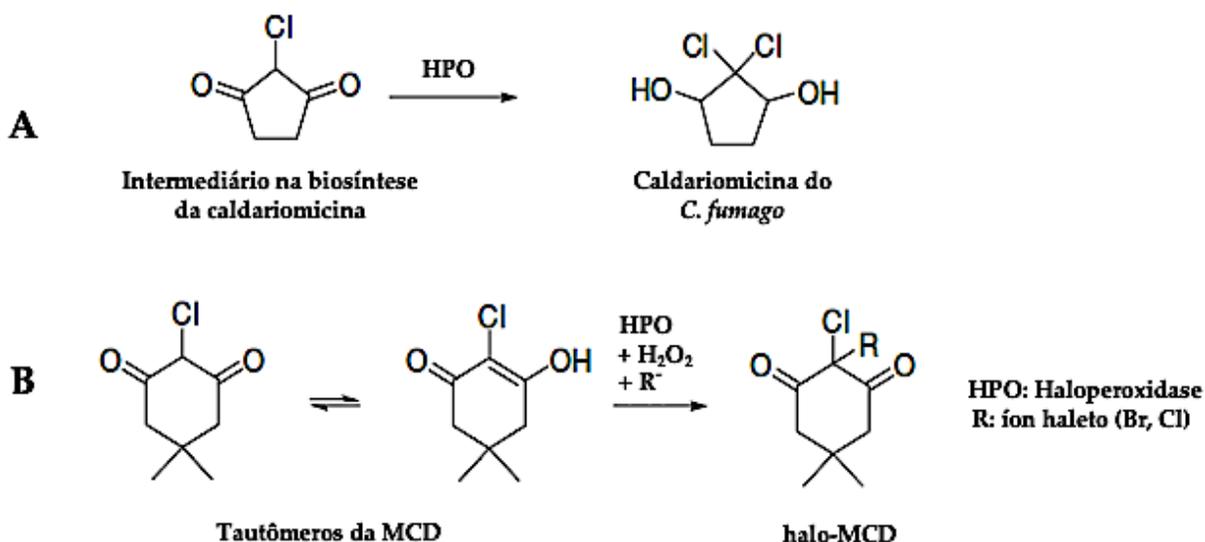


Figura 2.2. Representação de estruturas moleculares: A) intermediário reacional e a molécula da caldariomicina durante a sua biosíntese pelo fungo *C. fumago*. B) ensaio clássico da halogenação da monoclorodimedona (MCD).

Por outro lado, tal ensaio não pode ser aplicado à determinação da atividade da enzima IPO, pois a MCD não é reativa para a iodação. Pelo uso de método espectrofotométrico, o vermelho de fenol foi empregado para a detecção das atividades de bromação e cloração catalisadas por vHPO (DE BOER et al., 1987; SOEDJAK; BUTLER, 1990). No entanto, a halogenação do vermelho de fenol é lenta e não estequiométrica. Por essas razões, tal método é indicado apenas para fins qualitativos. A análise da atividade IPO baseia-se na detecção espectrofotométrica de triiodeto (I_3^-) em 350 nm (VILTER, 1995). Esse método levou à caracterização bioquímica de vIPOs específicas de algas marrons da família Laminariaceae (ALMEIDA, 2001; COLIN et al., 2005).

As Mn-porfirinas (MnPs) sintéticas e sistemas relacionados têm sido utilizados como modelos químicos de reações de monooxigenação biológica catalizadas por heme proteínas (MCLAIN; LEE; GROVES, 2000) Através da reação com compostos doadores de oxigênio, tais como, iodosilbenzeno, hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio, oxigênio molecular, dentre outros, as MnPs podem causar a oxigenação catalítica de alcanos, alcenos, e compostos contendo nitrogênio e enxofre (GROVES; SHALYAEV; LEE, 2000) Entre o final da década de 1990 e início dos anos 2000, Groves e colaboradores caracterizaram e

reportaram o composto-chave responsável por realizar a transferência eficiente de um átomo de oxigênio (ligante oxo) para o íon haleto livre em solução, onde tal reação foi definida como rápida e reversível (**Fig. 2.3**) (GROVES; LEE; MARLA, 1997; JIN; GROVES, 1999; JIN et al., 2000).

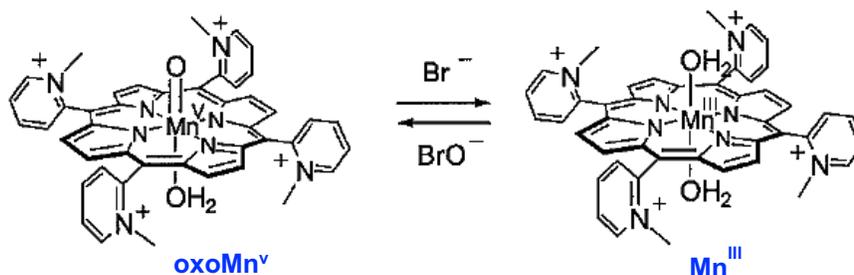


Figura 2.3. Esquema da reação reversível de transferência de um átomo de oxigênio (ligante oxo) entre uma MnP (no exemplo, MnTM-2-PyP⁵⁺) e um íon haleto (no exemplo, íon brometo). #Adaptado de JIN et al., 2000.

A reação direta (**Fig. 2.3**) mimetiza a reação de oxidação do haleto catalizada por HPOs (LABAT; MEUNIER, 1990; BUTLER; WALKER, 1993), enquanto a reação reversa representa a ativação do catalisador durante a oxidação do substrato pela MnP. Tal equilíbrio permite a geração da energia livre necessária para que essa reação ocorra. Adicionalmente, tendo em vista a estabilidade em solução aquosa de vários exemplares das MnPs, intermediários do tipo oxoMn^v (**Fig. 2.3**) podem ser formados por reações estequiométricas entre as MnP^{III} e oxidantes como OCl⁻, OBr⁻, *m*-CPBA (ácido cloroperoxibenzóico), entre outros (GROVES; LEE; MARLA, 1997; JIN; GROVES, 1999; JIN et al., 2000).

Como demonstrado em vários estudos e referenciado no capítulo anterior, as MnPs guardam um abrangente potencial terapêutico (GRIDLEY et al., 2007; GAUTER-FLECKENSTEIN et al., 2008; GAUTER-FLECKENSTEIN et al., 2010; TOVMASYAN et al., 2015b; WEITZEL et al., 2015; BOSS et al., 2017; LEU et al., 2017; TOVMASYAN et al., 2018). Evidências substanciais de que as MnPs estão envolvidas na produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foram reportadas (JARAMILLO et al., 2012; EVANS et al., 2014); aditivamente, as MnPs usam o H₂O₂ juntamente com a glutatona (GSH) para catalisar a S-glutationilação de proteínas de sinalização celular, atuando tanto na forma de tiol oxidase

quanto na forma de glutathiona peroxidase (JARAMILLO et al., 2012; EVANS et al., 2014; JARAMILLO et al., 2015). Dada a importância das reações de halogenação em sistemas biológicos (ANDERSON; CHAPMAN, 2006; GRIBBLE, 2003), faz-se relevante estudar o comportamento de MnPs em ambiente contendo simultaneamente H_2O_2 e íons haleto (Br^- , Cl^-) mediante a presença de moléculas halogenáveis, tal como pode ocorrer em meios biológicos. Adicionalmente, embora o método analítico clássico para determinação da atividade CPO seja iniciado enzimaticamente, a halogenação do substrato orgânico de fato resulta de reação inespecificamente com os íons hipohaleto livres em solução (OBr^- , OCI^-) e, portanto, em substratos geralmente susceptíveis à halogenação (MCD), observam-se padrões semelhantes de halogenação para reações não enzimáticas.

Perante o exposto, este estudo propõe a aplicação de um ensaio espectrofotométrico adaptado para a investigação da atividade HPO de MnPs com base na halogenação da MCD.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo geral

- Avaliar a atividade haloperoxidase de nove MnPs tipicamente envolvidas em estudos de modulação redox de estresse oxidativo, fazendo uso do ensaio espectrofotométrico clássico de halogenação de MCD.

2.2.2 Objetivos específicos

- Adaptar a metodologia espectrofotométrica do ensaio de halogenação de MCD para análise de atividade CPO e BPO de MnPs;
- Verificar o impacto do desenho estrutural de MnPs catiônicas comumente utilizadas em ensaios biológicos sobre a sua atividade HPO.

2.3 Metodologia experimental

2.3.1 Reagentes e solventes

Os solventes e aditivos usados foram: tampão fosfato de potássio (Sigma-Aldrich), etanol absoluto (Tedia), éter etílico (Tedia), ácido clorídrico (Química Moderna), cloreto de potássio (Dinâmica) e brometo de potássio (Sigma-Aldrich).

Os reagentes usados foram: dimedona da Sigma-Aldrich, hipoclorito de sódio comercial titulado conforme a literatura (VOGEL, 1989), hidróxido de sódio da Vetec, peróxido de hidrogênio da Química Moderna.

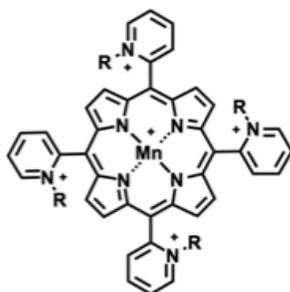
Os demais reagentes e solventes foram adquiridos da Sigma-Aldrich, e utilizados sem purificação adicional.

2.3.2 Sínteses das MnPs

As MnPs foram sintetizadas e caracterizadas (cloreto como contraíón) de acordo com os procedimentos descritos na literatura (REBOUÇAS et al., 2009; RAJIC et al., 2012; TOVMASYAN et al., 2013c; TOVMASYAN et al., 2014). Os principais métodos de caracterização utilizados foram: espectrofotometria (UV-vis), análise elementar, cromatografia de camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por massas (LC-MS). Para os estudos desenvolvidos neste capítulo, as MnPs foram sintetizadas e caracterizadas pelo aluno de Doutorado da UFPB, Rômulo Severo Sampaio.

No total, nove MnPs foram utilizadas nos ensaios de testes catalíticos desta pesquisa, sendo quatro MnPs gentilmente cedidas e de maneira eventual, através de colaboração com os integrantes do nosso grupo de pesquisa (**Fig. 2.4**), a saber, MnTM-2-PyP⁵⁺, MnTM-3-PyP⁵⁺, MnTM-4-PyP⁵⁺ por Caio V. de Lima, e MnTPr-2-PyP⁵⁺ por Jacqueline C. B. J. de Jesus.

orto MnPs catiônicas



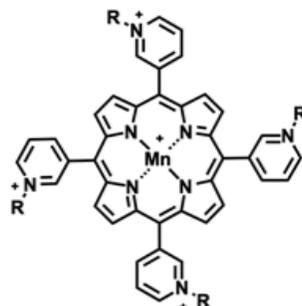
MnTM-2-PyP⁵⁺ (R= -CH₃)

MnTE-2-PyP⁵⁺ (R= -C₂H₅)

MnTPr-2-PyP⁵⁺ (R= -C₃H₇)

MnTnHex-2-PyP⁵⁺ (R= -nC₆H₁₃)

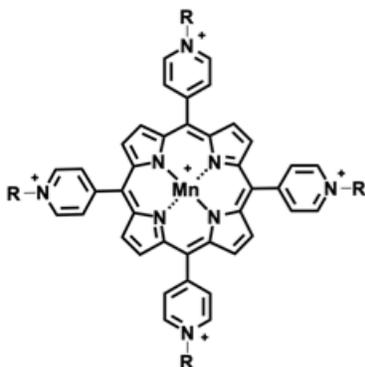
meta MnPs catiônicas



MnTM-3-PyP⁵⁺ (R= -CH₃)

MnTE-3-PyP⁵⁺ (R= -C₂H₅)

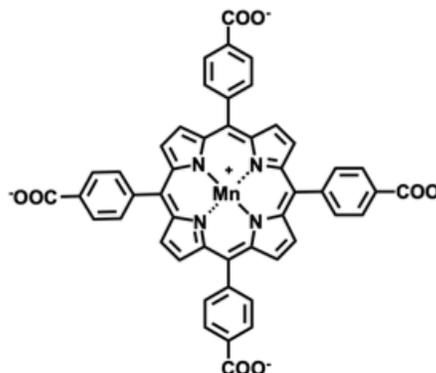
para MnPs catiônicas



MnTM-4-PyP⁵⁺ (R= -CH₃)

MnTE-4-PyP⁵⁺ (R= -C₂H₅)

MnP aniônica



MnTBAP³⁻

Figura 2.4. Estruturas das nove MnPs utilizadas nos ensaios de análise da atividade haloperoxidase das MnPs. O grupo R corresponde à cadeia lateral alquila das MnPs.

2.3.3 Síntese da monoclorodimedona (MCD)

A monoclorodimedona foi preparada por meio do método descrito por Hager e colaboradores (HAGER et al., 1966) (Fig. 2.5). Brevemente, adicionaram-se gota a gota 2 mL de uma solução aquosa a 3,8% de hipoclorito de sódio (1×10^{-3} mol) a 140 mg de dimedona

(1×10^{-3} mol) dissolvidos em 2 mL de hidróxido de sódio 1 M. A adição foi realizada em temperatura ambiente com agitação magnética contínua. Quando a adição de hipoclorito de sódio estava completa, a mistura foi extraída duas vezes com porções de 1,25 mL de éter etílico para remover os produtos secundários. A monoclorodimedona foi precipitada da fase aquosa pela adição de 3,50 mL de ácido clorídrico 1 M. A recristalização em etanol absoluto forneceu 46,8 mg de monoclorodimedona (rendimento = 27%), P.F. 157°C. O ponto de fusão reportado é de 161°C (HAGER et al., 1966). UV-vis: (λ_{\max} em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8) 290 nm ($\epsilon_{290\text{nm}} = 20.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

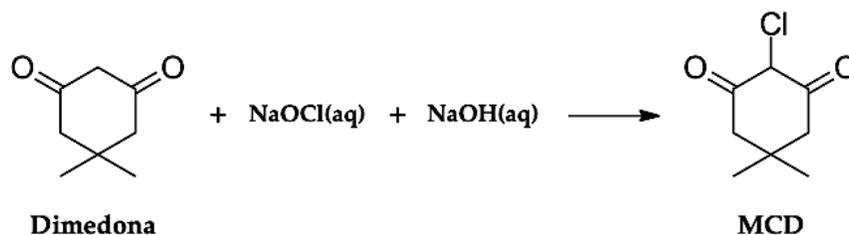


Figura 2.5. Esquema de síntese da monoclorodimedona (MCD).

2.3.4 Metodologia de halogenação catalítica da MCD por MnPs

Os ensaios de halogenação da MCD catalisada por MnPs foram realizados por meio de uma adaptação metodológica proposta com base nos estudos de catálise enzimática de Hager e colaboradores (HAGER et al., 1966). As análises foram realizadas em triplicatas usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-2550 UV-vis. Num típico ensaio catalítico aqui desenvolvido visando a halogenação da MCD, os compostos foram adicionados sequencialmente na mesma cubeta de quartzo, a saber: primeiramente, adicionou-se 2,8 mL de tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,8; depois, adicionou-se 65 μL de uma solução da monoclorodimedona a 2,43 mM solubilizada em tampão fosfato 100 mM, pH 7,8; posteriormente, acrescentou-se 60 μL de uma solução aquosa de KCl ou KBr 1 M; em seguida, adicionou-se 60 μL de uma solução aquosa de peróxido de hidrogênio 100 mM; por fim, acrescentou-se 26 μL de uma solução aquosa da MnP, cuja concentração do estoque foi ajustado para cada ensaio. O volume total na cubeta perfaz 3 mL. Cabe destacar que as concentrações finais de todos reativos na cubeta foram mantidas invariáveis para todos os ensaios, exceto, as concentrações das MnPs sob análise, as quais variaram entre 5 μM e 25 μM na cubeta; os demais reativos tiveram concentrações iniciais na cubeta fixas em

52 μM de MCD, 20 mM de cloreto ou brometo, e 2 mM de H_2O_2 . Imediatamente após a adição da MnP, o decaimento da banda em 290 nm foi acompanhada espectrofotometricamente durante 60 segundos. Para a determinação dos parâmetros cinéticos, usou-se o método da velocidade inicial experimental para os primeiros 15 segundos de reação (ATKINS, 2003). As velocidades iniciais das reações de halogenação da MCD são dadas em mMs^{-1} .

2.4 Resultados e Discussão

O estudo desenvolvido no presente capítulo avaliou nove MnPs com o objetivo de identificar a presença de atividade CPO nestes complexos, bem como propor uma adaptação metodológica aplicada para a análise do comportamento dessas MnPs com propriedades físico-químicas distintas usando a espectrofotometria de UV-vis.

As MnPs utilizadas nos ensaios são na sua maioria carregadas positivamente e diferem largamente com relação ao potencial de meia-onda associado à redução Mn(III)/Mn(II) ($E_{1/2}$), carga, tamanho, forma, estereoquímica e polaridade. A única metaloporfirina aniônica utilizada foi a MnTBAP³⁻.

O sistema MnP/ H_2O_2 /MCD não causa alteração ao longo do tempo na absorbância em $\lambda_{\text{max}} = 290$ nm da MCD. Contudo, pela adição de MnP na presença de íons haleto ao meio reacional, observa-se um rápido decréscimo da banda de absorção em $\lambda_{\text{max}} = 290$ (Fig. 2.6). Tal comportamento é consistente com a introdução de um átomo de bromo ou cloro na estrutura da MCD levando à formação do composto dihalogenado (halo-MCD) a 5,5-dimetil-4-bromo-4-cloro-1,3-ciclohexanodiona, ou a 5,5-dimetil-4,4-dicloro-1,3-ciclohexanodiona, respectivamente.

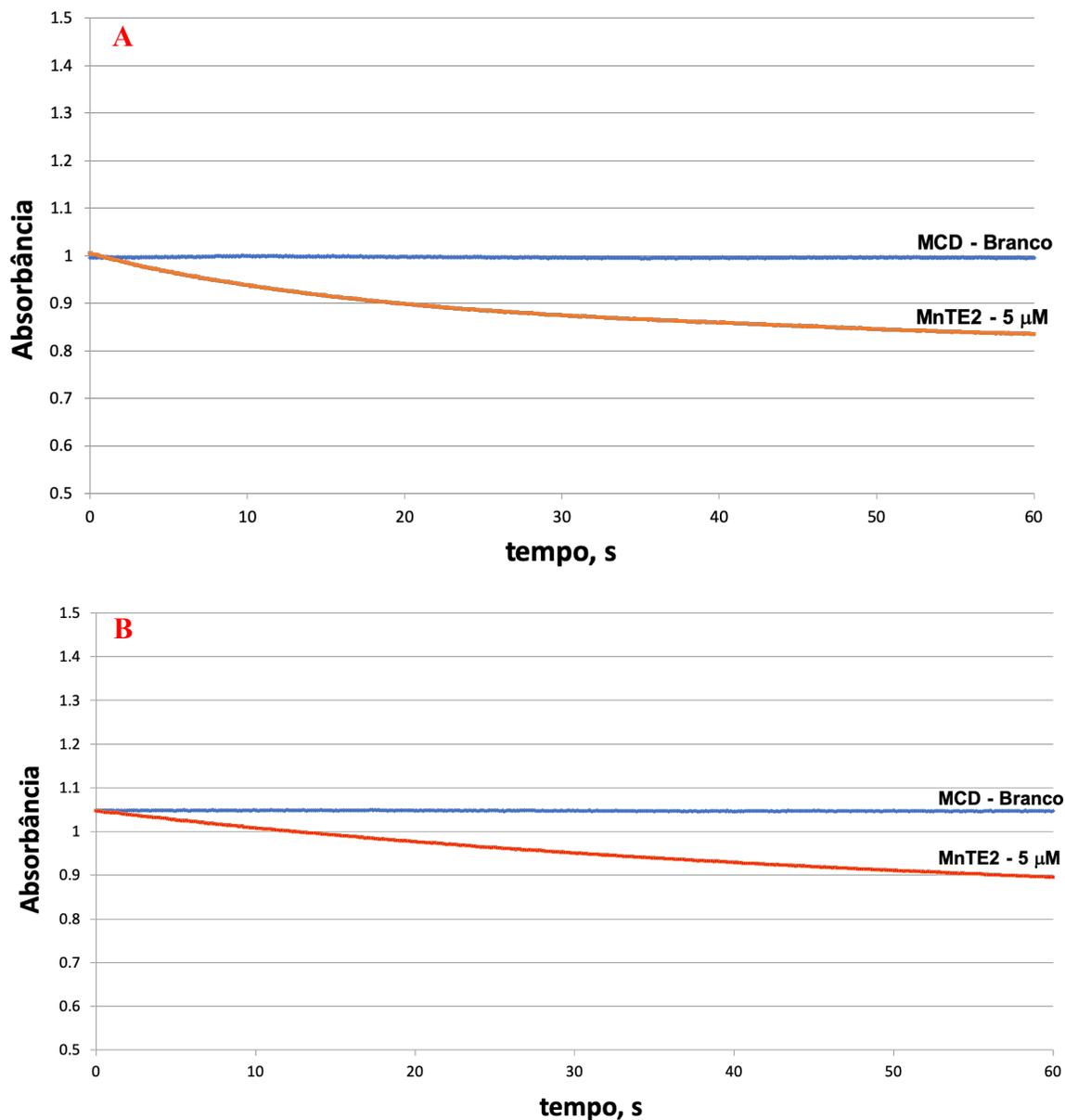


Figura 2.6. Consumo da MCD durante reações de bromação (A) e cloração (B) na ausência (controle, ou seja, sem catalisador) e na presença de MnTE-2-PyP⁵⁺ 5 μM (catalisador). A análise espectrofotométrica (Shimadzu UV-2550 UV-vis) foi monitorada a 290 nm por 60 segundos. Reação em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a 25±1°C.

Estudos para verificar a relação entre a velocidade inicial da reação (v_0) e a concentração das MnPs empregadas nos ensaios de halogenação catalítica da MCD foram empreendidos conforme descrito na seção experimental. Através da análise dos dados pôde-se observar que, exceto pela MnTBAP³⁻, todas as MnPs avaliadas apresentam uma relação

de proporcionalidade direta entre a v_0 e a concentração, considerando que a reação segue uma cinética de primeira ordem (LEE; HUNT; GROVES, 1998; JIN; GROVES, 1999; JIN et al., 2000). Tal comportamento é consistente com a efetivação da reação de halogenação da MCD, e assim, as MnPs demonstraram o seu potencial com relação à bromação (atividade BPO), pela conversão catalítica da MCD em halo-MCD. Nessas reações, um átomo de bromo é incorporado à molécula da MCD. Apenas três MnPs, a saber, MnTM-2-PyP⁵⁺, MnTE-2-PyP⁵⁺ e MnTPr-2-PyP⁵⁺, apresentaram velocidades iniciais de halogenação condizentes com a efetivação das reações de cloração da MCD, porém, as demais MnPs avaliadas neste estudo não seguiram o mesmo perfil. Tais compostos demonstraram o seu potencial com relação à cloração (atividade CPO), pela conversão catalítica da MCD em halo-MCD, com um átomo de cloro sendo incorporado à MCD.

