



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

TESE DE DOUTORADO

**2-N-alquilpiridilporfirinas de Mn(III) como modelos tiol (per)oxidases e agentes
terapêuticos redox ativos em modelo animal de câncer de mama e modelo vegetal de
estresse salino**

Jacqueline Cristina Bueno Janice de Jesus

**João Pessoa – PB – Brasil
Maio/2020**



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

TESE DE DOUTORADO

2-*N*-alquilpiridilporfirinas de Mn(III) como modelos tiol (per)oxidases e agentes terapêuticos redox ativos em modelo animal de câncer de mama e modelo vegetal de estresse salino

Jacqueline Cristina Bueno Janice de Jesus*,**

Tese de doutorado apresentada como um dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Química pela Universidade Federal da Paraíba

**Orientador: Júlio Santos Rebouças
2º Orientador: Cosme Rafael Martínez Salinas
Co-Orientadora: Ines Batinić-Haberle**

***Bolsista DS da CAPES**

****Bolsista SWE do CNPq na Duke University Medical School, Durham, NC, EUA.**

**João Pessoa – PB – Brasil
Maio/2020**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

J582 Jesus, Jacqueline Cristina Bueno Janice de.
2-N-alquilpiridilporfirinas de Mn(III) como modelos
tiol (per)oxidases e agentes terapêuticos redox ativos
em modelo animal de câncer de mama e modelo vegetal de
estresse salino / Jacqueline Cristina Bueno Janice de
Jesus. - João Pessoa, 2020.
160 f. : il.

Orientação: Júlio Santos Rebouças, Cosme Rafael
Martínez Salinas.

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

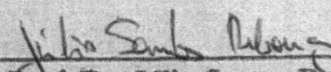
1. Química. 2. Atividade tiol (per)oxidase. 3.
Radiossensibilização. 4. Sorgo sacarino. 5. Atenuador
de estresse salino. 6. Porfirinas de Mn. I. Rebouças,
Júlio Santos. II. Martínez Salinas, Cosme Rafael. III.
Batinic-Haberle, Ines. IV. Título.

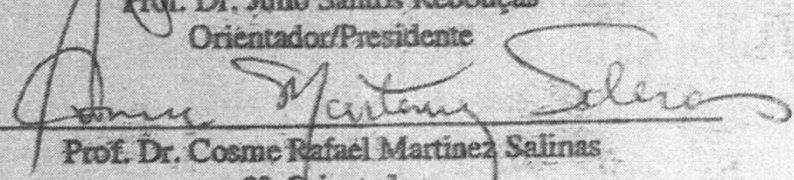
UFPB/BC

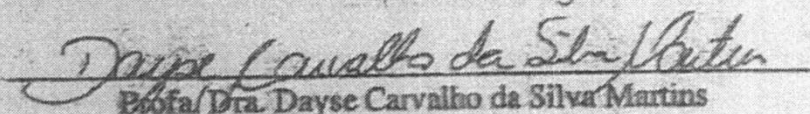
CDU 54(043)

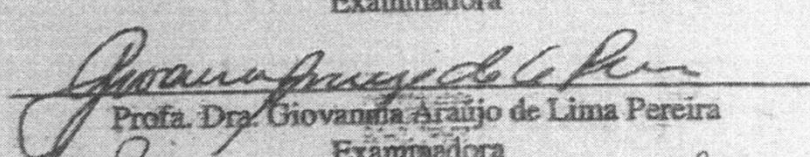
2-N-alkilpiridilporfirinas de Mn(III) como modelos de tiol (per)oxidases e agentes terapêuticos redox ativos em modelo animal de câncer de mama e modelo vegetal de estresse salino.

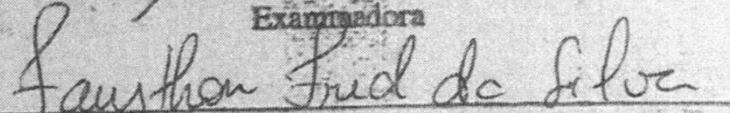
Tese de Doutorado apresentada pela aluna Jacqueline Cristina Bueno Janice de Jesus e aprovada pela banca examinadora em 22 de maio de 2020.