Partindo-se desse racional, foi realizada uma regressão linear de $\log v_0$ vs $\log [\text{MnP}]$. Este tipo de modelo permite uma estimativa do $\log k_{\text{obs}}$, onde a ordem da reação (n) foi calculada de acordo com a seguinte equação: $\log v_0 = \log [\text{MnP}]n + \log k_{\text{obs}}$. Através de tal abordagem, pôde-se demonstrar que a reação é de aproximadamente primeira ordem para a MnP (Fig. 2.7).

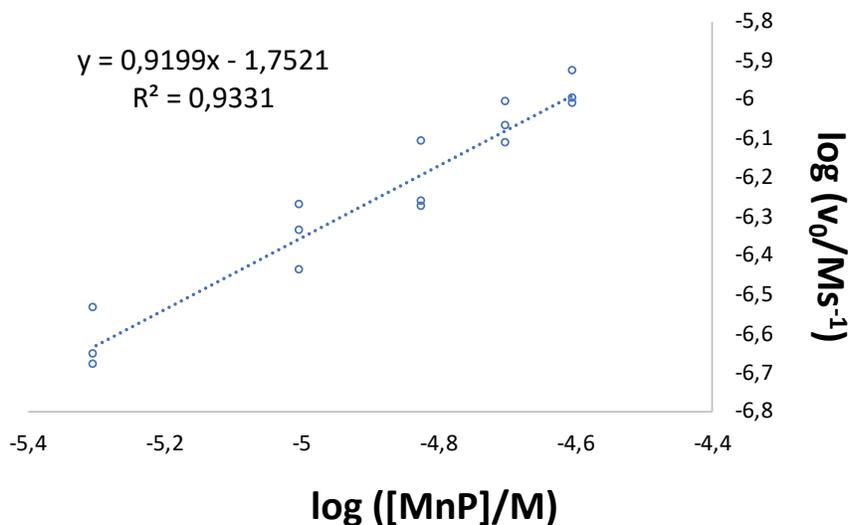


Figura 2.7. Exemplo de uma curva de regressão linear usada para o cálculo da ordem da reação (n) para as MnPs (neste exemplo, a MnTE-2-PyP⁵⁺). Medidas representativas a partir de reações de bromação da MCD em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a 25±1°C. A velocidade inicial experimental (v_0) foi calculada de 0-15s. A da ordem da reação (n) é dada como o coeficiente angular da equação: $\log v_0 = \log [\text{MnP}]n + \log k_{\text{obs}}$.

Com o objetivo de identificar a MnP de melhor eficiência na reação de halogenação catalítica da MCD, foi realizado o cálculo da constante observada experimentalmente (k_{obs}) através de uma curva de regressão considerando os primeiros 15 segundos de reação para efeitos de comparação entre as nove MnPs avaliadas nesse estudo. A análise dos dados revelou que o intercepto na regressão linear entre a velocidade inicial da reação (v_0) versus a concentração das MnPs representa o valor da reação não catalisada, pois mesmo na ausência de MnP existe reação ocorrendo. Assim, o modelo matemático é sugerido como se segue:

$$\text{velocidade (medida)} = \text{velocidade (reação catal.)} + \text{velocidade (reação não catal.)}$$

Verificando-se que a reação é aproximadamente de primeira ordem em MnP para todos os casos onde existe atividade catalítica (JIN et al., 2000), torna-se válido propor o seguinte modelo:

$$v_0(\text{total}) = v_0(\text{reação catal.}) + v_0(\text{reação não catal.})$$

$$v_0(\text{total}) = k_{obs}[\text{MnP}] + v_0(\text{reação não catal.})$$

que pode ser linearizado da forma:

$$y = ax + b$$

onde $a = k_{obs}$ e b é uma estimativa da $v_0(\text{reação não catal.})$.

A **Figura 2.8** mostra uma curva de regressão linear usada para o cálculo da k_{obs} da MnTE-2-PyP⁵⁺. Os dados brutos usados para os cálculos das k_{obs} e ordem das reações (n) estão disponíveis no Apêndice II.

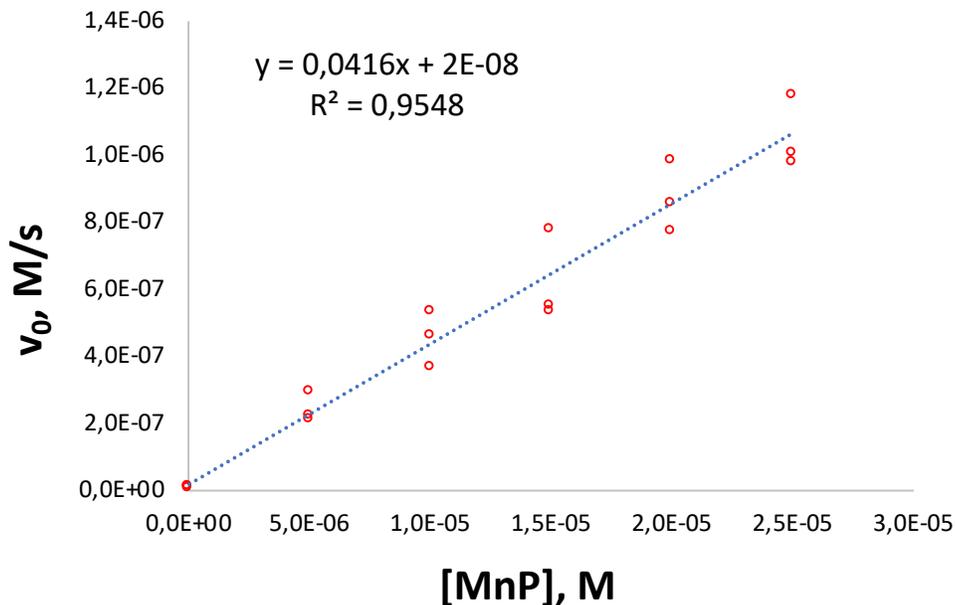


Figura 2.8. Exemplo de uma curva de regressão linear usada para o cálculo das k_{obs} das MnPs (neste exemplo, a MnTE-2-PyP⁵⁺). Medidas representativas a partir de reações de bromação da MCD em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a 25±1°C.

Considerando o perfil das MnPs nas reações de halogenação da MCD, tais compostos apresentaram perfis diferentes quando se compara as reações de bromação e cloração. A **Figura 2.9** ilustra o comportamento geral das MnPs através da representação gráfica baseada nas taxas das constantes observadas experimentalmente (k_{obs}) versus o potencial de meia-onda ($E_{1/2}$) das mesmas. A MnTBAP³⁻, que possui $E_{1/2}$ negativo, não apresentou eficiência catalítica tanto para as reações de bromação quanto cloração. Por outro lado, as demais MnPs analisadas, as quais possuem $E_{1/2}$ positivos, mostraram-se eficientes para as reações de bromação. Tal perfil não se observa para as reações de cloração, onde apenas 3 compostos foram eficientes nas reações catalíticas, a saber: **MnTM-2-PyP⁵⁺**, **MnTE-2-PyP⁵⁺**, **MnTPr-2-PyP⁵⁺** (+220 mV vs NHE < $E_{1/2}$ < +238 mV vs NHE).

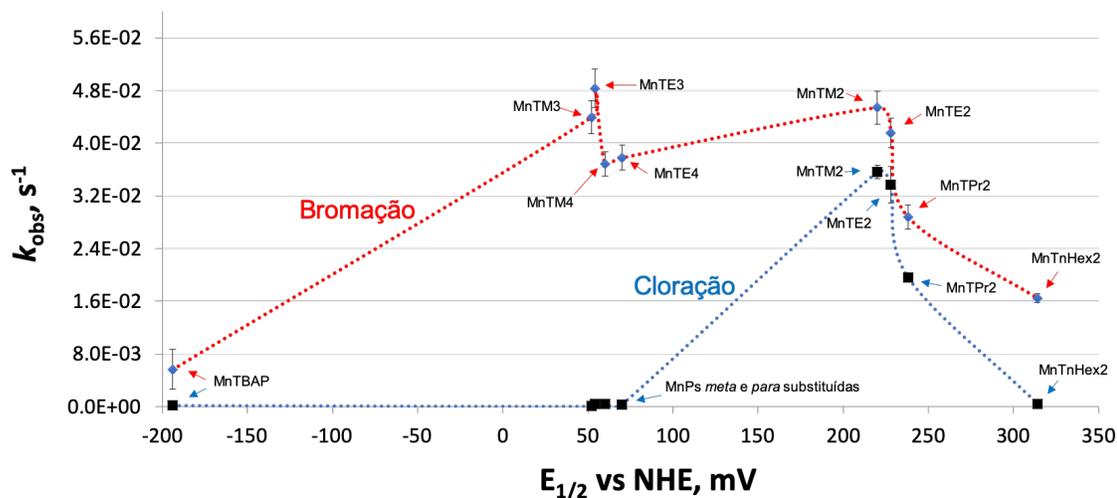


Figura 2.9. Perfil geral das MnPs nas reações de halogenação catalítica da MCD. Medidas realizadas em triplicata para a bromação e a cloração da MCD em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.4.1 Bromação catalítica da MCD por MnPs

A **Figura 2.9** descreve a distribuição das MnPs de acordo com a relação entre a k_{obs} e o $E_{1/2}$ para as reações de bromação. A análise dos resultados mostra que dentre as nove MnPs avaliadas, oito compostos apresentaram atividade BPO. Quando se compara as k_{obs} das MnPs *meta* e *para* substituídas, pode-se observar que os mesmos apresentam valores aproximados, e assim, atividade BPO semelhante. Entre as MnPs *orto* substituídas, a MnTM-2-PyP⁵⁺ apresentou os maiores valores médios de k_{obs} , porém, com atividade BPO análoga à MnTE-2-PyP⁵⁺.

A partir de valores na faixa de $\sim +220$ mV vs NHE, as MnPs *orto* substituídas tendem a apresentar uma diminuição da eficiência catalítica em direção à potenciais mais positivos, de forma que tal comportamento pode estar relacionado com o aumento da cadeia lateral das MnPs (efeito estérico).

Adicionalmente, como a alteração no design estrutural das MnPs gera modificação dos seus $E_{1/2}$, pois o aumento da cadeia lateral é acompanhado por um aumento de $E_{1/2}$, assim, pode-se inferir que a atividade catalítica também pode estar relacionada ao $E_{1/2}$ para a reação de bromação. Tendo isso em vista, estudos envolvendo outras MnPs com modificações estruturais direcionadas devem ser empreendidos a fim de se confirmar tal tendência.

Na **Tabela 2.1** estão representados os valores das taxas das constantes observadas experimentalmente (k_{obs}) das nove MnPs aqui avaliadas para as reações de bromação da MCD.

Tabela 2.1. Caracterização cinética do sistema empregando as MnPs na bromação da MCD. A velocidade inicial experimental (v_0) foi calculada de 0-15s. Os estudos foram realizados em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

MnPs	Mn ^{III} /Mn ^{II} $E_{1/2}$, mV vs NHE*	k_{obs} , s ⁻¹	n^{**}
MnTBAP ³⁻ ***	-194	-	-
MnTM-3-PyP ⁵⁺	+52	$4,39 \times 10^{-2} \pm 2,54 \times 10^{-3}$	$0,76 \pm 0,05$
MnTE-3-PyP ⁵⁺	+54	$4,83 \times 10^{-2} \pm 2,90 \times 10^{-3}$	$0,77 \pm 0,05$
MnTM-4-PyP ⁵⁺	+60	$3,68 \times 10^{-2} \pm 1,84 \times 10^{-3}$	$0,82 \pm 0,05$
MnTE-4-PyP ⁵⁺	+70	$3,78 \times 10^{-2} \pm 1,89 \times 10^{-3}$	$0,86 \pm 0,05$
MnTM-2-PyP ⁵⁺	+220	$4,54 \times 10^{-2} \pm 2,51 \times 10^{-3}$	$0,96 \pm 0,06$
MnTE-2-PyP ⁵⁺	+228	$4,16 \times 10^{-2} \pm 2,26 \times 10^{-3}$	$0,92 \pm 0,07$
MnTPr-2-PyP ⁵⁺	+238	$2,88 \times 10^{-2} \pm 1,86 \times 10^{-3}$	$0,79 \pm 0,08$
MnTnHex-2-PyP ⁵⁺	+314	$1,65 \times 10^{-2} \pm 6,42 \times 10^{-4}$	$0,87 \pm 0,05$

*Fonte: KOS et al., 2009; BATINIĆ-HABERLE; REBOUÇAS; SPASOJEVIC, 2010. **n: ordem da reação.

***Os valores de k_{obs} e n não são aplicáveis, tendo em vista que o composto não apresenta atividade catalítica nesse sistema (dados brutos disponíveis no Apêndice II).

Destaca-se que foram empreendidas reações de bromação da MCD em meio ácido ($\sim\text{pH } 4,02$ a $25 \pm 1^\circ\text{C}$), a fim de se descartar a possibilidade da reação está sendo iniciada de forma radicalar. Porém, nenhum dos exemplares das MnPs avaliados nesse estudo apresentou eficiência catalítica em tal valor de pH (**Fig. 2.10**), de forma que não houve alteração espectral durante os 60 segundos acompanhando a absorbância em $\lambda_{max} = 290$ nm. Os incrementos nos valores das absorbâncias em $\lambda_{max} = 290$ nm são devidos às contribuições das bandas de absorção das MnPs envolvidas nas reações.

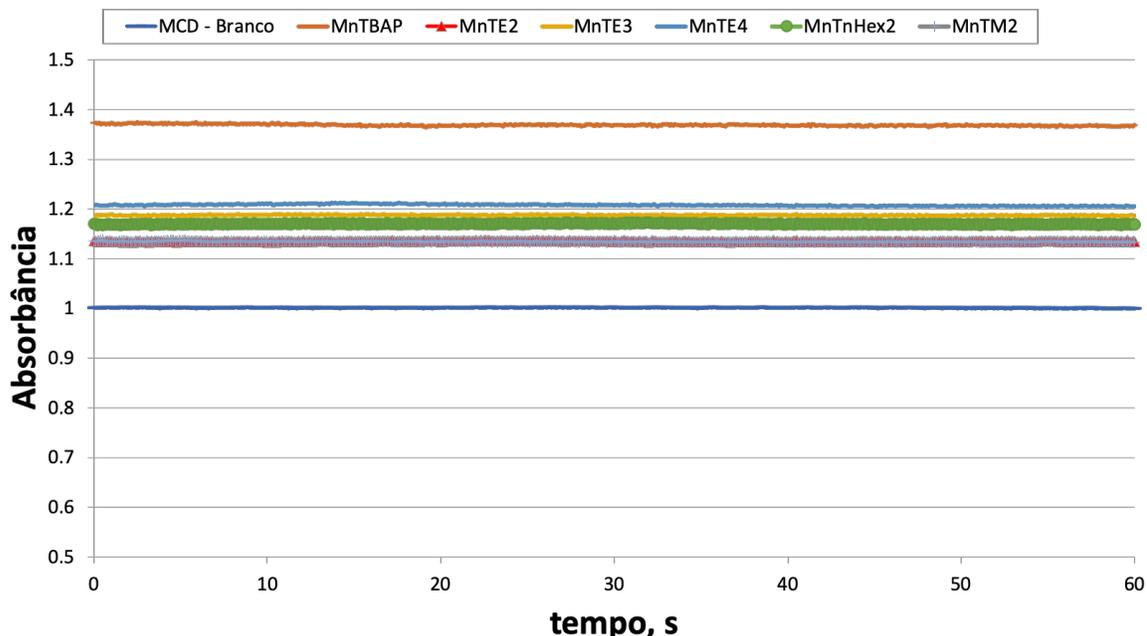


Figura 2.10. Exemplos de curvas de absorção UV-vis durante uma reação de bromação da MCD realizada por 60 segundos acompanhando a absorbância em $\lambda_{\text{max}} = 290 \text{ nm}$. Medidas realizadas em meio ácido ($\sim \text{pH } 4,02$ a $25 \pm 1^\circ \text{C}$).

2.4.2 Cloração catalítica da MCD por MnPs

A **Figura 2.9** descreve a distribuição das MnPs de acordo com a relação entre a k_{obs} e o $E_{1/2}$ para as reações de cloração. A análise dos dados revela que dentre as nove MnPs avaliadas, apenas três compostos apresentaram atividade CPO conforme descrito anteriormente. As MnPs *meta* e *para* substituídas, a MnTBAP^{3-} e a $\text{MnTnHex-2-PyP}^{5+}$ apresentaram valores médios de k_{obs} totalmente inconsistentes com os demais observados, portanto, pode-se concluir que tais compostos possuem atividade CPO insignificante. Tal fato pode estar correlacionado ao efeito estérico na $\text{MnTnHex-2-PyP}^{5+}$, considerando que as demais MnPs *orto* substituídas aqui avaliadas apresentaram atividade CPO considerável. Entre as MnPs *orto* substituídas, a MnTM-2-PyP^{5+} mais uma vez apresentou o maior valor médio de k_{obs} , entretanto, tal valor foi apenas 6% maior que o maior valor médio de k_{obs} para a MnTE-2-PyP^{5+} , bem como está dentro do erro estatístico da modelagem matemática empregada utilizando a Análise de Variância (ANOVA). Esse achado corrobora a similaridade na eficiência da atividade CPO de tais compostos (Apêndice II).

A partir de valores na faixa de $\sim +220$ mV vs NHE, as MnPs *orto* substituídas tendem a apresentar uma diminuição da eficiência catalítica em direção à potenciais mais positivos para as reações de cloração. Tal qual para as reações de bromação, reforça-se a necessidade de estudos envolvendo outras MnPs com modificações estruturais direcionadas a fim de se confirmar tal tendência observada.

Na **Tabela 2.2** estão representados os valores médios das taxas das constantes observadas experimentalmente (k_{obs}) para as nove MnPs aqui avaliadas para as reações de cloração da MCD.

Tabela 2.2. Caracterização cinética do sistema empregando as MnPs na cloração da MCD. A taxa inicial experimental (v_0) foi calculada de 0-15s. Os estudos foram realizados em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

MnPs	Mn ^{III} /Mn ^{II} E _{1/2} , mV vs NHE [*]	k_{obs} , s ⁻¹	n ^{**}
MnTBAP ³⁻ ***	-194	-	-
MnTM-3-PyP ⁵⁺ ***	+52	-	-
MnTE-3-PyP ⁵⁺ ***	+54	-	-
MnTM-4-PyP ⁵⁺ ***	+60	-	-
MnTE-4-PyP ⁵⁺ ***	+70	-	-
MnTM-2-PyP ⁵⁺	+220	$3,57 \times 10^{-2} \pm 1,02 \times 10^{-3}$	$0,85 \pm 0,03$
MnTE-2-PyP ⁵⁺	+228	$3,37 \times 10^{-2} \pm 2,74 \times 10^{-3}$	$0,86 \pm 0,09$
MnTPr-2-PyP ⁵⁺	+238	$1,96 \times 10^{-2} \pm 6,76 \times 10^{-4}$	$0,78 \pm 0,01$
MnTnHex-2-PyP ⁵⁺ ***	+314	-	-

*Fonte: KOS et al., 2009; BATINIĆ-HABERLE; REBOUÇAS; SPASOJEVIC, 2010. **n: ordem da reação.

***Os valores de k_{obs} e n não são aplicáveis, tendo em vista que o composto não apresenta atividade catalítica nesse sistema (dados brutos disponíveis no Apêndice II).

Com base nos dados reportados anteriormente, é perceptível que alguns exemplares das MnP apresentaram atividade HPO, bem como comportamentos distintos durante as reações de bromação e cloração.

2.5 Conclusões

Os dados aqui apresentados permitiram a avaliação da habilidade de nove metaloporfirinas em catalisar a reação de halogenação da monoclorodimedona, pelo que, alguns compostos puderam ser classificados como portadores de atividade HPO. Este estudo foi capaz de determinar as velocidades iniciais para a catálise das reações de halogenação da monoclorodimedona em tampão fosfato utilizando medidas de espectrofotometria. Os dados demonstraram que as velocidades iniciais e, conseqüentemente, as k_{obs} das MnPs estão relacionadas com o $E_{1/2}$ e com o efeito estérico das cadeias laterais dos anéis piridínicos das porfirinas. Tal relação não apresentou uma clara tendência para ambos os tipos de halogenação. No entanto, foi possível concluir que as MnPs são mais eficientes para as reações de bromação, e que elas apresentam atividade catalítica com valores ótimos em potenciais na faixa de $\sim +220$ mV a $\sim +240$ mV vs NHE, para ambos os tipos de halogenação. Os compostos com maior eficiência catalítica para a halogenação da MCD foram a MnTM-2-PyP⁵⁺ e a MnTE-2-PyP⁵⁺, tanto para as reações de bromação quanto para cloração. A MnTM-3-PyP⁵⁺ e a MnTE-3-PyP⁵⁺ foram igualmente eficientes à MnTM-2-PyP⁵⁺ e à MnTE-2-PyP⁵⁺ apenas na atividade BPO.

Considerando as MnPs *orto* substituídas, não é possível concluir se a diminuição da atividade HPO com o aumento da cadeia lateral é resultante de um impedimento estérico ou uma consequência do aumento do $E_{1/2}$ para valores além de um valor ótimo (por volta de $\sim +220$ mV vs NHE, equivalente ao sistema metil).

É importante mencionar que o uso da presente metodologia para a realização da halogenação catalítica da MCD não está limitado às reações aqui apresentadas. Uma possível perspectiva de trabalho, é o estudo da MnTDM-2-ImP⁵⁺, pois tal porfirina apresenta $E_{1/2}$ semelhante à uma *orto* piridil de cadeia lateral longa, como a MnTnHex-2-PyP⁵⁺, mas não apresenta impedimento estérico.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M.; et al. Vanadium haloperoxidases from brown algae of the Laminariaceae Family. **Phytochemistry**, v. 57, p. 633–642, 2001.

ALVAREZ, B.; et al. Inactivation of human Cu, Zn superoxide dismutase by peroxynitrite and formation of histidinyl radical. **Free Radic. Bio. Med.**, v. 37, p. 813-822, 2004.

ANDERSON, J. L. R.; CHAPMAN, S. K. Molecular mechanisms of enzyme-catalysed halogenation. **Mol. BioSyst.**, v. 2, p. 350–357, 2006.

ARCHAMBEAU, J. O.; et al. Superoxide dismutase mimic, MnTE-2-PyP(5+) ameliorates acute and chronic proctitis following focal proton irradiation of the rat rectum. **Redox Biol.**, v. 1, p. 599-607, 2013.

ARNHOLD, J.; et al. Kinetics and thermodynamics of halide and nitrite oxidation by mammalian peroxidases. **Eur. J. Inorg. Chem.**, p. 3801-3811, 2006.

ATKINS, P. W. **Físico-Química e Fundamentos**, 3 Ed., Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2003.

BAO, F.; LIU, D. Hydroxyl radicals generated in the rat spinal cord at the level produced by impact injury induce cell death by necrosis and apoptosis: protection by a metalloporphyrin. **Neuroscience**, v. 126, p. 285-295, 2004.

BATINIĆ-HABERLE, I.; REBOUÇAS, J. S.; SPASOJEVIC, I.; Superoxide dismutase mimics: chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 13, p. 877-918; 2010.

BATINIĆ-HABERLE, I.; RAJIC, Z.; BENOVA, L. A combination of two antioxidants (an SOD mimic and ascorbate) produces a pro-oxidative effect forcing *Escherichia coli* to adapt via induction of oxyR regulon. **Anticancer Agents Med. Chem.**, v. 11, p. 329-340, 2011.

BATINIĆ-HABERLE, I.; et al. SOD Therapeutics: Latest Insights into Their Structure-Activity Relationships and Impact on the Cellular Redox-Based Signaling Pathways. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 20, p. 2372-2415, 2014.

BATINIĆ-HABERLE, I.; SPASOJEVIĆ, I. Complex chemistry and biology of redox-active compounds, commonly known as SOD mimics, affect their therapeutic effects. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 20, p. 2323-2325, 2014.

BATINIĆ-HABERLE, I.; TOVMASYAN, A.; SPASOJEVIC, I. An educational overview of the chemistry, biochemistry and therapeutic aspects of Mn porphyrins - From superoxide dismutation to HO-driven pathways. **Redox Biol.**, v. 5, p. 43-65, 2015.

BENSON, B. B.; KRAUSE JR, D. The Concentration and Isotopic Fractionation of Gases Dissolved in Freshwater in Equilibrium with the Atmosphere. 1. **Oxygen. Limn. Oceanogr.**, v. 25, p. 662-671, 1980.

BUETTNER, G. R. Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. **Anticancer Agents Med. Chem.**, v. 11, p. 341-346, 2011.

BOSS, M. K.; et al. Potential for a novel manganese porphyrin compound as adjuvant canine lymphoma therapy. **Cancer Chem. Pharm.**, v. 1, p. 1-11, 2017.

BURNER, U.; JANTSCHKO, W.; OBINGER, C. Kinetics of oxidation of aliphatic and aromatic thiols by myeloperoxidase compounds I and II. **FEBS Lett.**, v. 443, p. 290- 290, 1999.

BURNER, U.; et al. Mechanism of reaction of myeloperoxidase with nitrite. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 20597-20601, 2000.

BUTLER, A.; WALKER, J. V. Marine haloperoxidases. **Chem. Ver.**, v. 93, p. 1937-19441, 1993.

BUTLER, A.; CARTER-FRANKLIN, J. N. The role of vanadium bromoperoxidase in the biosynthesis of halogenated marine natural products, **Nat. Prod. Rep.**, v. 21, p. 180–188, 2004.

CANDAS, D.; LI, J. J. MnSOD in Oxidative Stress Response-Potential Regulation via Mitochondrial Protein Influx. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 20, n. 10, p. 1599-1617, 2014.

COLIN, C.; et al. Vanadium-dependent iodoperoxidases in *Laminaria digitata*, a novel biochemical function diverging from brown algal bromoperoxidases. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 10, p. 156–166, 2005.

DHAR, S. K.; et al. Manganese superoxide dismutase is a p53-regulated gene that switches cancers between early and advanced stages. **Cancer Res.**, v. 71, p. 6684-6695, 2011.

DE BOER, E.; et al. Vanadium containing bromoperoxidase: An example of an oxidoreductase with high operational stability in aqueous and organic media. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 30, p. 607–610, 1987.

DE BOER, E.; WEVER, R. The reaction mechanism of the novel vanadium–bromoperoxidase: A steady-state kinetic analysis. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 12326–12332, 1988.

DUNFORD, H. B. **Heme Peroxidases**, New York: Wiley-VCH, 1999.

EDHOLM, L. E.; et al. Determination of drug enantiomers in biological samples by coupled column liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. **Chromat.**, v. 424, n. 1, p. 61-72, 1988.

EVANS, M. K.; et al. Mn porphyrin in combination with ascorbate acts as a pro-oxidant and mediates caspase-independent cancer cell death. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 68, p. 302-314, 2014.

EVERETT, R. R.; SOEDJAK, H. S.; BUTLER, A. Mechanism of dioxygen formation catalyzed by vanadium bromoperoxidase: Steady state kinetic analysis and comparison to the mechanism of bromination, **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 15671–15679, 1990.

FUJI, H. Model complexes of heme peroxidases. In: Raven, E., Dunford, B., **Heme Peroxidases**. Reino Unido: The Royal Society of Chemistry, p. 181-217, 2016.

FURTMÜLLER, P. G., et al. Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases, **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 445, p. 199–213, 2006.

GAUTER-FLECKENSTEIN, B.; et al. Comparison of two Mn porphyrin-based mimics of superoxide dismutase in pulmonary radioprotection. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 44, p. 982-989, 2008.

GAUTER-FLECKENSTEIN, B.; et al. Early and late administration of MnTE-2-PyP5+ in mitigation and treatment of radiation-induced lung damage. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 48, p. 1034-1043, 2010.

GREEN, M. T., et al. Oxoiron(IV) in Chloroperoxidase Compound II Is Basic: Implications for P450 Chemistry. **Science**, v. 304, p. 1653-1656, 2004.

GRIBBLE, G. W. The diversity of naturally produced organohalogens. **Chemosphere**, v. 52, p. 289–297, 2003.

GRIDLEY, D. S.; et al. Radiation and a metalloporphyrin radioprotectant in a mouse prostate tumor model. **Anticancer Res.**, v. 27, p. 3101-3109, 2007.

GROVES, J. T.; LEE, J.; MARLA, S. S. Detection and Characterization of an Oxomanganese(V) Porphyrin Complex by Rapid-Mixing Stopped-Flow Spectrophotometry. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 119, p. 6269-6273, 1997.

GROVES, J. T.; SHALYAEV, K.; LEE, J. In: **The Porphyrin Handbook**. K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard (Eds.), San Diego: Academic Press, v. 4, p. 17-40, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; **Free Radic. Biol. Med.**, 4th Ed., New York: Oxford University Press. 2007.

HAGER, L. P.; et al. Chloroperoxidase. II. Utilization of halogen anions. **J. Biol. Chem.**, v. 241, p. 1769-1777, 1966.

HENDERSON, J. P.; HEINECHE, J. W. Myeloperoxidase and eosinophil peroxidase: phagocyte enzymes for halogenation in humans. Natural production of organohalogen compounds. In: Hutzinger, O., Gribble, G.W. (Eds.), **The Handbook of Environmental Chemistry**. Berlin: Springer, v. 3, p. 201–214, 2003.

HENNE, K. R.; et al. Covalent Linkage of Prosthetic Heme to CYP4 Family P450 Enzymes. **Biochem.**, v. 40, p. 12925-12931, 2001.

JAKOPITSCH, C.; et al. Catalase-peroxidase from *Synechocystis* is capable of chlorination and bromination reactions. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 287, p. 682–687, 2001.

JANTSCHKO, W.; et al. Redox intermediates of plant and mammalian peroxidases: a comparative transient-kinetic study of their reactivity toward indole derivatives. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 398, p. 12-22, 2002.

JARAMILLO, M. C.; et al. Manganese porphyrin, MnTE-2-PyP5+, Acts as a pro-oxidant to potentiate glucocorticoid-induced apoptosis in lymphoma cells. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 52, p. 1272-1284, 2012.

JARAMILLO, M. C.; et al. Manganese (III) meso-tetrakis Nethylpyridinium-2-yl porphyrin acts as a pro-oxidant to inhibit electron transport chain proteins, modulate bioenergetics, and enhance the response to chemotherapy in lymphoma cells. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 83, p. 89-100, 2015.

JIN, N; GROVES, J. T. Unusual Kinetic Stability of a Ground-State Singlet Oxomanganese(V) Porphyrin. Evidence for a Spin State Crossing Effect. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 121, p. 2923-2924, 1999.

JIN, N; et al. Rapid, Reversible Oxygen Atom Transfer between an Oxomanganese(V) Porphyrin and Bromide: A Haloperoxidase Mimic with Enzymatic Rates. **Angew. Chem.**, v. 39(21), p. 3849-3851, 2000.

KLING, E.; et al. Enzymatic incorporation of halogen atoms into natural compounds. **Ernst. Schering. Res. Found. Workshop**, p. 165–194, 2005.

KOS, I.; et al. High lipophilicity of meta Mn(III) N-alkylpyridylporphyrin-based superoxide dismutase mimics compensates for their lower antioxidant potency and makes them as effective as ortho analogues in protecting superoxide dismutase-deficient *Escherichia coli*. **J. Med. Chem.**, v. 52, p. 7868-7872, 2009.

LABAT, G.; MEUNIER, B. First example of a chloroperoxidase-type chlorination of dimedone using a supported manganese porphyrin catalyst. **J. Chem. Soc. Chem. Commun.**, p. 1414-1416, 1990.

LEBLANC, C.; et al. Iodine transfers in the coastal marine environment: The key role of brown algae and of their vanadium-dependent haloperoxidases. **Biochimie**, v. 88, p. 1773–1785, 2006.

LEBRUN, L. A.; et al. Covalent Attachment of the Heme Prosthetic Group in the CYP4F Cytochrome P450 Family. **Biochem.**, v. 41, p. 5931-5937, 2002

LEE, J.; HUNT, J. A.; GROVES, J. T. Manganese Porphyrins as Redox-Coupled Peroxynitrite Reductases. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 120, p. 6053-6061, 1998.

LEU, D.; et al. CNS bioavailability and radiation protection of normal hippocampal neurogenesis by a lipophilic Mn porphyrin-based superoxide dismutase mimic, MnTnBuOE-2-PyP 5+. **Redox Biol.**, v. 12, p. 864-871, 2017.

LIU, J. Y.; et al. Comparative study on heme-containing enzyme-like catalytic activities of water-soluble metalloporphyrins. **J. Molec. Catal. A: Chem.** v. 179, p. 27–33, 2002.

MARQUEZ, L. A.; DUNFORD, H. B. Kinetics of oxidation of tyrosine and dityrosine by myeloperoxidase compounds I and II. Implications for lipoprotein peroxidation studies. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 30434-30440, 1995.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I.; Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **J. Biol. Chem.**, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MCLAIN J. L.; LEE, J.; GROVES, J. T. In: **Biomimetic Oxidations Catalyzed by Transition Metal Complexes** (Ed.: B. Meunier), London: Imperial College Press, p. 91-170, 2000.

MIRIYALA, S.; et al. Manganese superoxide dismutase, MnSOD and its mimics. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1822, p. 794-814, 2012.

MORRIS, D. R.; HAGER, L. P. Chloroperoxidase. I. Isolation and properties of the crystalline glycoprotein. **J. Biol. Chem.**, v. 241, p. 1763–1768, 1966.

PORTERFIELD, S. P.; HEINDRICH, C. E., The role of thyroid hormones in prenatal and neonatal neurological development: Current perspectives, **Endocr. Rev.**, v. 14, p. 94–106, 1993.

POULOS, T. L.; KRAUT, J. The stereochemistry of peroxidase catalysis. **J. Biol. Chem.**, v. 255, p. 8199-8205, 1980.

RAJIC, Z.; et al. A new SOD mimic, Mn(III) ortho N-butoxyethylpyridylporphyrin, combines superb potency and lipophilicity with low toxicity. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 52, p. 1828-1834, 2012.

RODRIGUEZ-LOPEZ, J. N.; et al. Mechanism of reaction of hydrogen peroxide with horseradish peroxidase: identification of intermediates in the catalytic cycle. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 123, p. 11838-11847, 2001.

REBOUÇAS, J. S.; et al. Redox modulation of oxidative stress by Mn porphyrin-based therapeutics: the effect of charge distribution. **Dalton Trans.**, p. 1233-1242, 2008.

REBOUÇAS, J. S.; SPASOJEVIĆ, I.; BATINIĆ-HABERLE, I. Quality of potent Mn porphyrin-based SOD mimics and peroxynitrite scavengers for pre-clinical mechanistic/ therapeutic purposes. **J. of Pharm. Biom. Anal.**, v. 48, p. 1046-1049, 2008.

REBOUÇAS, J. S.; et al. Determination of residual manganese in Mn porphyrin-based superoxide dismutase (SOD) and peroxynitrite reductase mimics. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 50, p. 1088-1091, 2009.

SAGAMURA, K.; KEANEY, J. R. J. F. Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Disease. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 51, p. 978-992, 2011.

SARSOUR, E. H.; KALEN, A. L.; GOSWAMI, P. C.; Manganese Superoxide Dismutase Regulates a Redox Cycle Within the Cell Cycle. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 20, p. 1618-1627, 2014.

SHENG, H.; et al. Metalloporphyrins as therapeutic catalytic oxidoreductants in central nervous system disorders. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 20, p. 2437-2464, 2014.

SOEDJAK, H. S.; BUTLER, A. Chlorination catalyzed by vanadium bromoperoxidase. **Inorg. Chem.**, v. 29, p. 5015-5017, 1990.

SPASOJEVIĆ, I.; et al. Bioavailability of metalloporphyrin-based SOD mimics is greatly influenced by a single charge residing on a Mn site. **Free Radic. Res.**, v. 45, p. 188-200, 2011.

TOVMASYAN, A.; et al. Design, mechanism of action, bioavailability and therapeutic effects of Mn porphyrin-based redox modulators. **Med. Princ. Pract.**, v. 22, p. 103-30, 2013a.

TOVMASYAN, A.; et al. We have come a long way with Mn porphyrins: from superoxide dismutation to H₂O₂-driven pathways. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 65, S133, 2013b.

TOVMASYAN, A.; et al. Differential Coordination Demands in Fe versus Mn Water-Soluble Cationic Metalloporphyrins Translate into Remarkably Different Aqueous Redox Chemistry and Biology. **Inorg. Chem.**, v. 52, p. 5677-5691, 2013c.

TOVMASYAN, A.; et al. Rational Design of Superoxide Dismutase (SOD) Mimics: The Evaluation of the Therapeutic Potential of New Cationic Mn Porphyrins with Linear and Cyclic Substituents. **Inorg. Chem.**, v. 53, p. 11467-11483, 2014.

TOVMASYAN, A.; et al. A comprehensive evaluation of catalase-like activity of different classes of redox-active therapeutics. **Free. Radic. Biol. Med.**, v. 86, p. 308-321, 2015a.

TOVMASYAN, A.; et al. Anticancer therapeutic potential of Mn porphyrin/ascorbate system. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 89, p. 1231-1247, 2015b.

TOVMASYAN, A.; et al. Radiation-mediated tumor growth inhibition is significantly enhanced with redox-active compounds that cycle with ascorbate. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 29, n. 13, p. 1196-1214, 2018.

ULLRICH, R.; et al. Novel haloperoxidase from the agaric basidiomycete *Agrocybe aegerita* oxidizes aryl alcohols and aldehydes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, p. 4575-4581, 2004.

VAILLANCOURT, F. H.; et al. Nature's inventory of halogenation catalysts: Oxidative strategies predominate, **Chem. Rev.**, v. 106, p. 3364–3378, 2006.

VAN PEE, K. H.; PATALLO, E. P. Flavin-dependent halogenases involved in secondary metabolism in bacteria. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 70, p. 631–641, 2006.

VAN PEE, K. H.; et al. Biological halogenation has moved far beyond haloperoxidases. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 59, p. 127–157, 2006.

VILTER, H. Vanadium-dependent haloperoxidases, in: H. Sigel, A. Sigel (Eds.), **Metal Ions in Biological Systems**. New York: Marcel Dekker, p. 325–362, 1995.

VOGEL, A. I. Titrimetric analysis. In: Jeffery, G. H.; Bassett, J.; Mendham, J.; Denney, R. C. (Eds.), **Vogel's Textbook of Quantitative Chemical Analysis**. 5th Ed., New York: Wiley & Sons Ltd., p. 394, 1989.

WEITZEL, D. H.; et al. Radioprotection of the Brain White Matter by Mn(III) N-Butoxyethylpyridylporphyrin-Based Superoxide Dismutase Mimic MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺. **Mol. Cancer Ther.**, v. 14, p. 70-79, 2015.

WEVER, R.; HEMRIKA, W. Vanadium haloperoxidases. In: Messerschmidt, A., Huber, R., Wieghardt, K., Poulos, T. (Eds.), **Handbook of Metalloproteins**. Chichester: Wiley & Sons Ltd., v. 1, p. 1417–1428, 2001.

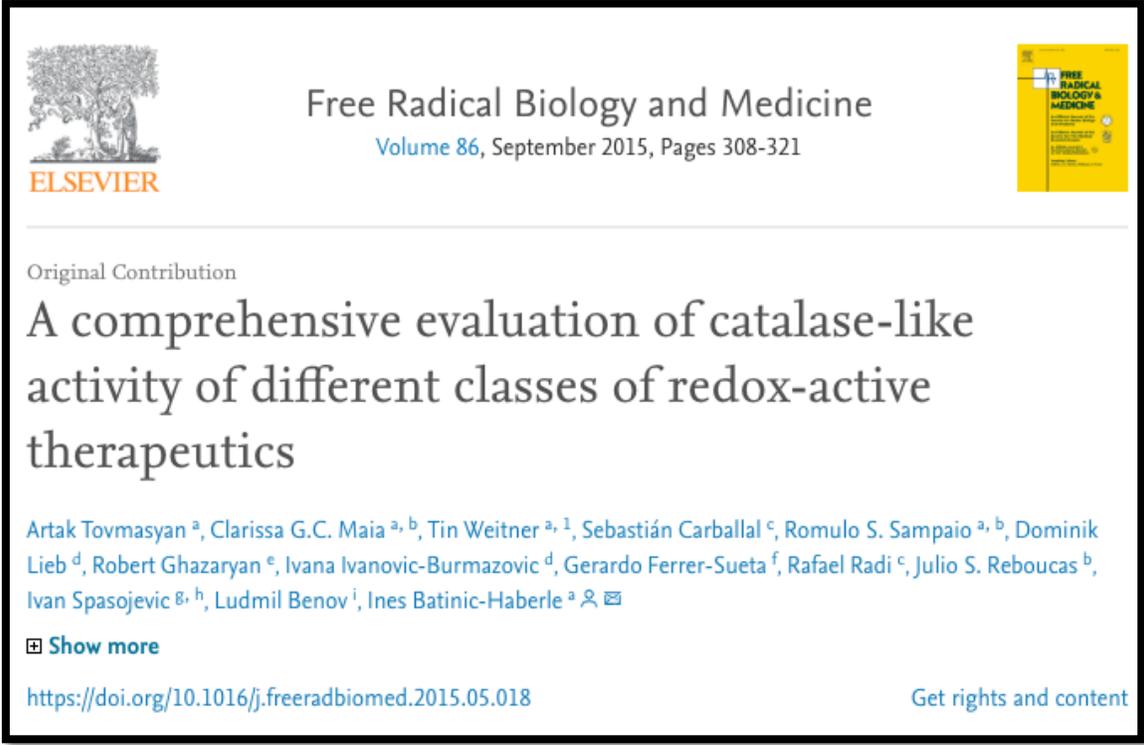
YE, X.; et al. Cytotoxic effects of Mn(III) Nalkylpyridylporphyrins in the presence of cellular reductant, ascorbate. **Free Radic. Res.**, v. 45, p. 1289-1306, 2011.

Apêndices

Apêndice I. Produção científica

Durante o período do curso de doutorado (2013 - 2019) foram publicados artigos científicos que permitiram o desenvolvimento efetivo da presente tese. Os principais trabalhos estão elencados a seguir:

1.



Free Radical Biology and Medicine
Volume 86, September 2015, Pages 308-321

Original Contribution

A comprehensive evaluation of catalase-like activity of different classes of redox-active therapeutics

Artak Tovmasyan ^a, Clarissa G.C. Maia ^{a, b}, Tin Weitner ^{a, 1}, Sebastián Carballal ^c, Romulo S. Sampaio ^{a, b}, Dominik Lieb ^d, Robert Ghazaryan ^e, Ivana Ivanovic-Burmazovic ^d, Gerardo Ferrer-Sueta ^f, Rafael Radi ^c, Julio S. Rebouças ^b, Ivan Spasojevic ^{g, h}, Ludmil Benov ⁱ, Ines Batinic-Haberle ^a ✉

[Show more](#)

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.018> [Get rights and content](#)

2.



Free Radical Biology and Medicine
Volume 89, December 2015, Pages 1231-1247



Original Contribution

Anticancer therapeutic potential of Mn porphyrin/ascorbate system

Artak Tovmasyan ^a, Romulo S. Sampaio ^{a, b}, Mary-Keara Boss ^c, Jacqueline C. Bueno-Janice ^{a, b}, Bader H. Bader ^d, Milini Thomas ^d, Julio S. Reboucas ^b, Michael Orr ^e, Joshua D. Chandler ^e, Young-Mi Go ^e, Dean P. Jones ^e, Talaignair N. Venkatraman ^f, Sinisa Haberle ^{f, 1}, Natalia Kyui ^g, Christopher D. Lascola ^f, Mark W. Dewhirst ^a, Ivan Spasojevic ^{h, i}, Ludmil Benov ^d, Ines Batinic-Haberle ^a ✉

[Show more](#)

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.416> [Get rights and content](#)

3.



[Cancer Chemotherapy and Pharmacology](#)
August 2017, Volume 80, [Issue 2](#), pp 421–431 | [Cite as](#)

Potential for a novel manganese porphyrin compound as adjuvant canine lymphoma therapy

Authors [Authors and affiliations](#)

M. K. Boss, M. W. Dewhirst ✉, R. S. Sampaio, A. Bennett, A. Tovmasyan, K. G. Berman, A. W. Beaven, D. A. Rizzieri, I. Batinic-Haberle, M. L. Hauck, I. Spasojevic

4.