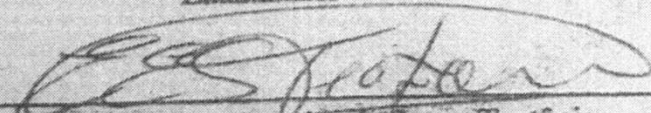

Prof. Dr. Júlio Santos Rebouças
Orientador/Presidente


Prof. Dr. Cosme Rafael Martinez Salinas
2º. Orientador


Profa. Dra. Dayse Carvalho da Silva Martins
Examinadora


Profa. Dra. Giovanna Araújo de Lima Pereira
Examinadora


Prof. Dr. Fausthon Fred da Silva
Examinador


Prof. Dr. Ercules Epaminondas de Sousa Teotônio
Examinador

Assinaturas da Banca realizadas em modo Webconferência em 22/05/2020, digitalizadas e certificadas pelo Prof. Dr. Júlio Santos Rebouças (SIAPE 1698581) em 22/05/2020

*À Mônica, Jannaira, Anderson,
Jorge, Gabi e Ferreira,
minha família e meus amigos,
pelo apoio constante ou pela simples existência
Com amor e carinho,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Júlio pela extrema paciência, pela dedicação, por proporcionar inúmeras realizações acadêmicas e pessoais por meio dos projetos e congressos aos quais ele sempre incentivou as participações.

Ao meu orientador Cosme pela disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos, pela paciência, compreensão e pelas muitas palavras de acolhimento e incentivo, que fizeram muita diferença na minha jornada.

A Ines e Ivan pelo apoio, pelas muitas conversas regadas a café ou a cerveja, pelos ensinamentos químicos e da vida compartilhados. Pelas inúmeras histórias e trocas culturais que permitiram que eu mudasse meu modo de pensar sobre os mais diversos aspectos. E por sempre estarem preocupados com meu desenvolvimento acadêmico e pessoal durante meu período nos EUA e após meu retorno.

A Artak Tovmasyan por ser mais que meu supervisor no laboratório. Obrigada pela amizade, por todo apoio, pelas horas e horas de conversas sobre música, artes, ciência, diferenças culturais e sobre a vida. E por ser um exemplo acadêmico e de ser humano para mim.

Aos meus amigos e colegas que são (foram) do grupo do prof. Júlio: Caio, Cristiano, Rômulo, Stephanne, João e Anne. Em especial, a Clarissa e Barbara pelo auxílio nos experimentos. E a Ferreira e Victor Hugo, que além do auxílio em alguns projetos, sempre estiveram dispostos a contribuir com as discussões científicas e existenciais, foi uma felicidade encontrar vocês nessa trajetória científica/de vida. Todos vocês foram fundamentais para o desenvolvimento dessa tese e do amor que sinto pelas porfirinas.

Aos colegas do grupo do prof. Cosme: Ubiratan, Andreza, Carlos e Fernanda. Que sempre foram super prestativos seja para ensinar algum procedimento ou explicar alguma dúvida referente à área biológica.

Aos meus amigos do LCCQS e DQ: Bruna, Caio, Carol, Clarissa, Cristian, Dariston, Elaine, Gabi, Geórgia, Gilvan, Handerson, Hugo, Hundemberg, Iran, Israel, Jandeilson, J. Ferreira, Katharinne, Marcelo e Paulo. Muito obrigada pelas ajudas prestadas, por compartilhar minhas revoltas, pelos momentos de conversas científicas, filosóficas e desprezensas. Foi excepcional esse tempo de convivência com vocês, tanto dentro da UFPB quanto pelos shows, festas, churrascos e bares da vida. Eu sinto (e sentirei) saudades.

Aos amigos conhecidos e reconhecidos durante o sanduíche: Pedro, Bruna, Fabiana, Derek, Guilherme e Ondra. Sem vocês teria sido solitário.