Redox Biology
Volume 12, August 2017, Pages 864-871



Research Paper

CNS bioavailability and radiation protection of normal hippocampal neurogenesis by a lipophilic Mn porphyrin-based superoxide dismutase mimic, MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺

David Leu ^{a, b}, Ivan Spasojevic ^{c, d}, Huy Nguyen ^a, Brian Deng ^{a, b}, Artak Tovmasyan ^e, Tin Weitner ^e, Romulo S. Sampaio ^e, Ines Batinic-Haberle ^{e, f}, Ting-Ting Huang ^{a, f}

[Show more](#)

<https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.027> [Get rights and content](#)

5.

Antioxidants and Redox Signaling
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/ars.2017.7218
1

Radiation-mediated tumor growth inhibition is significantly enhanced with redox-active compounds that cycle with ascorbate

By

Artak Tovmasyan,¹ Jacqueline C Bueno-Janice,^{1#} Melba C Jaramillo,² Romulo S Sampaio,^{1#} Julio S Reboucas,³ Natalia Kyui,⁴ Ludmil Benov,⁵ Brian Deng,^{6,8} Ting-Ting Huang,^{7,8} Margaret E Tome,⁹ Ivan Spasojevic^{10,11} and Ines Batinic-Haberle^{1*}

Outras produções científicas podem ser visualizadas na Plataforma Lattes:
<http://lattes.cnpq.br/5256535414227207>.

Apêndice II. Dados brutos para os cálculos da ordem da reação e das k_{obs} utilizando a Análise de Variância (ANOVA).

Bromação

Caracterização cinética do sistema empregando as MnPs na bromação da MCD. A velocidade inicial experimental (v_0) foi calculada de 0-15s. Os estudos foram realizados em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

MnPs	Mn ^{III} /Mn ^{II} $E_{1/2}$, mV vs NHE*	k_{obs} , s ⁻¹	n **
MnTBAP ³⁻ ***	-194	-	-
MnTM-3-PyP ⁵⁺	+52	$4,39 \times 10^{-2} \pm 2,54 \times 10^{-3}$	$0,76 \pm 0,05$
MnTE-3-PyP ⁵⁺	+54	$4,83 \times 10^{-2} \pm 2,90 \times 10^{-3}$	$0,77 \pm 0,05$
MnTM-4-PyP ⁵⁺	+60	$3,68 \times 10^{-2} \pm 1,84 \times 10^{-3}$	$0,82 \pm 0,05$
MnTE-4-PyP ⁵⁺	+70	$3,78 \times 10^{-2} \pm 1,89 \times 10^{-3}$	$0,86 \pm 0,05$
MnTM-2-PyP ⁵⁺	+220	$4,54 \times 10^{-2} \pm 2,51 \times 10^{-3}$	$0,96 \pm 0,06$
MnTE-2-PyP ⁵⁺	+228	$4,16 \times 10^{-2} \pm 2,26 \times 10^{-3}$	$0,92 \pm 0,07$
MnTPr-2-PyP ⁵⁺	+238	$2,88 \times 10^{-2} \pm 1,86 \times 10^{-3}$	$0,79 \pm 0,08$
MnTnHex-2-PyP ⁵⁺	+314	$1,65 \times 10^{-2} \pm 6,42 \times 10^{-4}$	$0,87 \pm 0,05$

*Fonte: KOS et al., 2009; BATINIĆ-HABERLE; REBOUÇAS; SPASOJEVIC, 2010. **n: ordem da reação.

***Os valores de k_{obs} e **n** não são aplicáveis, tendo em vista que o composto não apresenta atividade catalítica nesse sistema.

1. Dados brutos da MnTBAP³⁻

	MnP	log [MnP]	log v₀	[MnP]	v₀
Medida 1	MnTBAP 5 μM	-5,301029996	-7,04E+00	5,00E-06	9,14E-08
Medida 1	MnTBAP 10 μM	-5	-6,85E+00	1,00E-05	1,43E-07
Medida 1	MnTBAP 15 μM	-4,823908741	-6,65E+00	1,50E-05	2,25E-07
Medida 1	MnTBAP 20 μM	-4,698970004	-6,50E+00	2,00E-05	3,14E-07
Medida 1	MnTBAP 25 μM	-4,602059991	-6,41E+00	2,50E-05	3,86E-07
Medida 2	MnTBAP 5 μM	-5,301029996	-8,73E+00	5,00E-06	1,87E-09
Medida 2	MnTBAP 10 μM	-5	-8,09E+00	1,00E-05	8,15E-09
Medida 2	MnTBAP 15 μM	-4,823908741	-7,56E+00	1,50E-05	2,78E-08
Medida 2	MnTBAP 20 μM	-4,698970004	-7,62E+00	2,00E-05	2,37E-08
Medida 2	MnTBAP 25 μM	-4,602059991	-8,68E+00	2,50E-05	2,10E-09
Medida 3	MnTBAP 5 μM	-5,301029996	-8,08E+00	5,00E-06	8,27E-09
Medida 3	MnTBAP 10 μM	-5	-7,82E+00	1,00E-05	1,51E-08
Medida 3	MnTBAP 15 μM	-4,823908741	-7,52E+00	1,50E-05	3,01E-08
Medida 3	MnTBAP 20 μM	-4,698970004	-7,51E+00	2,00E-05	3,12E-08
Medida 3	MnTBAP 25 μM	-4,602059991	-7,53E+00	2,50E-05	2,96E-08
			Não catal.	0	1,96E-09
			Não catal.	0	6,97E-09
			Não catal.	0	2,43E-09

2. Dados brutos da MnTM-3-PyP⁵⁺

	MnP	log [MnP]	log v ₀	[MnP]	v ₀
Medida 1	MnTM-3-PyP 5 μM	-5,301029996	-6,53E+00	5,00E-06	2,96E-07
Medida 1	MnTM-3-PyP 10 μM	-5	-6,35E+00	1,00E-05	4,50E-07
Medida 1	MnTM-3-PyP 15 μM	-4,823908741	-6,19E+00	1,50E-05	6,45E-07
Medida 1	MnTM-3-PyP 20 μM	-4,698970004	-6,05E+00	2,00E-05	8,97E-07
Medida 1	MnTM-3-PyP 25 μM	-4,602059991	-5,98E+00	2,50E-05	1,04E-06
Medida 2	MnTM-3-PyP 5 μM	-5,301029996	-6,43E+00	5,00E-06	3,69E-07
Medida 2	MnTM-3-PyP 10 μM	-5	-6,25E+00	1,00E-05	5,62E-07
Medida 2	MnTM-3-PyP 15 μM	-4,823908741	-6,08E+00	1,50E-05	8,36E-07
Medida 2	MnTM-3-PyP 20 μM	-4,698970004	-6,03E+00	2,00E-05	9,28E-07
Medida 2	MnTM-3-PyP 25 μM	-4,602059991	-5,99E+00	2,50E-05	1,02E-06
Medida 3	MnTM-3-PyP 5 μM	-5,301029996	-6,45E+00	5,00E-06	3,56E-07
Medida 3	MnTM-3-PyP 10 μM	-5	-6,26E+00	1,00E-05	5,51E-07
Medida 3	MnTM-3-PyP 15 μM	-4,823908741	-6,07E+00	1,50E-05	8,47E-07
Medida 3	MnTM-3-PyP 20 μM	-4,698970004	-5,97E+00	2,00E-05	1,08E-06
Medida 3	MnTM-3-PyP 25 μM	-4,602059991	-5,89E+00	2,50E-05	1,28E-06
			Não catal.	0	5,37E-10
			Não catal.	0	3,41E-09
			Não catal.	0	1,68E-09

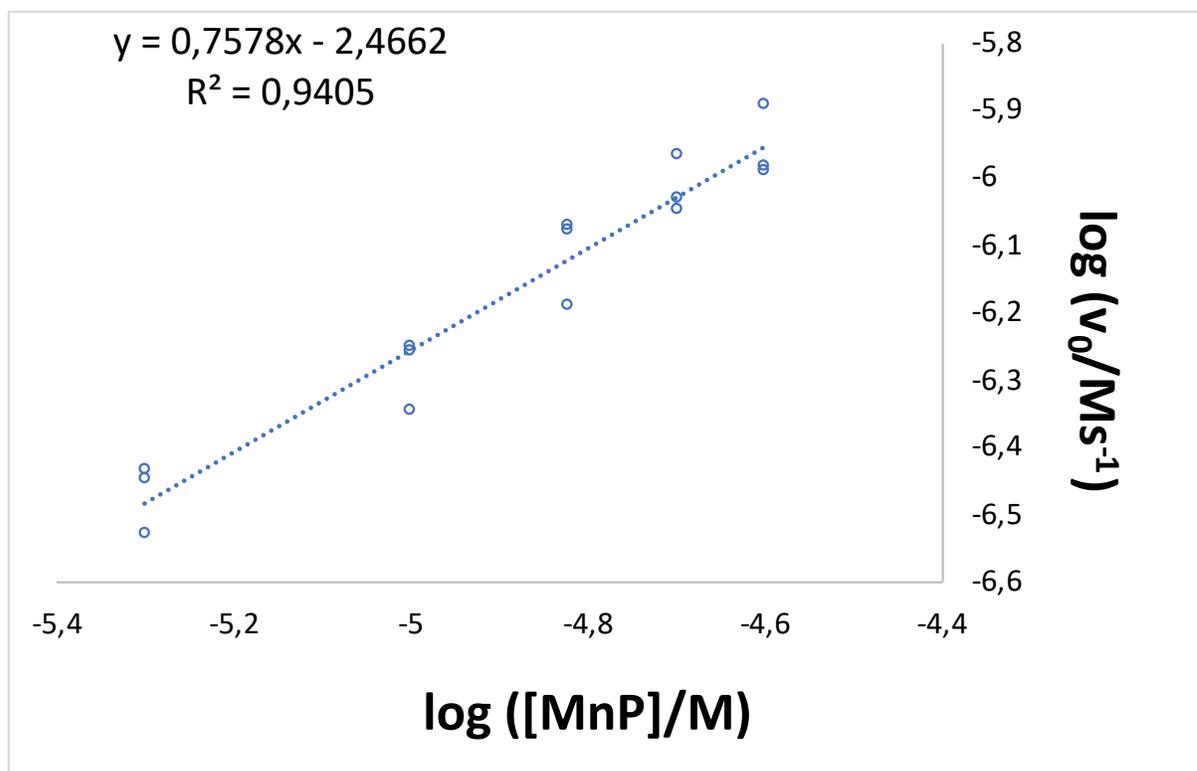


Figura AII(Br).2.1. Curva de regressão linear usada para o cálculo da ordem da reação (n) para a MnTM-3-PyP⁵⁺. Medidas de reações de bromação da MCD em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a 25±1°C. A velocidade inicial experimental (v_0) foi calculada de 0-15s. A da ordem da reação (n) é dada como o coeficiente angular da equação: $\log v_0 = \log [\text{MnP}]_n + \log k_{\text{obs}}$.

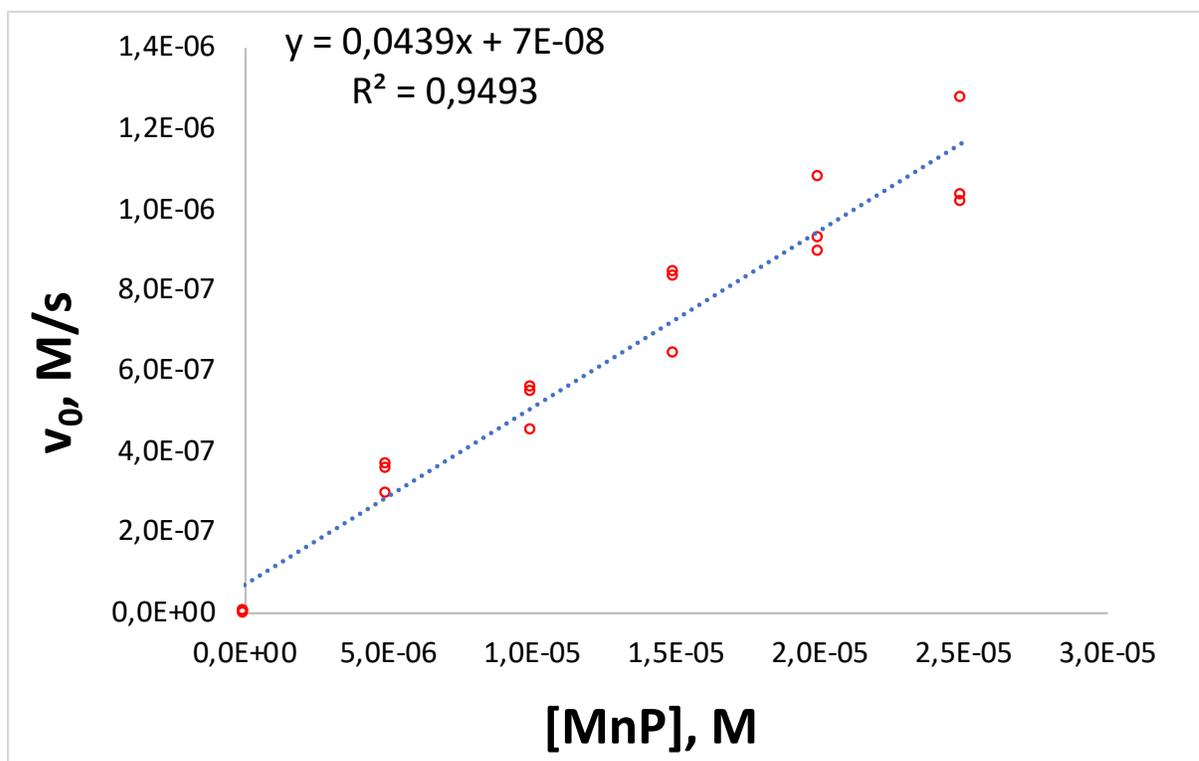


Figura AII(Br).2.2. Curva de regressão linear usada para o cálculo da k_{obs} da MnTM-3-PyP⁵⁺. Medidas de reações de bromação da MCD em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a 25±1°C.

3. Dados brutos da MnTE-3-PyP⁵⁺

	MnP	log [MnP]	log v_0	[MnP]	v_0
Medida 1	MnTE-3-PyP 5 μ M	-5,301029996	-6,46E+00	5,00E-06	3,45E-07
Medida 1	MnTE-3-PyP 10 μ M	-5	-6,24E+00	1,00E-05	5,71E-07
Medida 1	MnTE-3-PyP 15 μ M	-4,823908741	-6,07E+00	1,50E-05	8,51E-07
Medida 1	MnTE-3-PyP 20 μ M	-4,698970004	-6,03E+00	2,00E-05	9,30E-07
Medida 1	MnTE-3-PyP 25 μ M	-4,602059991	-5,87E+00	2,50E-05	1,35E-06
Medida 2	MnTE-3-PyP 5 μ M	-5,301029996	-6,46E+00	5,00E-06	3,46E-07
Medida 2	MnTE-3-PyP 10 μ M	-5	-6,25E+00	1,00E-05	5,65E-07
Medida 2	MnTE-3-PyP 15 μ M	-4,823908741	-6,10E+00	0,000015	7,97E-07
Medida 2	MnTE-3-PyP 20 μ M	-4,698970004	-6,02E+00	0,00002	9,60E-07
Medida 2	MnTE-3-PyP 25 μ M	-4,602059991	-5,99E+00	0,000025	1,02E-06
Medida 3	MnTE-3-PyP 5 μ M	-5,301029996	-6,40E+00	5,00E-06	3,97E-07
Medida 3	MnTE-3-PyP 10 μ M	-5	-6,22E+00	1,00E-05	6,09E-07
Medida 3	MnTE-3-PyP 15 μ M	-4,823908741	-6,02E+00	1,50E-05	9,59E-07
Medida 3	MnTE-3-PyP 20 μ M	-4,698970004	-5,92E+00	2,00E-05	1,21E-06
Medida 3	MnTE-3-PyP 25 μ M	-4,602059991	-5,86E+00	2,50E-05	1,38E-06
			Não catal.	0	6,61E-10
			Não catal.	0	3,87E-08
			Não catal.	0	2,21E-08

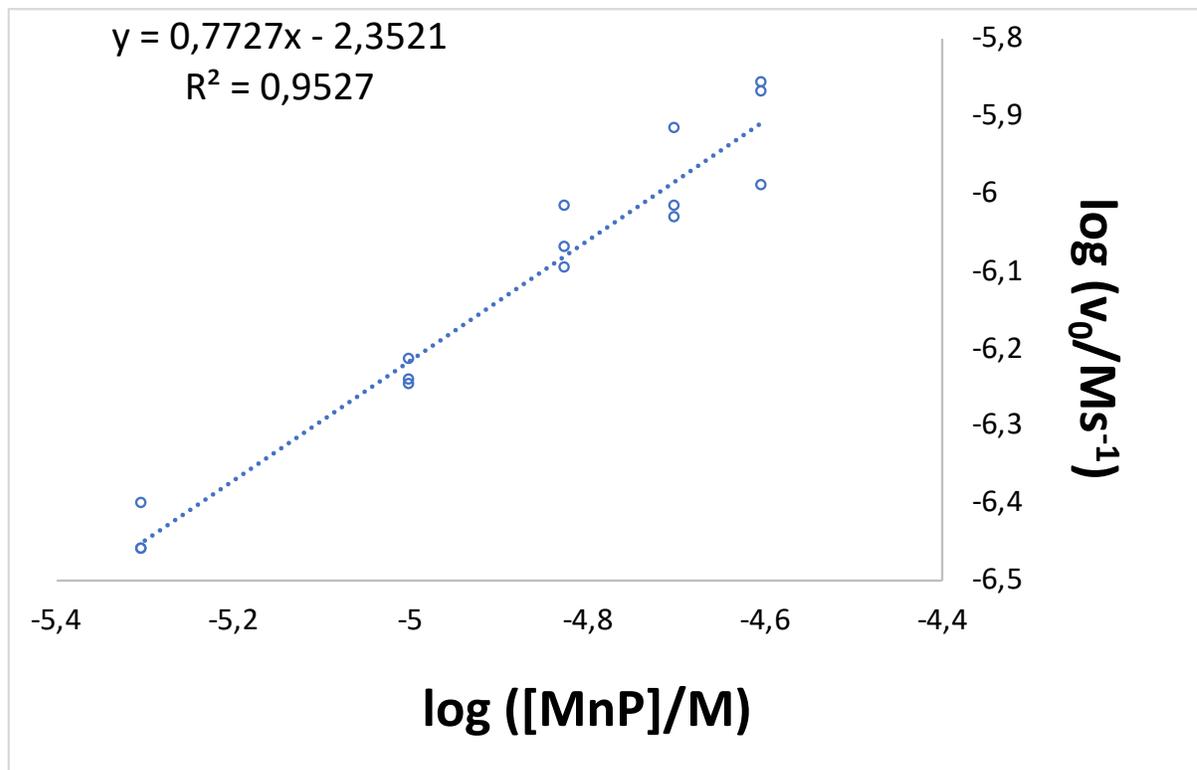


Figura AII(Br).3.1. Curva de regressão linear usada para o cálculo da ordem da reação (n) para a MnTE-3-PyP⁵⁺. Medidas de reações de bromação da MCD em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a 25±1°C. A velocidade inicial experimental (v_0) foi calculada de 0-15s. A da ordem da reação (n) é dada como o coeficiente angular da equação: $\log v_0 = \log [\text{MnP}]_n + \log k_{\text{obs}}$.

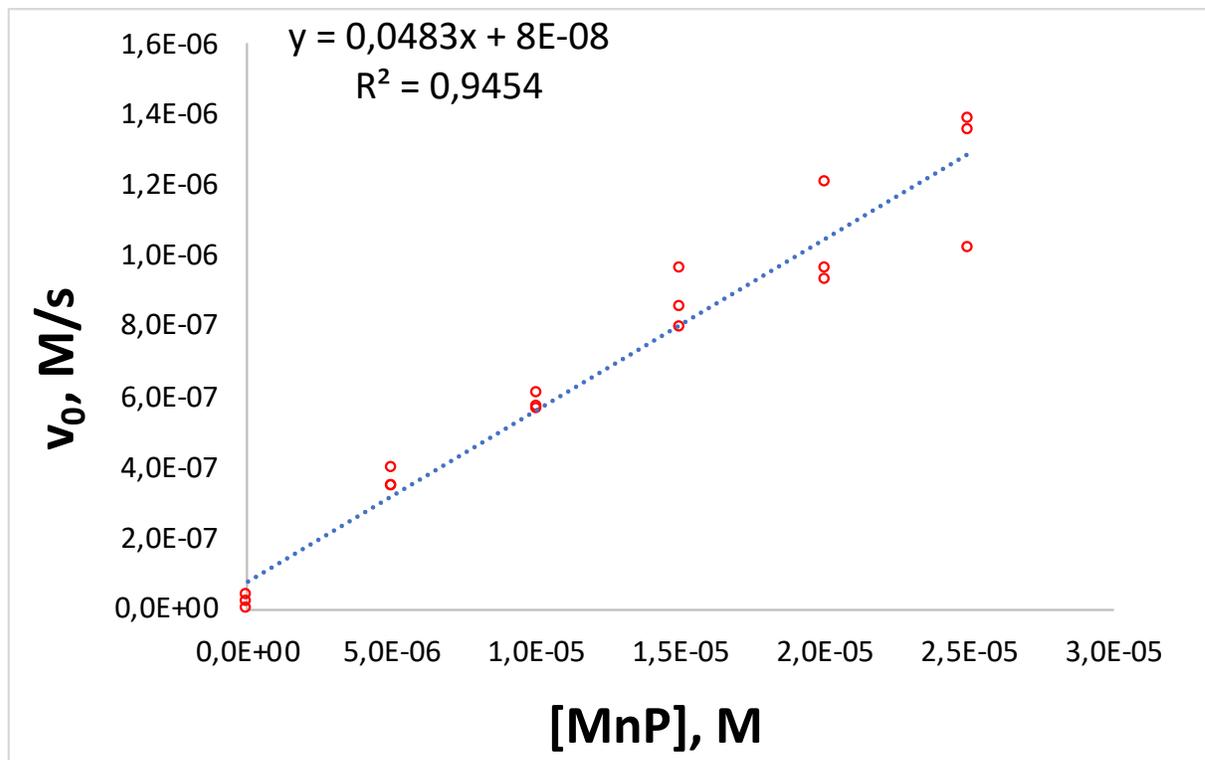


Figura AII(Br).3.2. Curva de regressão linear usada para o cálculo da k_{obs} da MnTE-3-PyP⁵⁺. Medidas de reações de bromação da MCD em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

4. Dados brutos da MnTM-4-PyP⁵⁺

	MnP	log [MnP]	log v₀	[MnP]	v₀
Medida 1	MnTM-4-PyP 5 μM	-5,301029996	-6,64E+00	5,00E-06	2,30E-07
Medida 1	MnTM-4-PyP 10 μM	-5	-6,39E+00	1,00E-05	4,07E-07
Medida 1	MnTM-4-PyP 15 μM	-4,823908741	-6,29E+00	1,50E-05	5,12E-07
Medida 1	MnTM-4-PyP 20 μM	-4,698970004	-6,13E+00	2,00E-05	7,37E-07
Medida 1	MnTM-4-PyP 25 μM	-4,602059991	-6,06E+00	2,50E-05	8,73E-07
Medida 2	MnTM-4-PyP 5 μM	-5,301029996	-6,61E+00	5,00E-06	2,45E-07
Medida 2	MnTM-4-PyP 10 μM	-5	-6,39E+00	1,00E-05	4,06E-07
Medida 2	MnTM-4-PyP 15 μM	-4,823908741	-6,24E+00	1,50E-05	5,74E-07
Medida 2	MnTM-4-PyP 20 μM	-4,698970004	-6,12E+00	0,00002	7,58E-07
Medida 2	MnTM-4-PyP 25 μM	-4,602059991	-6,04E+00	0,000025	9,03E-07
Medida 3	MnTM-4-PyP 5 μM	-5,301029996	-6,55E+00	5E-06	2,81E-07
Medida 3	MnTM-4-PyP 10 μM	-5	-6,32E+00	1,00E-05	4,82E-07
Medida 3	MnTM-4-PyP 15 μM	-4,823908741	-6,12E+00	1,50E-05	7,55E-07
Medida 3	MnTM-4-PyP 20 μM	-4,698970004	-6,06E+00	2,00E-05	8,64E-07
Medida 3	MnTM-4-PyP 25 μM	-4,602059991	-5,99E+00	2,50E-05	1,02E-06
			branco	0,00E+00	1,94E-09
			branco	0	1,91E-09
			branco	0	2,44E-10

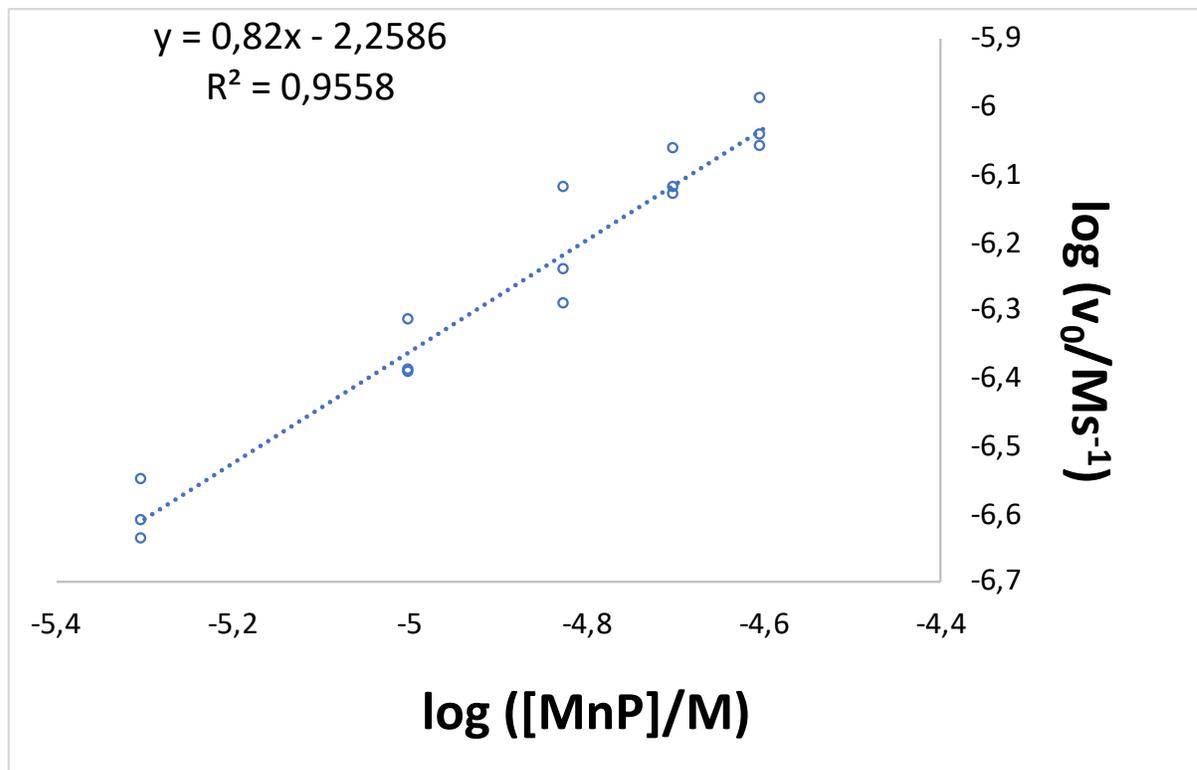


Figura AII(Br).4.1. Curva de regressão linear usada para o cálculo da ordem da reação (n) para a MnTM-4-PyP⁵⁺. Medidas de reações de bromação da MCD em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a 25±1°C. A velocidade inicial experimental (v_0) foi calculada de 0-15s. A da ordem da reação (n) é dada como o coeficiente angular da equação: $\log v_0 = \log [\text{MnP}]_n + \log k_{\text{obs}}$.

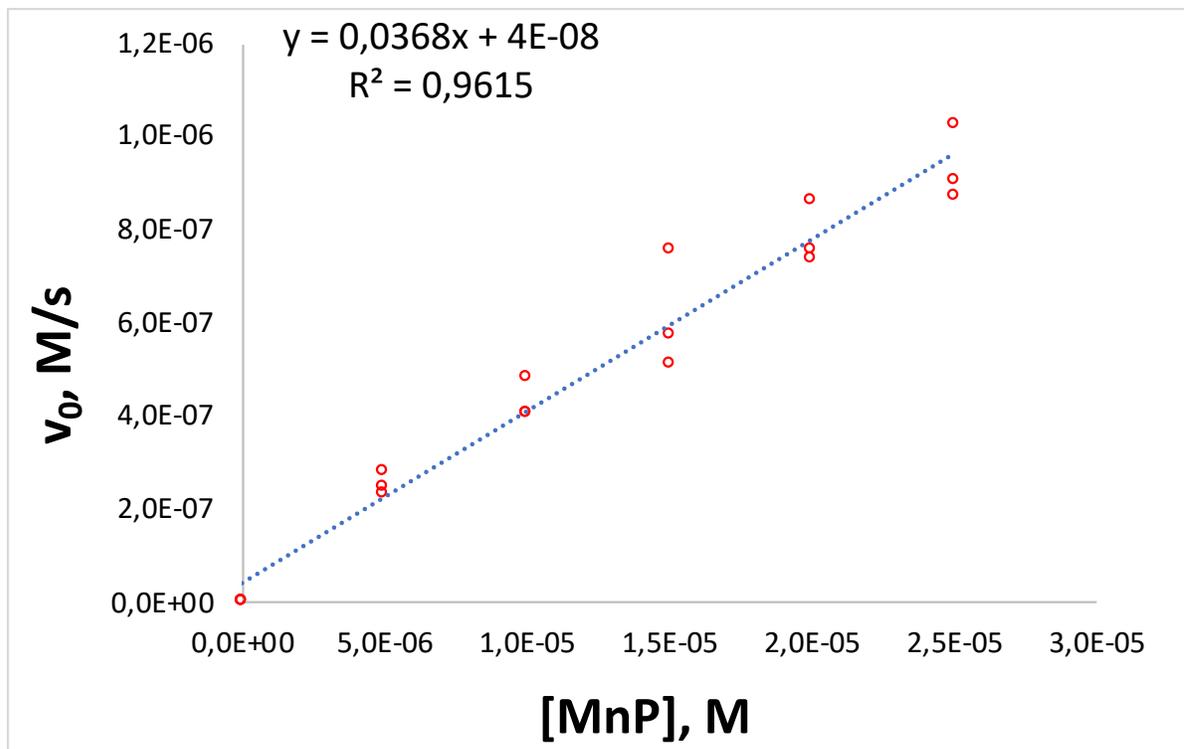


Figura AII(Br).4.2. Curva de regressão linear usada para o cálculo da k_{obs} da MnTM-4-PyP⁵⁺. Medidas de reações de bromação da MCD em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

5. Dados brutos da MnTE-4-PyP⁵⁺

	MnP	log [MnP]	log v₀	[MnP]	v₀
Medida 1	MnTE-4-PyP 5 μM	-5,301029996	-6,67E+00	5,00E-06	2,12E-07
Medida 1	MnTE-4-PyP 10 μM	-5	-6,40E+00	1,00E-05	4,00E-07
Medida 1	MnTE-4-PyP 15 μM	-4,823908741	-6,20E+00	1,50E-05	6,30E-07
Medida 1	MnTE-4-PyP 20 μM	-4,698970004	-6,09E+00	2,00E-05	8,21E-07
Medida 1	MnTE-4-PyP 25 μM	-4,602059991	-6,06E+00	2,50E-05	8,80E-07
Medida 2	MnTE-4-PyP 5 μM	-5,301029996	-6,52E+00	5,00E-06	3,03E-07
Medida 2	MnTE-4-PyP 10 μM	-5	-6,31E+00	1,00E-05	4,92E-07
Medida 2	MnTE-4-PyP 15 μM	-4,823908741	-6,15E+00	1,50E-05	7,12E-07
Medida 2	MnTE-4-PyP 20 μM	-4,698970004	-6,02E+00	0,00002	9,61E-07
Medida 2	MnTE-4-PyP 25 μM	-4,602059991	-6,01E+00	0,000025	9,78E-07
Medida 3	MnTE-4-PyP 5 μM	-5,301029996	-6,64E+00	5E-06	2,28E-07
Medida 3	MnTE-4-PyP 10 μM	-5	-6,39E+00	1,00E-05	4,03E-07
Medida 3	MnTE-4-PyP 15 μM	-4,823908741	-6,22E+00	1,50E-05	6,02E-07
Medida 3	MnTE-4-PyP 20 μM	-4,698970004	-6,10E+00	2,00E-05	7,90E-07
Medida 3	MnTE-4-PyP 25 μM	-4,602059991	-6,05E+00	2,50E-05	8,92E-07
			Não catal.	0	1,11E-09
			Não catal.	0	5,23E-09
			Não catal.	0	2,04E-09

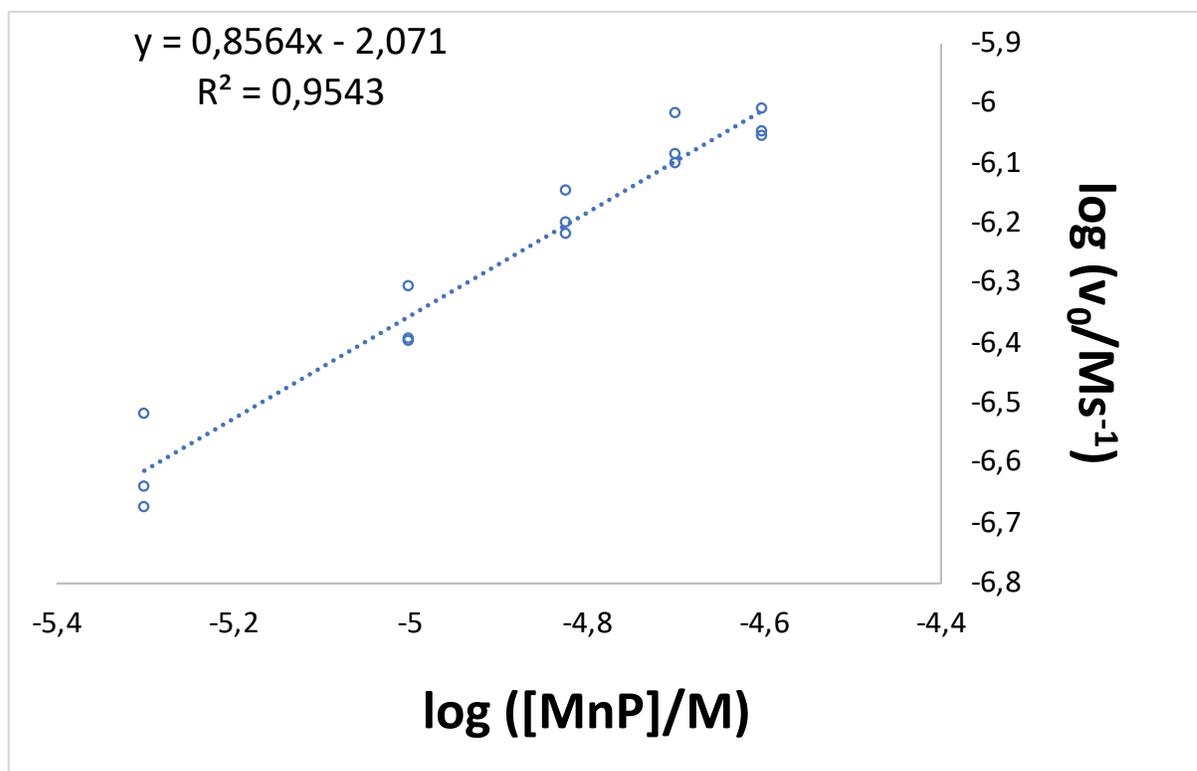


Figura AII(Br).5.1. Curva de regressão linear usada para o cálculo da ordem da reação (n) para a MnTE-4-PyP⁵⁺. Medidas de reações de bromação da MCD em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a 25±1°C. A velocidade inicial experimental (v_0) foi calculada de 0-15s. A da ordem da reação (n) é dada como o coeficiente angular da equação: $\log v_0 = \log [\text{MnP}]_n + \log k_{\text{obs}}$.

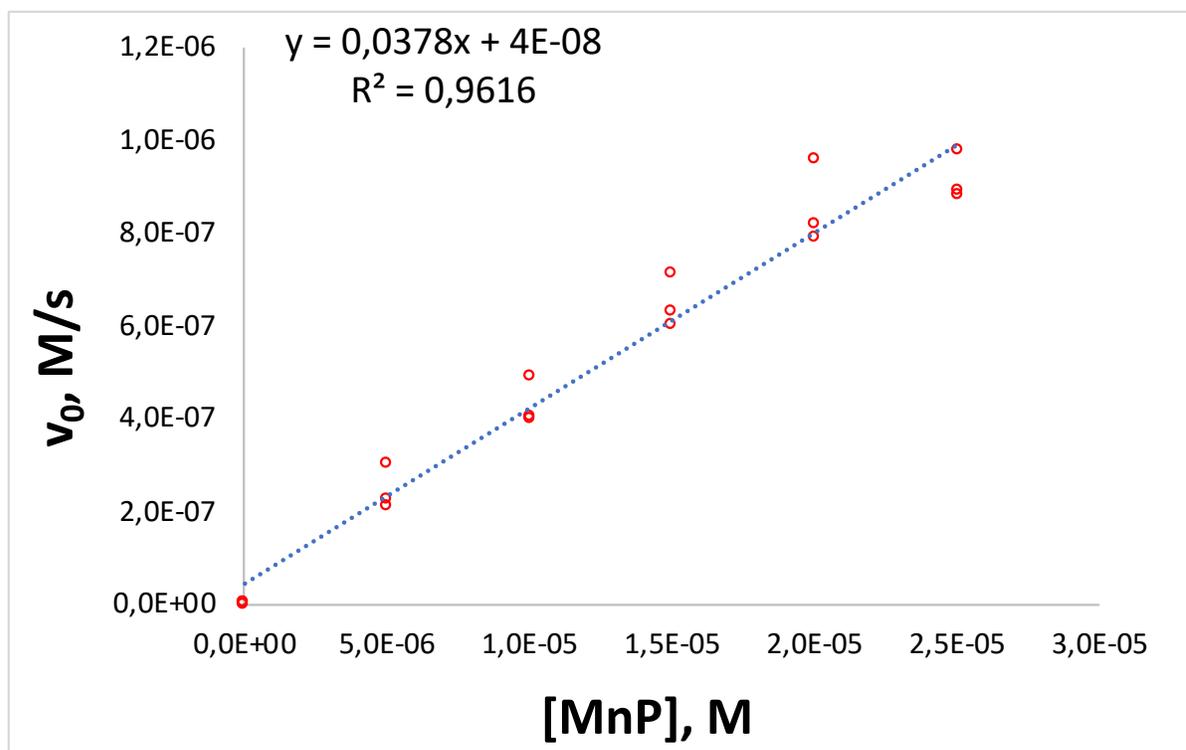


Figura AII(Br).5.2. Curva de regressão linear usada para o cálculo da k_{obs} da MnTE-4-PyP⁵⁺. Medidas de reações de bromação da MCD em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a 25±1°C.

6. Dados brutos da MnTM-2-PyP⁵⁺

	MnP	log [MnP]	log v₀	[MnP]	v₀
Medida 1	MnTM-2-PyP 5 μM	-5,301029996	-6,63E+00	5,0E-06	2,33E-07
Medida 1	MnTM-2-PyP 10 μM	-5	-6,47E+00	1,0E-05	3,39E-07
Medida 1	MnTM-2-PyP 15 μM	-4,823908741	-6,19E+00	1,5E-05	6,51E-07
Medida 1	MnTM-2-PyP 20 μM	-4,698970004	-6,12E+00	2,0E-05	7,55E-07
Medida 1	MnTM-2-PyP 25 μM	-4,602059991	-6,00E+00	2,5E-05	1,01E-06
Medida 2	MnTM-2-PyP 5 μM	-5,301029996	-6,59E+00	5,0E-06	2,60E-07
Medida 2	MnTM-2-PyP 10 μM	-5	-6,39E+00	1,0E-05	4,12E-07
Medida 2	MnTM-2-PyP 15 μM	-4,823908741	-6,16E+00	1,5E-05	6,91E-07
Medida 2	MnTM-2-PyP 20 μM	-4,698970004	-6,05E+00	2,0E-05	8,83E-07
Medida 2	MnTM-2-PyP 25 μM	-4,602059991	-5,95E+00	2,5E-05	1,13E-06
Medida 3	MnTM-2-PyP 5 μM	-5,301029996	-6,58E+00	5,0E-06	2,63E-07
Medida 3	MnTM-2-PyP 10 μM	-5	-6,31E+00	1,0E-05	4,90E-07
Medida 3	MnTM-2-PyP 15 μM	-4,823908741	-6,10E+00	1,5E-05	8,02E-07
Medida 3	MnTM-2-PyP 20 μM	-4,698970004	-5,95E+00	2,0E-05	1,12E-06
Medida 3	MnTM-2-PyP 25 μM	-4,602059991	-5,90E+00	2,5E-05	1,25E-06
			Não catal.	0	1,11E-09
			Não catal.	0	5,68E-10
			Não catal.	0	2,93E-09

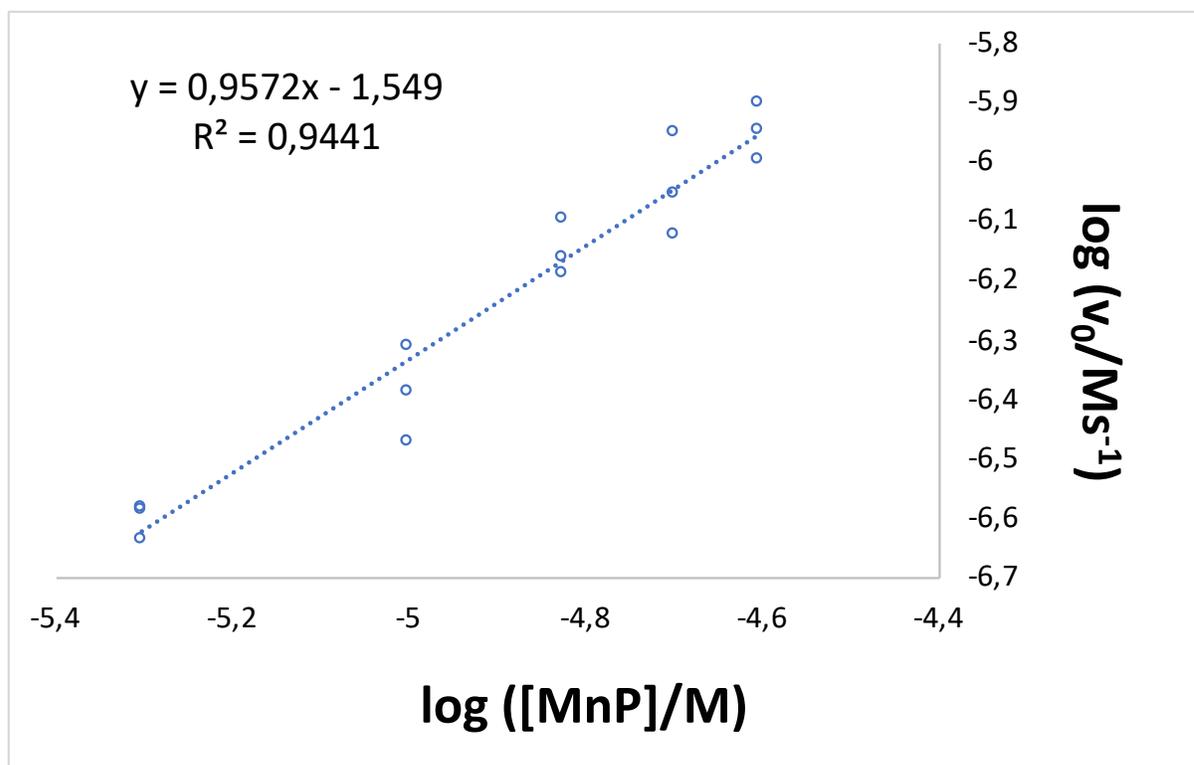


Figura AII(Br).6.1. Curva de regressão linear usada para o cálculo da ordem da reação (n) para a MnTM-2-PyP⁵⁺. Medidas de reações de bromação da MCD em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a 25±1°C. A velocidade inicial experimental (v_0) foi calculada de 0-15s. A da ordem da reação (n) é dada como o coeficiente angular da equação: $\log v_0 = \log [\text{MnP}]_n + \log k_{\text{obs}}$.