Aos amigos Renata, Danilo, Nayara e Mardson, originalmente amigos de Anderson, que me acolheram e me apoiaram. Sou muito feliz pela gentileza da vida em proporcionar o nosso encontro.

Aos meus amigos da graduação e/ou da vida: João Batista, Inakã, Esther, Jaqueline, Evandro, João Jarllys, Ernani, Bruno, Yasmine, Thamires e Bruna pelo amor e apoio de sempre.

Aos professores do departamento, que sempre estiveram dispostos a compartilhar seus conhecimentos, em especial à Juliana Vale, pela qual tenho muito carinho e muita admiração.

A Nathalia, Gabi, Monaliza e Ferreira pelo apoio de sempre e pela família que são para mim.

Ao meu irmão Jorge, meu sobrinho Adonias, minha mãe Jannaira, meu pai Alexandre, meu companheiro Anderson e minha filha Mônica por, de alguma forma, serem meu porto seguro.

A todos que por ventura eu tenha esquecido e que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

A CAPES, CNPq e FINEP pelas bolsas e suporte financeiro concedido.

Dream on

Dream on

Dream on

Dream until your dreams come true

(Aerosmith)

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
LISTA DE ESTRUTURAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xxii
CAPÍTULO 1: Introdução Geral	1
1.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	1
1.1.1 Aspectos gerais de porfirinas e metaloporfirinas	1
1.1.2 2- <i>N</i> -piridilporfirinas de Mn(III)	4
1.1.3 Estresse oxidativo	5
1.1.4 2- <i>N</i> -alquilpiridilporfirinas de Mn(III) em sistemas biológicos.....	6
1.2 OBJETIVOS GERAIS	7
CAPÍTULO 2: Obtenção da 2-<i>N</i>-piridilporfirina de Mn(III) (MnT-2-PyPcl) em meio aquoso usando técnicas quimiométricas e derivatização para síntese de Mn-porfirinas catiônicas	9
2.1 INTRODUÇÃO	9
2.1.1 Síntese de Mn-porfirinas	9
2.1.2 Quimiometria e síntese de porfirinas	12
2.2 OBJETIVOS	14
2.3 PARTE EXPERIMENTAL	16
2.3.1 Reagentes e solventes	16
2.3.2 Equipamentos	16
2.3.3 Estudo quimiométrico para obtenção da cloreto de 5,10,15,20-tetra(2-piridil)porfirinatomanganês(III) MnT-2-PyPcl em meio aquoso ácido	16
2.3.4 Experimentos extras de obtenção da cloreto de 5,10,15,20-tetra(2-piridil)porfirinatomanganês(III) MnT-2-PyPcl em meio aquoso ácido..	20
2.3.5 Síntese em escala preparativa da MnT-2-PyPcl em meio aquoso ácido	20

2.3.6 Alquilação da MnT-2-PyPCL: síntese dos cloretos de 5,10,15,20-tetra(<i>N</i> -alquilpiridínio-2-il)porfirinatomanganês(III) (MnTalquil-2-PyP)Cl ₅ , sendo alquil = etil e <i>n</i> -hexil	22
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
2.4.1 Estudo quimiométrico para obtenção da MnT-2-PyPCL em meio aquoso ácido	24
2.4.2 Síntese em escala preparativa da MnT-2-PyPCL em meio aquoso ácido	32
2.4.3 Síntese das Mn-porfirinas catiônicas: cloreto de 5,10,15,20-tetra(<i>N</i> -alquilpiridínio-2-il)porfirinatomanganês(III) (MnTalquil-2-PyP)Cl ₅	33
2.5 CONCLUSÕES	38
CAPÍTULO 3: Estudo de Mn-porfirinas como modelo de glutathiona/tiol peroxidase e oxidase.....	39
3.1 INTRODUÇÃO	39
3.2 OBJETIVOS	42
3.3 PARTE EXPERIMENTAL	46
3.3.1 Reagentes e solventes	46
3.3.2 Equipamentos	46
3.3.3 Medidas espectrofotométricas	46
3.3.3.1 Determinação da taxa de oxidação do NADPH	46
3.3.3.2 Acompanhamento espectrofotométrico da reação ao longo do tempo	47
3.3.4 Estudo eletroquímico dos níveis de oxigênio	47
3.3.4.1 Consumo de oxigênio durante o ciclo MnP/peróxido/tiol	47
3.3.4.2 Geração de oxigênio, em meio anaeróbico, durante o ciclo MnP/peróxido/tiol	48
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
3.4.1 MnTE-2-PyP ⁵⁺ como catalisador da oxidação da glutathiona	50
3.4.2 Oxidação da glutathiona (GSH) catalisada por diferentes compostos redox ativos, utilizando H ₂ O ₂ como oxidante	61
3.4.3 Oxidação da glutathiona (GSH) catalisada por compostos redox-ativos, utilizando o <i>t</i> -BuOOH como agente oxidante modelo para hidroperóxidos lipídicos	64
3.4.4 Reatividade das MnTE-2-PyP ⁵⁺ com diferentes tióis	66
3.5 CONCLUSÕES	68