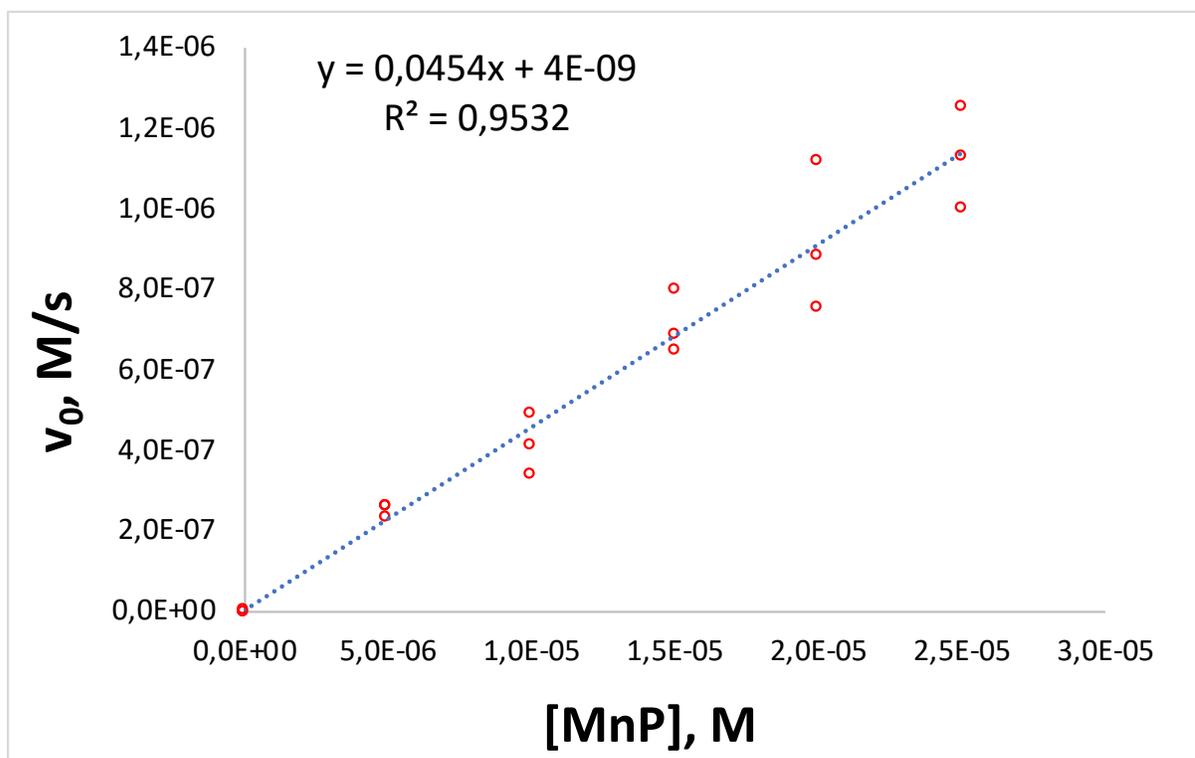
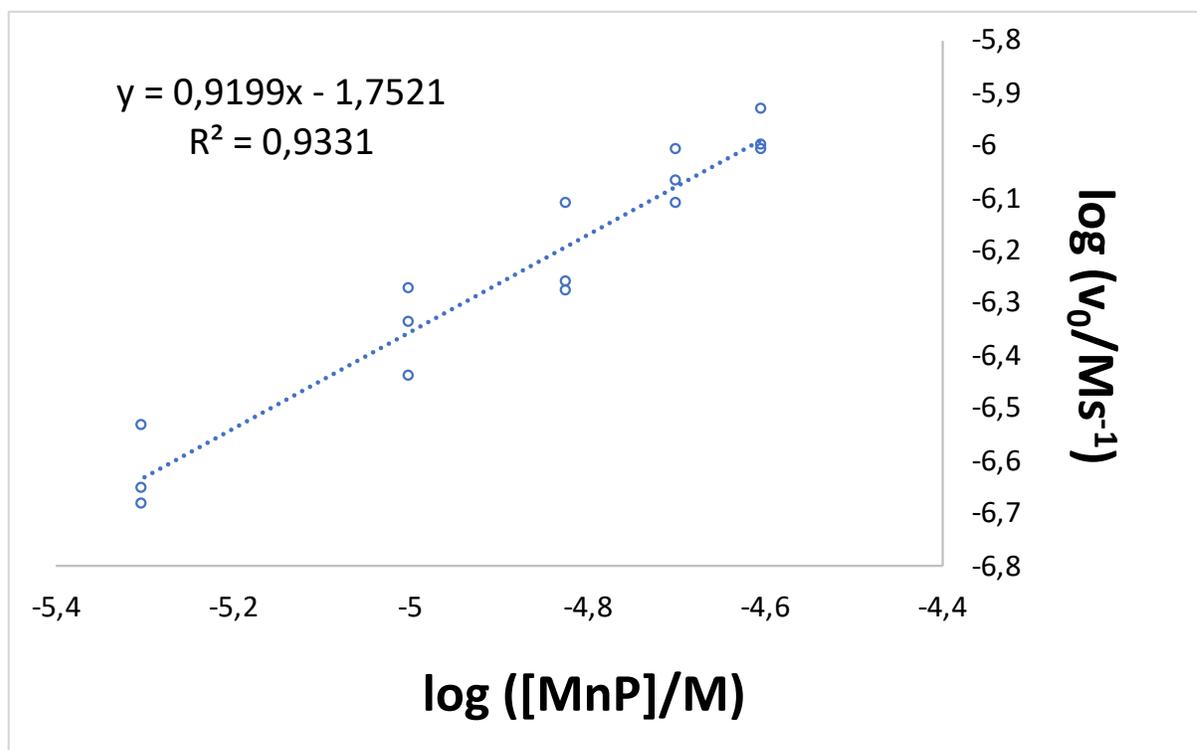


Figura AII(Br).6.2. Curva de regressão linear usada para o cálculo da k_{obs} da MnTM-2-PyP⁵⁺. Medidas de reações de bromação da MCD em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a 25±1°C.

7. Dados brutos da MnTE-2-PyP⁵⁺

	MnP	log [MnP]	log v ₀	[MnP]	v ₀
Medida 1	MnTE-2-PyP 5 µM	-5,301029996	-6,68E+00	5,0E-06	2,08E-07
Medida 1	MnTE-2-PyP 10 µM	-5	-6,44E+00	1,0E-05	3,63E-07
Medida 1	MnTE-2-PyP 15 µM	-4,823908741	-6,28E+00	1,5E-05	5,30E-07
Medida 1	MnTE-2-PyP 20 µM	-4,698970004	-6,11E+00	2,0E-05	7,72E-07
Medida 1	MnTE-2-PyP 25 µM	-4,602059991	-6,01E+00	2,5E-05	9,77E-07
Medida 2	MnTE-2-PyP 5 µM	-5,301029996	-6,65E+00	5,0E-06	2,22E-07
Medida 2	MnTE-2-PyP 10 µM	-5	-6,34E+00	1,0E-05	4,61E-07
Medida 2	MnTE-2-PyP 15 µM	-4,823908741	-6,26E+00	1,5E-05	5,47E-07
Medida 2	MnTE-2-PyP 20 µM	-4,698970004	-6,07E+00	2,0E-05	8,54E-07
Medida 2	MnTE-2-PyP 25 µM	-4,602059991	-6,00E+00	2,5E-05	1,00E-06
Medida 3	MnTE-2-PyP 5 µM	-5,301029996	-6,53E+00	5,0E-06	2,92E-07
Medida 3	MnTE-2-PyP 10 µM	-5	-6,27E+00	1,0E-05	5,35E-07
Medida 3	MnTE-2-PyP 15 µM	-4,823908741	-6,11E+00	1,5E-05	7,77E-07
Medida 3	MnTE-2-PyP 20 µM	-4,698970004	-6,01E+00	2,0E-05	9,83E-07
Medida 3	MnTE-2-PyP 25 µM	-4,602059991	-5,93E+00	2,5E-05	1,18E-06
			Não catal.	0	2,38E-09
			Não catal.	0	1,01E-08
			Não catal.	0	1,06E-08



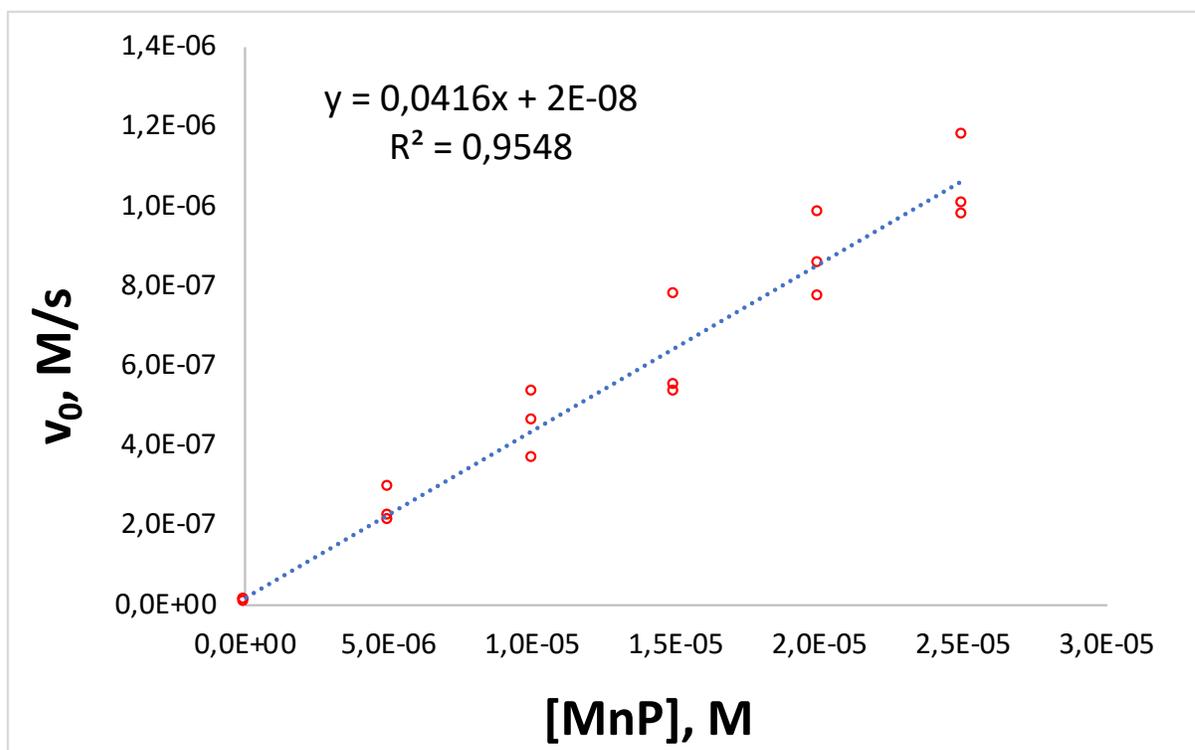


Figura AII(Br).7.2. Curva de regressão linear usada para o cálculo da k_{obs} da MnTE-2-PyP⁵⁺. Medidas de reações de bromação da MCD em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

8. Dados brutos da MnTPr-2-PyP⁵⁺

	MnP	log [MnP]	log v₀	[MnP]	v₀
Medida 1	MnTPr-2-PyP 5 μM	-5,301029996	-6,71E+00	5,00E-06	1,96E-07
Medida 1	MnTPr-2-PyP 10 μM	-5	-6,57E+00	1,00E-05	2,69E-07
Medida 1	MnTPr-2-PyP 15 μM	-4,823908741	-6,43E+00	1,50E-05	3,70E-07
Medida 1	MnTPr-2-PyP 20 μM	-4,698970004	-6,28E+00	2,00E-05	5,29E-07
Medida 1	MnTPr-2-PyP 25 μM	-4,602059991	-6,18E+00	2,50E-05	6,59E-07
Medida 2	MnTPr-2-PyP 5 μM	-5,301029996	-6,75E+00	5,00E-06	1,80E-07
Medida 2	MnTPr-2-PyP 10 μM	-5	-6,58E+00	1,00E-05	2,61E-07
Medida 2	MnTPr-2-PyP 15 μM	-4,823908741	-6,35E+00	1,50E-05	4,42E-07
Medida 2	MnTPr-2-PyP 20 μM	-4,698970004	-6,23E+00	2,00E-05	5,91E-07
Medida 2	MnTPr-2-PyP 25 μM	-4,602059991	-6,14E+00	2,50E-05	7,31E-07
Medida 3	MnTPr-2-PyP 5 μM	-5,301029996	-6,58E+00	5,00E-06	2,65E-07
Medida 3	MnTPr-2-PyP 10 μM	-5	-6,40E+00	1,00E-05	4,00E-07
Medida 3	MnTPr-2-PyP 15 μM	-4,823908741	-6,27E+00	1,50E-05	5,36E-07
Medida 3	MnTPr-2-PyP 20 μM	-4,698970004	-6,17E+00	2,00E-05	6,81E-07
Medida 3	MnTPr-2-PyP 25 μM	-4,602059991	-6,06E+00	2,50E-05	8,70E-07
			Não catal.	0	1,85E-09
			Não catal.	0	1,30E-08
			Não catal.	0	1,12E-09

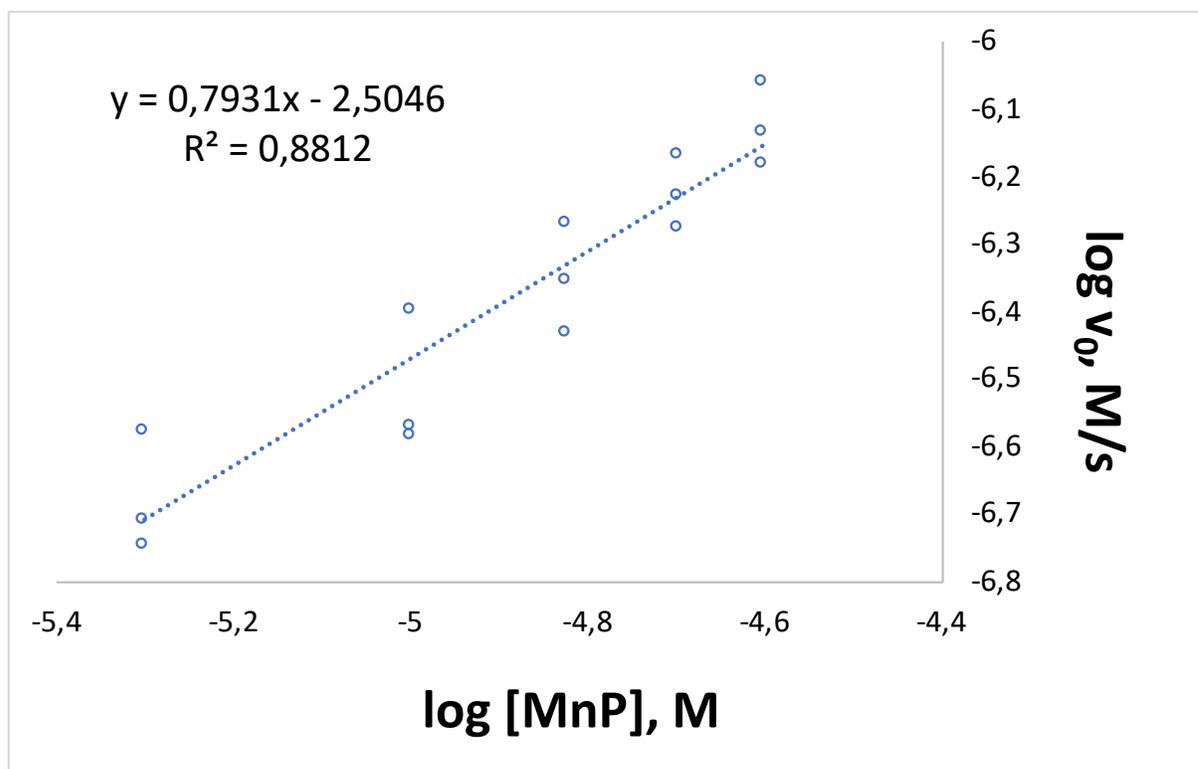


Figura AII(Br).8.1. Curva de regressão linear usada para o cálculo da ordem da reação (n) para a MnTPr-2-PyP⁵⁺. Medidas de reações de bromação da MCD em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a 25±1°C. A velocidade inicial experimental (v₀) foi calculada de 0-15s. A da ordem da reação (n) é dada como o coeficiente angular da equação: $\log v_0 = \log [\text{MnP}]_n + \log k_{\text{obs}}$.

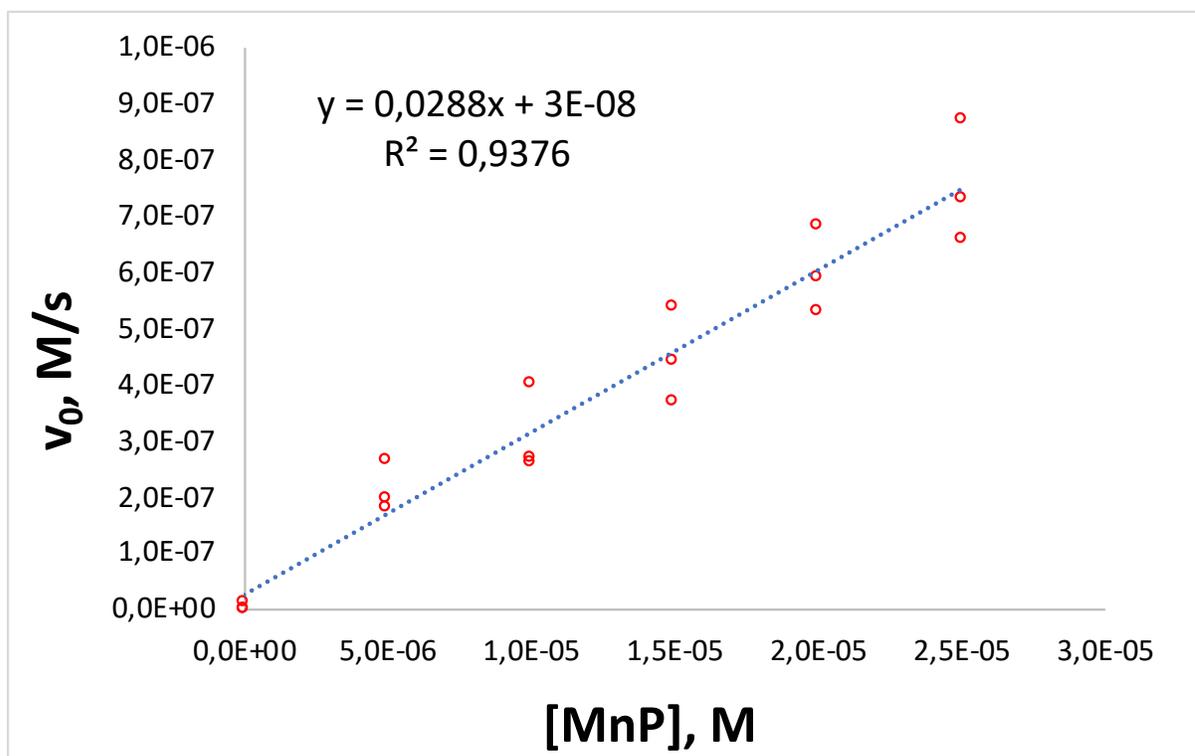


Figura AII(Br).8.2. Curva de regressão linear usada para o cálculo da k_{obs} da MnTPr-2-PyP⁵⁺. Medidas de reações de bromação da MCD em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a 25±1°C.

9. Dados brutos da MnTnHex-2-PyP⁵⁺

	MnP	log [MnP]	log v ₀	[MnP]	v ₀
Medida 1	MnTnHex-2-PyP 5 μM	-5,301029996	-7,04E+00	5,00E-06	9,14E-08
Medida 1	MnTnHex-2-PyP 10 μM	-5	-6,85E+00	1,00E-05	1,43E-07
Medida 1	MnTnHex-2-PyP 15 μM	-4,823908741	-6,65E+00	1,50E-05	2,25E-07
Medida 1	MnTnHex-2-PyP 20 μM	-4,698970004	-6,50E+00	2,00E-05	3,14E-07
Medida 1	MnTnHex-2-PyP 25 μM	-4,602059991	-6,41E+00	2,50E-05	3,86E-07
Medida 2	MnTnHex-2-PyP 5 μM	-5,301029996	-6,91E+00	5,00E-06	1,22E-07
Medida 2	MnTnHex-2-PyP 10 μM	-5	-6,74E+00	1,00E-05	1,83E-07
Medida 2	MnTnHex-2-PyP 15 μM	-4,823908741	-6,55E+00	1,50E-05	2,85E-07
Medida 2	MnTnHex-2-PyP 20 μM	-4,698970004	-6,47E+00	2,00E-05	3,37E-07
Medida 2	MnTnHex-2-PyP 25 μM	-4,602059991	-6,33E+00	2,50E-05	4,70E-07
Medida 3	MnTnHex-2-PyP 5 μM	-5,301029996	-6,97E+00	5,00E-06	1,07E-07
Medida 3	MnTnHex-2-PyP 10 μM	-5	-6,79E+00	1,00E-05	1,63E-07
Medida 3	MnTnHex-2-PyP 15 μM	-4,823908741	-6,59E+00	1,50E-05	2,55E-07
Medida 3	MnTnHex-2-PyP 20 μM	-4,698970004	-6,49E+00	2,00E-05	3,25E-07
Medida 3	MnTnHex-2-PyP 25 μM	-4,602059991	-6,37E+00	2,50E-05	4,28E-07
			Não catal.	0	1,96E-09
			Não catal.	0	2,05E-10
			Não catal.	0	7,73E-10

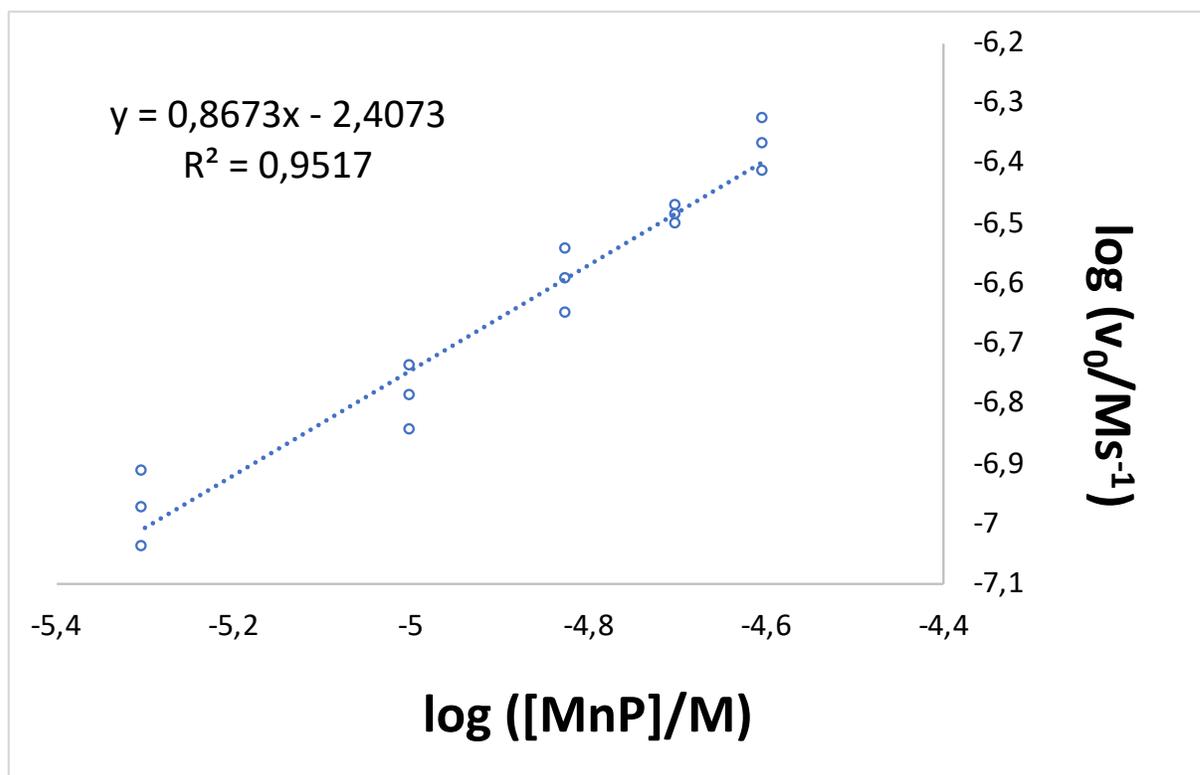


Figura AII(Br).9.1. Curva de regressão linear usada para o cálculo da ordem da reação (n) para a MnTnHex-2-PyP⁵⁺. Medidas de reações de bromação da MCD em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a 25±1°C. A velocidade inicial experimental (v_0) foi calculada de 0-15s. A da ordem da reação (n) é dada como o coeficiente angular da equação: $\log v_0 = \log [\text{MnP}]_n + \log k_{\text{obs}}$.

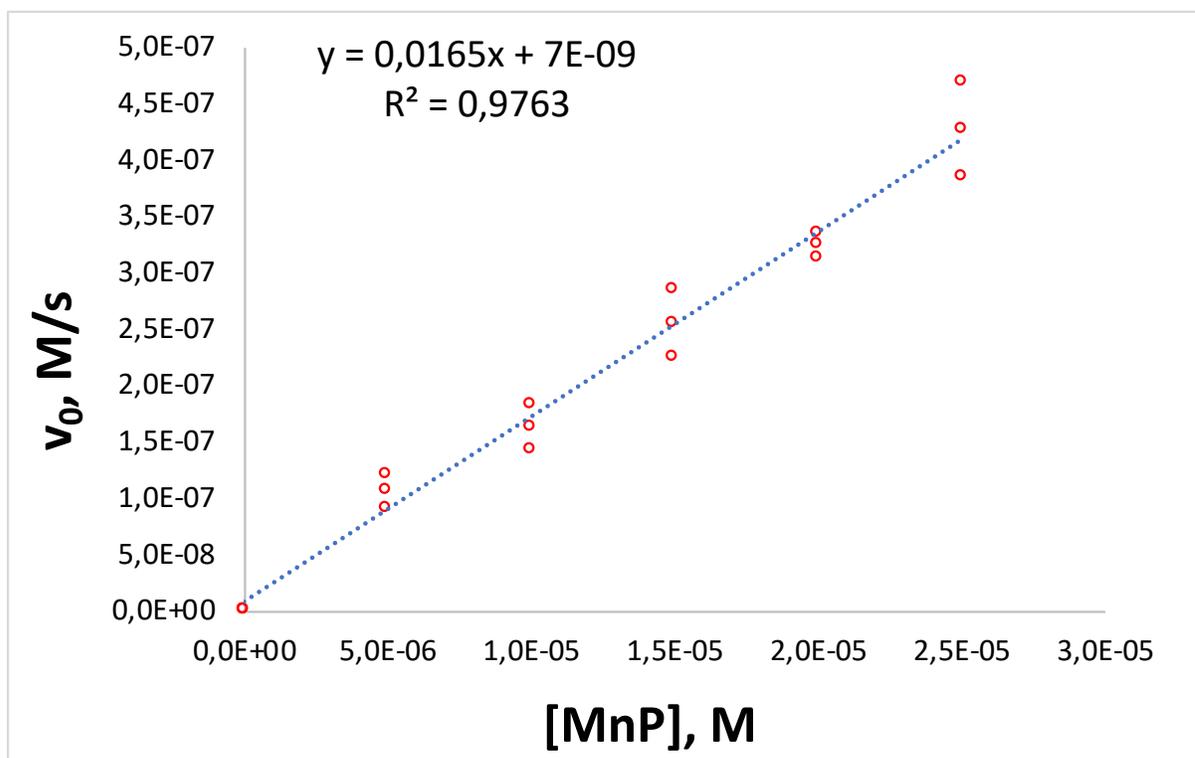


Figura AII(Br).9.2. Curva de regressão linear usada para o cálculo da k_{obs} da $\text{MnTnHex-2-PyP}^{5+}$. Medidas de reações de bromação da MCD em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Cloração

Caracterização cinética do sistema empregando as MnPs na cloração da MCD. A taxa inicial experimental (v_0) foi calculada de 0-15s. Os estudos foram realizados em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

MnPs	Mn ^{III} /Mn ^{II} $E_{1/2}$, mV vs NHE [*]	k_{obs} , s ⁻¹	n ^{**}
MnTBAP ³⁻ ***	-194	-	-
MnTM-3-PyP ⁵⁺ ***	+52	-	-
MnTE-3-PyP ⁵⁺ ***	+54	-	-
MnTM-4-PyP ⁵⁺ ***	+60	-	-
MnTE-4-PyP ⁵⁺ ***	+70	-	-
MnTM-2-PyP ⁵⁺	+220	$3,57 \times 10^{-2} \pm 1,02 \times 10^{-3}$	$0,85 \pm 0,03$
MnTE-2-PyP ⁵⁺	+228	$3,37 \times 10^{-2} \pm 2,74 \times 10^{-3}$	$0,86 \pm 0,09$
MnTPr-2-PyP ⁵⁺	+238	$1,96 \times 10^{-2} \pm 6,76 \times 10^{-4}$	$0,78 \pm 0,01$
MnTnHex-2-PyP ⁵⁺ ***	+314	-	-

*Fonte: KOS et al., 2009; BATINIĆ-HABERLE; REBOUÇAS; SPASOJEVIC, 2010. **n: ordem da reação.

***Os valores de k_{obs} e n não são aplicáveis, tendo em vista que o composto não apresenta atividade catalítica nesse sistema.

1. Dados brutos da MnTBAP³⁻

	MnP	log [MnP]	log v₀	[MnP]	v₀
Medida 1	MnTBAP 5 μM	-5,301029996	-8,18E+00	5,00E-06	6,62E-09
Medida 1	MnTBAP 10 μM	-5	-7,99E+00	1,00E-05	1,01E-08
Medida 1	MnTBAP 15 μM	-4,823908741	-7,78E+00	1,50E-05	1,67E-08
Medida 1	MnTBAP 20 μM	-4,698970004	-7,81E+00	2,00E-05	1,56E-08
Medida 1	MnTBAP 25 μM	-4,602059991	-7,97E+00	2,50E-05	1,08E-08
Medida 2	MnTBAP 5 μM	-5,301029996	-8,12E+00	5,00E-06	7,60E-09
Medida 2	MnTBAP 10 μM	-5	-8,09E+00	1,00E-05	8,07E-09
Medida 2	MnTBAP 15 μM	-4,823908741	-7,77E+00	1,50E-05	1,68E-08
Medida 2	MnTBAP 20 μM	-4,698970004	-7,77E+00	0,00002	1,71E-08
Medida 2	MnTBAP 25 μM	-4,602059991	-7,91E+00	0,000025	1,24E-08
Medida 3	MnTBAP 5 μM	-5,301029996	-8,11E+00	5E-06	7,69E-09
Medida 3	MnTBAP 10 μM	-5	-8,23E+00	1,00E-05	5,96E-09
Medida 3	MnTBAP 15 μM	-4,823908741	-7,77E+00	1,50E-05	1,69E-08
Medida 3	MnTBAP 20 μM	-4,698970004	-7,73E+00	2,00E-05	1,85E-08
Medida 3	MnTBAP 25 μM	-4,602059991	-7,87E+00	2,50E-05	1,35E-08
			Não catal.	0	2,72E-08
			Não catal.	0	1,29E-08
			Não catal.	0	1,74E-09

2. Dados brutos da MnTM-3-PyP⁵⁺

	MnP	log [MnP]	log v ₀	[MnP]	v ₀
Medida 1	MnTM-3-PyP 5 μM	-5,301029996	-8,42E+00	5,00E-06	3,77E-09
Medida 1	MnTM-3-PyP 10 μM	-5	-8,39E+00	1,00E-05	4,08E-09
Medida 1	MnTM-3-PyP 15 μM	-4,823908741	-8,78E+00	1,50E-05	1,67E-09
Medida 1	MnTM-3-PyP 20 μM	-4,698970004	-8,71E+00	2,00E-05	1,95E-09
Medida 1	MnTM-3-PyP 25 μM	-4,602059991	-8,12E+00	2,50E-05	7,56E-09
Medida 2	MnTM-3-PyP 5 μM	-5,301029996	-8,17E+00	5,00E-06	6,79E-09
Medida 2	MnTM-3-PyP 10 μM	-5	-8,18E+00	1,00E-05	6,56E-09
Medida 2	MnTM-3-PyP 15 μM	-4,823908741	-8,37E+00	1,50E-05	4,23E-09
Medida 2	MnTM-3-PyP 20 μM	-4,698970004	-8,04E+00	2,00E-05	9,05E-09
Medida 2	MnTM-3-PyP 25 μM	-4,602059991	-8,55E+00	2,50E-05	2,82E-09
Medida 3	MnTM-3-PyP 5 μM	-5,301029996	-8,46E+00	5,00E-06	3,48E-09
Medida 3	MnTM-3-PyP 10 μM	-5	-8,43E+00	1,00E-05	3,68E-09
Medida 3	MnTM-3-PyP 15 μM	-4,823908741	-8,76E+00	1,50E-05	1,72E-09
Medida 3	MnTM-3-PyP 20 μM	-4,698970004	-8,11E+00	2,00E-05	7,77E-09
Medida 3	MnTM-3-PyP 25 μM	-4,602059991	-8,68E+00	2,50E-05	2,09E-09
			Não catal.	0	1,44E-09
			Não catal.	0	5,26E-09
			Não catal.	0	2,58E-09

3. Dados brutos da MnTE-3-PyP⁵⁺

	MnP	log [MnP]	log v ₀	[MnP]	v ₀
Medida 1	MnTE-3-PyP 5 μM	-5,301029996	-8,42E+00	5,00E-06	3,77E-09
Medida 1	MnTE-3-PyP 10 μM	-5	-8,39E+00	1,00E-05	4,08E-09
Medida 1	MnTE-3-PyP 15 μM	-4,823908741	-8,78E+00	1,50E-05	1,67E-09
Medida 1	MnTE-3-PyP 20 μM	-4,698970004	-8,71E+00	2,00E-05	1,95E-09
Medida 1	MnTE-3-PyP 25 μM	-4,602059991	-8,12E+00	2,50E-05	7,56E-09
Medida 2	MnTE-3-PyP 5 μM	-5,301029996	-8,31E+00	5,00E-06	4,92E-09
Medida 2	MnTE-3-PyP 10 μM	-5	-8,08E+00	1,00E-05	8,24E-09
Medida 2	MnTE-3-PyP 15 μM	-4,823908741	-9,06E+00	1,50E-05	8,80E-10
Medida 2	MnTE-3-PyP 20 μM	-4,698970004	-7,73E+00	2,00E-05	1,84E-08
Medida 2	MnTE-3-PyP 25 μM	-4,602059991	-7,77E+00	2,50E-05	1,70E-08
Medida 3	MnTE-3-PyP 5 μM	-5,301029996	-8,20E+00	5,00E-06	6,32E-09
Medida 3	MnTE-3-PyP 10 μM	-5	-7,82E+00	1,00E-05	1,50E-08
Medida 3	MnTE-3-PyP 15 μM	-4,823908741	-8,40E+00	1,50E-05	3,94E-09
Medida 3	MnTE-3-PyP 20 μM	-4,698970004	-7,66E+00	2,00E-05	2,21E-08
Medida 3	MnTE-3-PyP 25 μM	-4,602059991	-7,89E+00	2,50E-05	1,28E-08
			Não catal.	0	1,44E-09
			Não catal.	0	7,01E-11
			Não catal.	0	5,54E-09

4. Dados brutos da MnTM-4-PyP⁵⁺

	MnP	log [MnP]	log v ₀	[MnP]	v ₀
Medida 1	MnTM-4-PyP 5 μM	-5,301029996	-8,54E+00	5,00E-06	2,88E-09
Medida 1	MnTM-4-PyP 10 μM	-5	-8,25E+00	1,00E-05	5,61E-09
Medida 1	MnTM-4-PyP 15 μM	-4,823908741	-8,40E+00	1,50E-05	4,00E-09
Medida 1	MnTM-4-PyP 20 μM	-4,698970004	-7,75E+00	2,00E-05	1,79E-08
Medida 1	MnTM-4-PyP 25 μM	-4,602059991	-7,79E+00	2,50E-05	1,64E-08
Medida 2	MnTM-4-PyP 5 μM	-5,301029996	-8,32E+00	5,00E-06	4,78E-09
Medida 2	MnTM-4-PyP 10 μM	-5	-8,12E+00	1,00E-05	7,55E-09
Medida 2	MnTM-4-PyP 15 μM	-4,823908741	-8,00E+00	1,50E-05	1,00E-08
Medida 2	MnTM-4-PyP 20 μM	-4,698970004	-8,05E+00	2,00E-05	8,94E-09
Medida 2	MnTM-4-PyP 25 μM	-4,602059991	-8,14E+00	2,50E-05	7,24E-09
Medida 3	MnTM-4-PyP 5 μM	-5,301029996	-8,61E+00	5,00E-06	2,46E-09
Medida 3	MnTM-4-PyP 10 μM	-5	-8,25E+00	1,00E-05	5,61E-09
Medida 3	MnTM-4-PyP 15 μM	-4,823908741	-8,86E+00	1,50E-05	1,39E-09
Medida 3	MnTM-4-PyP 20 μM	-4,698970004	-8,34E+00	2,00E-05	4,56E-09
Medida 3	MnTM-4-PyP 25 μM	-4,602059991	-8,07E+00	2,50E-05	8,58E-09
			Não catal.	0	4,81E-10
			Não catal.	0	3,28E-09
			Não catal.	0	6,49E-10

5. Dados brutos da MnTE-4-PyP⁵⁺

	MnP	log [MnP]	log v ₀	[MnP]	v ₀
Medida 1	MnTE-4-PyP 5 μM	-5,301029996	-8,62E+00	5,00E-06	2,42E-09
Medida 1	MnTE-4-PyP 10 μM	-5	-9,04E+00	1,00E-05	9,18E-10
Medida 1	MnTE-4-PyP 15 μM	-4,823908741	-8,00E+00	1,50E-05	1,01E-08
Medida 1	MnTE-4-PyP 20 μM	-4,698970004	-7,71E+00	2,00E-05	1,95E-08
Medida 1	MnTE-4-PyP 25 μM	-4,602059991	-8,22E+00	2,50E-05	6,09E-09
Medida 2	MnTE-4-PyP 5 μM	-5,301029996	-9,69E+00	5,00E-06	2,06E-10
Medida 2	MnTE-4-PyP 10 μM	-5	-8,25E+00	1,00E-05	5,61E-09
Medida 2	MnTE-4-PyP 15 μM	-4,823908741	-8,21E+00	1,50E-05	6,17E-09
Medida 2	MnTE-4-PyP 20 μM	-4,698970004	-7,75E+00	2,00E-05	1,79E-08
Medida 2	MnTE-4-PyP 25 μM	-4,602059991	-7,61E+00	2,50E-05	2,45E-08
Medida 3	MnTE-4-PyP 5 μM	-5,301029996	-7,49E+00	5,00E-06	3,21E-08
Medida 3	MnTE-4-PyP 10 μM	-5	-7,64E+00	1,00E-05	2,28E-08
Medida 3	MnTE-4-PyP 15 μM	-4,823908741	-7,84E+00	1,50E-05	1,46E-08
Medida 3	MnTE-4-PyP 20 μM	-4,698970004	-8,15E+00	2,00E-05	7,06E-09
Medida 3	MnTE-4-PyP 25 μM	-4,602059991	-8,98E+00	2,50E-05	1,05E-09
			Não catal.	0	5,35E-10
			Não catal.	0	6,49E-10
			Não catal.	0	1,20E-09

6. Dados brutos da MnTM-2-PyP⁵⁺

	MnP	log [MnP]	log v ₀	[MnP]	v ₀
Medida 1	MnTM-2-PyP 5 μM	-5,301029996	-6,69E+00	5,00E-06	2,06E-07
Medida 1	MnTM-2-PyP 10 μM	-5	-6,43E+00	1,00E-05	3,68E-07
Medida 1	MnTM-2-PyP 15 μM	-4,823908741	-6,27E+00	1,50E-05	5,41E-07
Medida 1	MnTM-2-PyP 20 μM	-4,698970004	-6,13E+00	2,00E-05	7,34E-07
Medida 1	MnTM-2-PyP 25 μM	-4,602059991	-6,07E+00	2,50E-05	8,47E-07
Medida 2	MnTM-2-PyP 5 μM	-5,301029996	-6,64E+00	5,00E-06	2,31E-07
Medida 2	MnTM-2-PyP 10 μM	-5	-6,39E+00	1,00E-05	4,06E-07
Medida 2	MnTM-2-PyP 15 μM	-4,823908741	-6,24E+00	1,50E-05	5,78E-07
Medida 2	MnTM-2-PyP 20 μM	-4,698970004	-6,12E+00	0,00002	7,63E-07
Medida 2	MnTM-2-PyP 25 μM	-4,602059991	-6,05E+00	0,000025	8,96E-07
Medida 3	MnTM-2-PyP 5 μM	-5,301029996	-6,59E+00	0,000005	2,56E-07
Medida 3	MnTM-2-PyP 10 μM	-5	-6,35E+00	1,00E-05	4,44E-07
Medida 3	MnTM-2-PyP 15 μM	-4,823908741	-6,21E+00	1,50E-05	6,14E-07
Medida 3	MnTM-2-PyP 20 μM	-4,698970004	-6,10E+00	2,00E-05	7,92E-07
Medida 3	MnTM-2-PyP 25 μM	-4,602059991	-6,03E+00	2,50E-05	9,44E-07
			Não catal.	0	1,96E-10
			Não catal.	0	2,38E-10
			Não catal.	0	1,72E-09

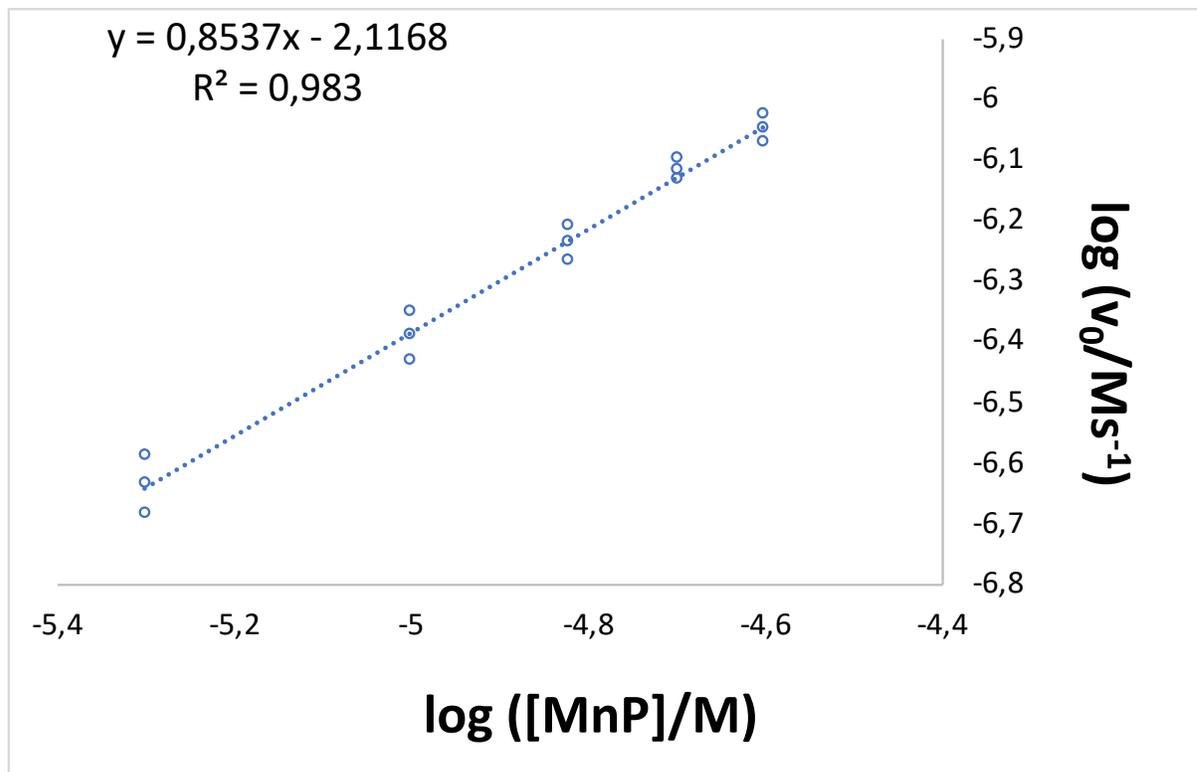


Figura AII(CI).6.1. Curva de regressão linear usada para o cálculo da ordem da reação (n) para a MnTM-2-PyP⁵⁺. Medidas de reações de cloração da MCD em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a 25±1°C. A velocidade inicial experimental (v_0) foi calculada de 0-15s. A da ordem da reação (n) é dada como o coeficiente angular da equação: $\log v_0 = \log [\text{MnP}]_n + \log k_{\text{obs}}$.

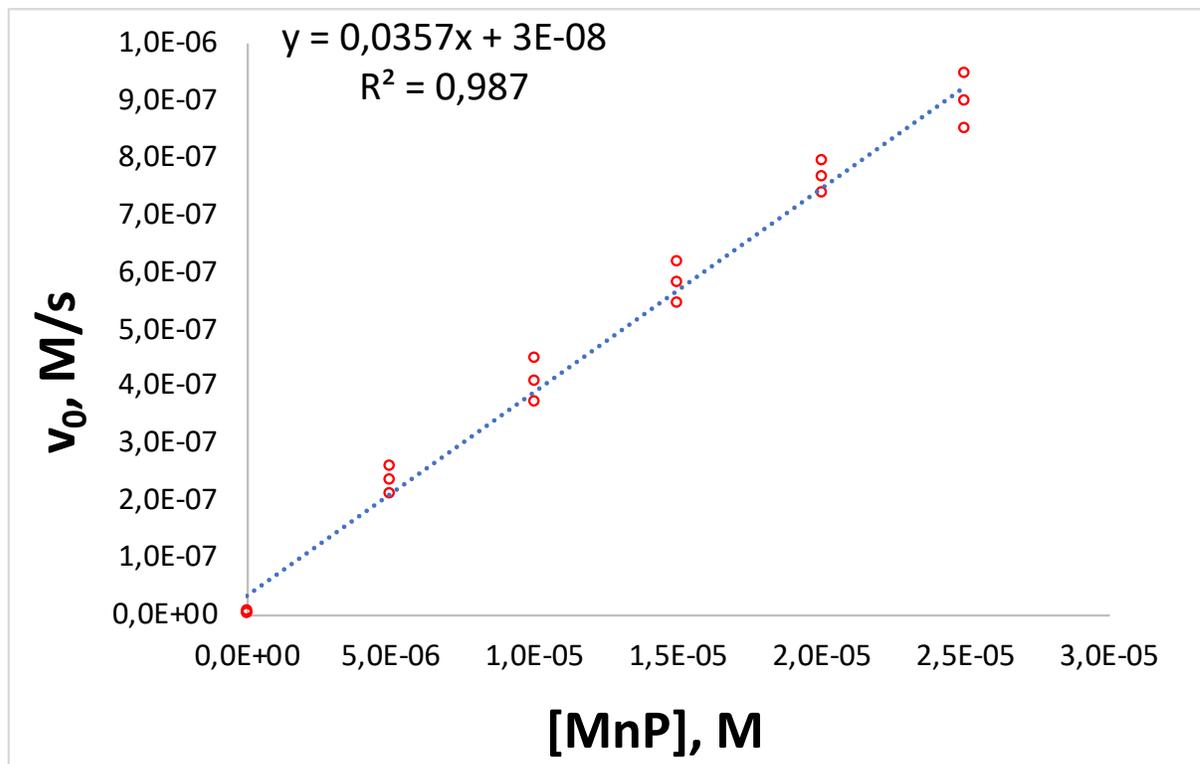


Figura AII(Cl).6.2. Curva de regressão linear usada para o cálculo da k_{obs} da MnTM-2-PyP⁵⁺. Medidas de reações de cloração da MCD em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a 25±1°C.

7. Dados brutos da MnTE-2-PyP⁵⁺

	MnP	log [MnP]	log v₀	[MnP]	v₀
Medida 1	MnTE-2-PyP 5 μM	-5,301029996	-6,54E+00	5,00E-06	2,88E-07
Medida 1	MnTE-2-PyP 10 μM	-5	-6,28E+00	1,00E-05	5,21E-07
Medida 1	MnTE-2-PyP 15 μM	-4,823908741	-6,18E+00	1,50E-05	6,63E-07
Medida 1	MnTE-2-PyP 20 μM	-4,698970004	-6,07E+00	2,00E-05	8,47E-07
Medida 1	MnTE-2-PyP 25 μM	-4,602059991	-5,98E+00	2,50E-05	1,06E-06
Medida 2	MnTE-2-PyP 5 μM	-5,301029996	-6,75E+00	5,00E-06	1,77E-07
Medida 2	MnTE-2-PyP 10 μM	-5	-6,53E+00	1,00E-05	2,93E-07
Medida 2	MnTE-2-PyP 15 μM	-4,823908741	-6,33E+00	1,50E-05	4,69E-07
Medida 2	MnTE-2-PyP 20 μM	-4,698970004	-6,21E+00	2,00E-05	6,11E-07
Medida 2	MnTE-2-PyP 25 μM	-4,602059991	-6,14E+00	2,50E-05	7,25E-07
Medida 3	MnTE-2-PyP 5 μM	-5,301029996	-6,73E+00	5,00E-06	1,86E-07
Medida 3	MnTE-2-PyP 10 μM	-5	-6,45E+00	1,00E-05	3,55E-07
Medida 3	MnTE-2-PyP 15 μM	-4,823908741	-6,26E+00	1,50E-05	5,50E-07
Medida 3	MnTE-2-PyP 20 μM	-4,698970004	-6,20E+00	2,00E-05	6,31E-07
Medida 3	MnTE-2-PyP 25 μM	-4,602059991	-6,10E+00	2,50E-05	7,94E-07
			Não catal.	0	1,11E-09
			Não catal.	0	3,33E-09
			Não catal.	0	1,23E-09

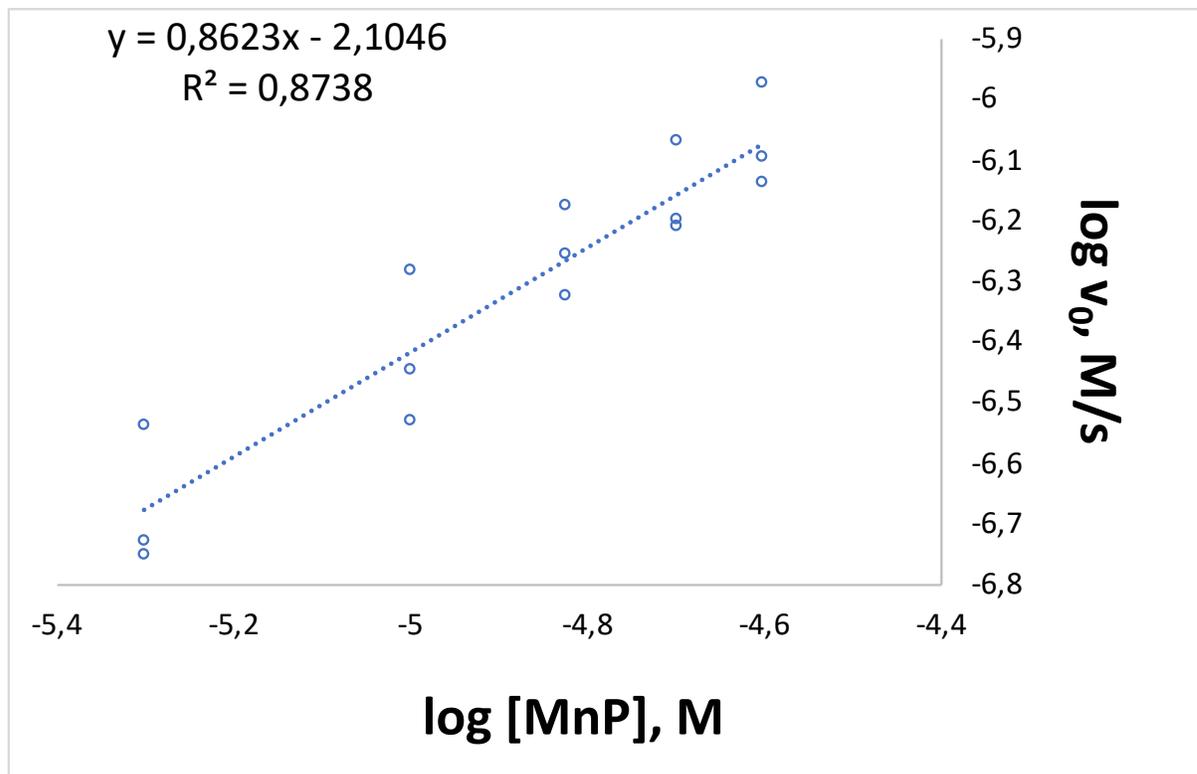


Figura AII(Cl).7.1. Curva de regressão linear usada para o cálculo da ordem da reação (n) para a MnTE-2-PyP⁵⁺. Medidas de reações de cloração da MCD em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a 25±1°C. A velocidade inicial experimental (v_0) foi calculada de 0-15s. A da ordem da reação (n) é dada como o coeficiente angular da equação: $\log v_0 = \log [\text{MnP}]n + \log k_{\text{obs}}$.

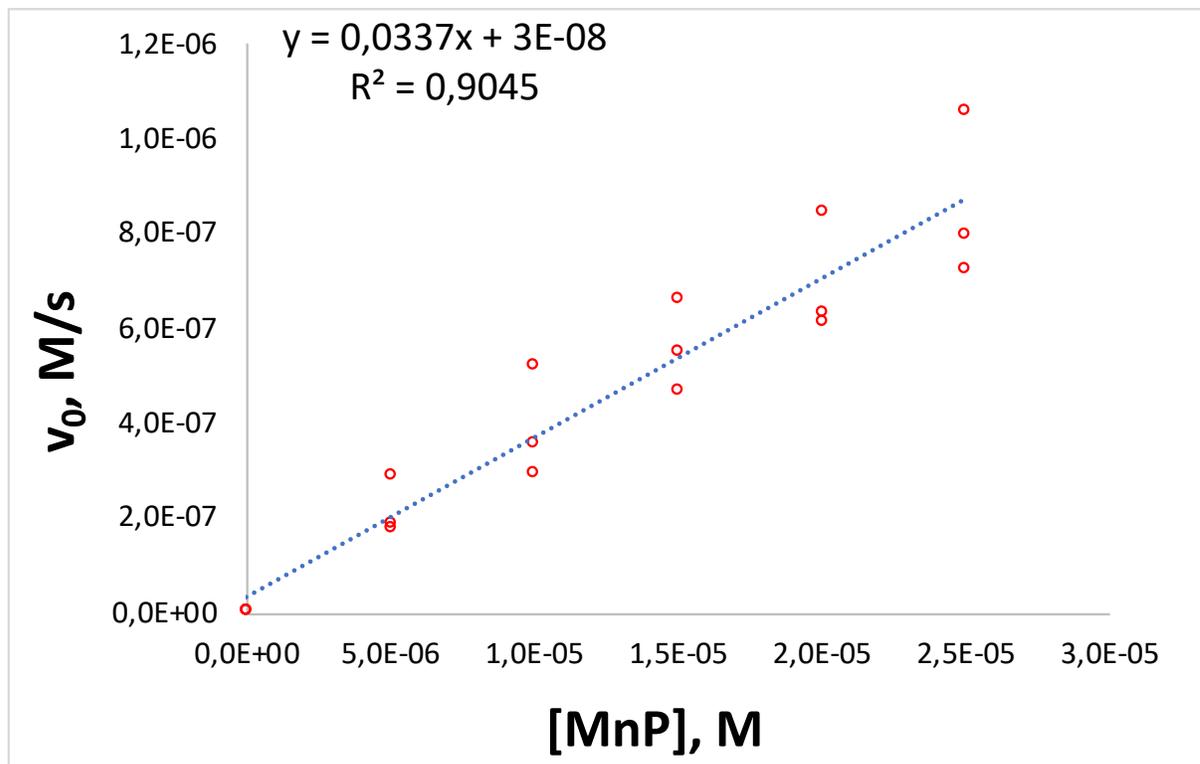


Figura AII(Cl).7.2. Curva de regressão linear usada para o cálculo da k_{obs} da MnTE-2-PyP⁵⁺. Medidas de reações de cloração da MCD em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

8. Dados brutos da MnTPPr-2-PyP⁵⁺

	MnP	log [MnP]	log v₀	[MnP]	v₀
Medida 1	MnTPPr-2-PyP 5 μM	-5,301029996	-6,86E+00	5,00E-06	1,39E-07
Medida 1	MnTPPr-2-PyP 10 μM	-5	-6,58E+00	1,00E-05	2,65E-07
Medida 1	MnTPPr-2-PyP 15 μM	-4,823908741	-6,46E+00	1,50E-05	3,45E-07
Medida 1	MnTPPr-2-PyP 20 μM	-4,698970004	-6,35E+00	2,00E-05	4,50E-07
Medida 1	MnTPPr-2-PyP 25 μM	-4,602059991	-6,32E+00	2,50E-05	4,83E-07
Medida 2	MnTPPr-2-PyP 5 μM	-5,301029996	-6,85E+00	5,00E-06	1,42E-07
Medida 2	MnTPPr-2-PyP 10 μM	-5	-6,59E+00	1,00E-05	2,55E-07
Medida 2	MnTPPr-2-PyP 15 μM	-4,823908741	-6,46E+00	1,50E-05	3,45E-07
Medida 2	MnTPPr-2-PyP 20 μM	-4,698970004	-6,36E+00	2,00E-05	4,33E-07
Medida 2	MnTPPr-2-PyP 25 μM	-4,602059991	-6,30E+00	2,50E-05	4,97E-07
Medida 3	MnTPPr-2-PyP 5 μM	-5,301029996	-6,84E+00	5,00E-06	1,45E-07
Medida 3	MnTPPr-2-PyP 10 μM	-5	-6,61E+00	1,00E-05	2,46E-07
Medida 3	MnTPPr-2-PyP 15 μM	-4,823908741	-6,46E+00	1,50E-05	3,44E-07
Medida 3	MnTPPr-2-PyP 20 μM	-4,698970004	-6,38E+00	2,00E-05	4,17E-07
Medida 3	MnTPPr-2-PyP 25 μM	-4,602059991	-6,29E+00	2,50E-05	5,11E-07
			Não catal.	0	8,37E-10
			Não catal.	0	2,45E-09
			Não catal.	0	3,90E-09

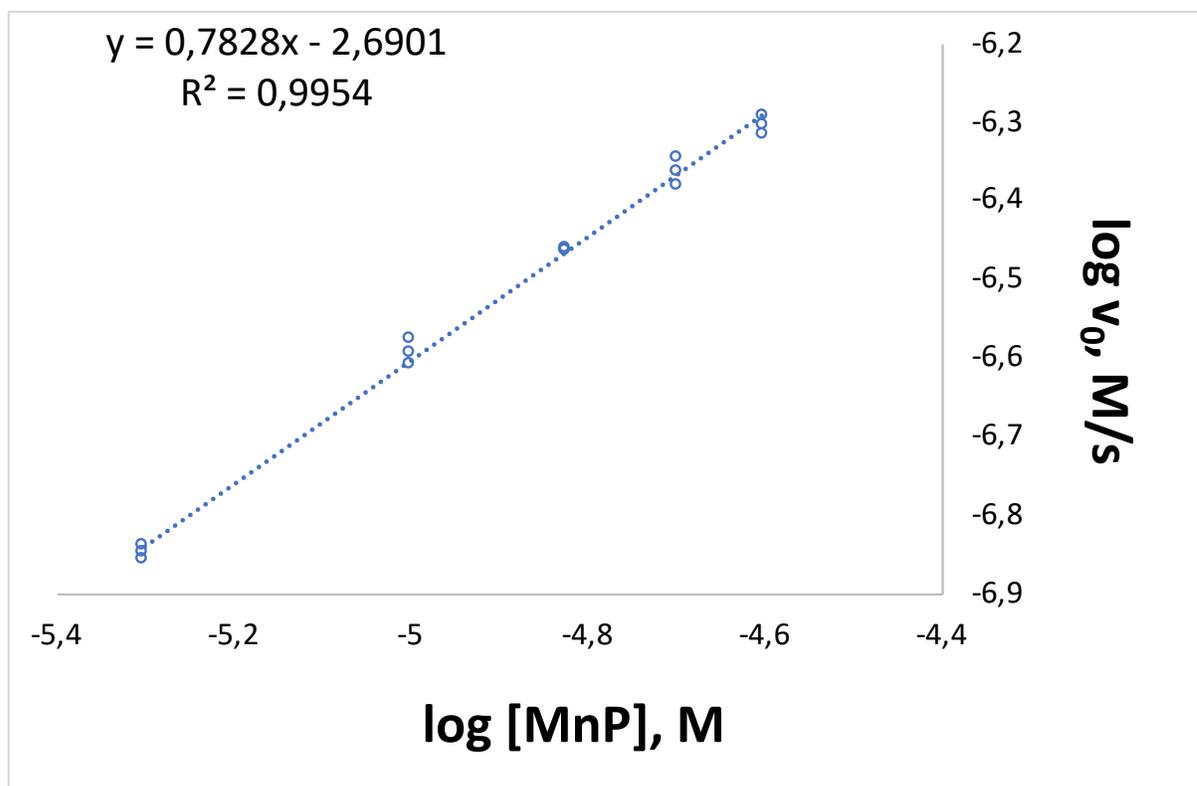


Figura AII(Cl).8.1. Curva de regressão linear usada para o cálculo da ordem da reação (n) para a MnTPr-2-PyP⁵⁺. Medidas de reações de cloração da MCD em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a 25±1°C. A velocidade inicial experimental (v₀) foi calculada de 0-15s. A da ordem da reação (n) é dada como o coeficiente angular da equação: $\log v_0 = \log [\text{MnP}]^n + \log k_{\text{obs}}$.

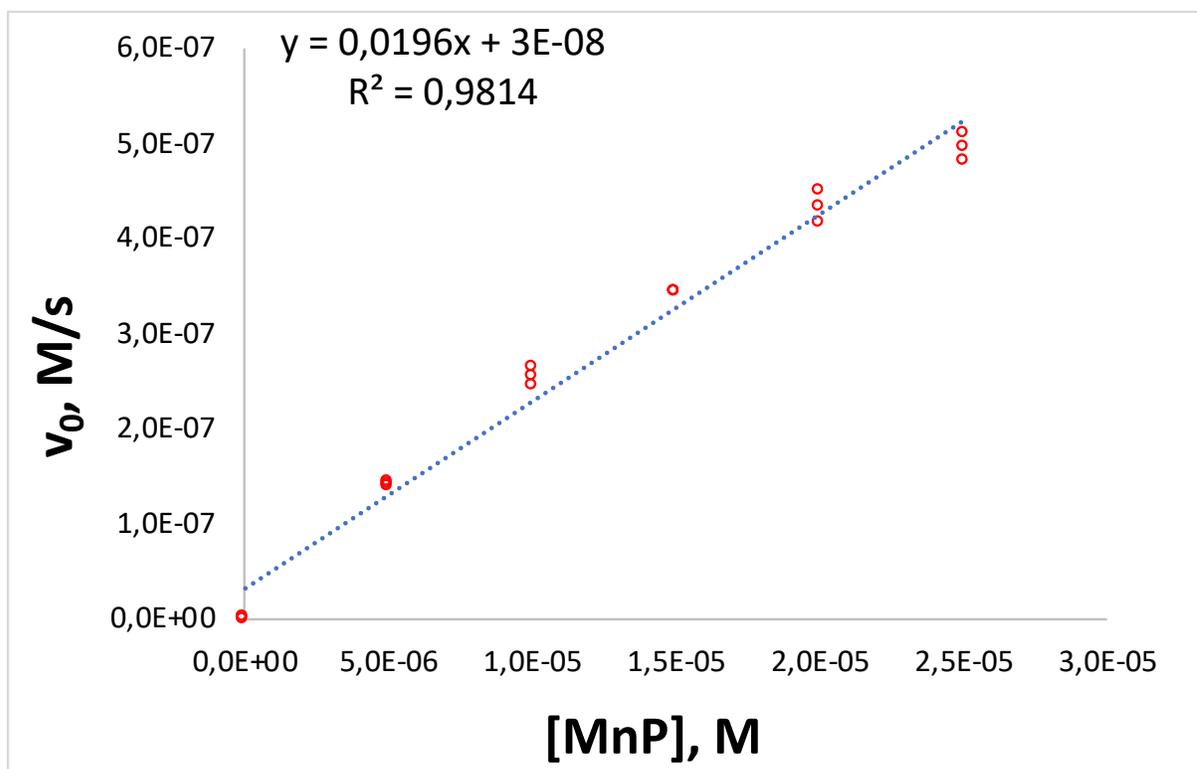


Figura AII(Cl).8.2. Curva de regressão linear usada para o cálculo da k_{obs} da MnTPr-2-PyP⁵⁺. Medidas de reações de cloração da MCD em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

9. Dados brutos da MnTnHex-2-PyP⁵⁺

	MnP	log [MnP]	log v₀	[MnP]	v₀
Medida 1	MnTnHex-2-PyP 5 µM	-5,301029996	-7,90E+00	5,00E-06	1,25E-08
Medida 1	MnTnHex-2-PyP 10 µM	-5	-7,63E+00	1,00E-05	2,35E-08
Medida 1	MnTnHex-2-PyP 15 µM	-4,823908741	-7,76E+00	1,50E-05	1,75E-08
Medida 1	MnTnHex-2-PyP 20 µM	-4,698970004	-7,68E+00	2,00E-05	2,09E-08
Medida 1	MnTnHex-2-PyP 25 µM	-4,602059991	-7,86E+00	2,50E-05	1,39E-08
Medida 2	MnTnHex-2-PyP 5 µM	-5,301029996	-7,95E+00	5,00E-06	1,13E-08
Medida 2	MnTnHex-2-PyP 10 µM	-5	-7,74E+00	1,00E-05	1,83E-08
Medida 2	MnTnHex-2-PyP 15 µM	-4,823908741	-7,83E+00	1,50E-05	1,48E-08
Medida 2	MnTnHex-2-PyP 20 µM	-4,698970004	-7,73E+00	2,00E-05	1,86E-08
Medida 2	MnTnHex-2-PyP 25 µM	-4,602059991	-7,92E+00	2,50E-05	1,20E-08
Medida 3	MnTnHex-2-PyP 5 µM	-5,301029996	-7,90E+00	5,00E-06	1,25E-08
Medida 3	MnTnHex-2-PyP 10 µM	-5	-7,63E+00	1,00E-05	2,35E-08
Medida 3	MnTnHex-2-PyP 15 µM	-4,823908741	-7,76E+00	1,50E-05	1,75E-08
Medida 3	MnTnHex-2-PyP 20 µM	-4,698970004	-7,68E+00	2,00E-05	2,09E-08
Medida 3	MnTnHex-2-PyP 25 µM	-4,602059991	-7,86E+00	2,50E-05	1,39E-08
			Não catal.	0	1,61E-09
			Não catal.	0	1,69E-09
			Não catal.	0	1,61E-09

RÔMULO SEVERO SAMPAIO

romulo.smp@gmail.com