CAPÍTULO 4: Efeito da associação entre Mn-porfirinas, ascorbato e radiação na inibição do crescimento de tumor em modelo animal de câncer de mama	69
4.1 INTRODUÇÃO	69
4.2 OBJETIVOS	71
4.3 PARTE EXPERIMENTAL	73
4.3.2 Materiais	73
4.3.2 Experimentos com modelo animal	73
4.3.3 Coleta dos tecidos	75
4.3.4 Preparação dos tecidos coletados	75
4.3.5 Extração da GSH e GSSG	75
4.3.6 Extração da MnTE-2-PyP ⁵⁺ dos tecidos	76
a) Músculo e tumor	76
b) Fígado	76
4.3.7 Extração da MnTBAP ³⁻ dos tecidos	76
a) Músculo, fígado e tumor	76
4.3.8 Metodologia de análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS/MS)	77
a) Análise dos níveis de GSH e GSSG	77
b) Análise dos níveis de MnP	78
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
4.5 CONCLUSÕES	92
CAPÍTULO 5: MnTE-2-PyPCL₅ como potencial promotor de crescimento e atenuador de estresse salino em plantas de sorgo sacarino [<i>sorghum bicolor</i> (L.) Moench] cultivado em meio hidropônico com perlita	93
5.1 INTRODUÇÃO	93
5.2 OBJETIVOS	95
5.3 PARTE EXPERIMENTAL	96
5.3.1 Materiais	96
5.3.2 Padronização de substrato areia e perlita e capacidade de retenção de água	96
5.3.3 Testes de adsorção e dessorção da MnTE-2-PyPCL ₅ nos substratos areia e perlita	97
5.3.4 Esterilização da solução aquosa de MnTE-2-PyPCL ₅	97
5.3.5 Experimento de cultivo	97

5.3.5.1 Testes dos níveis de nitrogênio (NO_3^- e NH_4^+): Experimento I	97
5.3.5.2 Testes dos níveis de Salinidade (Experimento II, III e IV)	99
5.3.5.3 Testes dos níveis de MnTE-2-PyPCl ₅ (Experimento V)	99
5.3.6 Equipamentos	100
5.3.7 Análise estatística	100
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
5.4.1 Experimentos para desenvolvimento de modelo vegetal de cultivo do sorgo sacarino - substrato areia: efeito de nitrogênio e salinidade	101
5.4.2 Mudança de substrato: testes de adsorção/dessorção e padronização da perlita	105
5.4.3 Experimento de cultivo do sorgo sacarino: efeito da MnTE-2-PyPCl ₅ no desenvolvimento do sorgo sacarino em condições normais e sob estresse salino	106
5.5 CONCLUSÕES	110
CAPÍTULO 6: Perspectivas	111
REFERÊNCIAS	113
APÊNDICE A	125
APÊNDICE B	133
APÊNDICE C	134
APÊNDICE D	135

RESUMO

As 2-*N*-alquilpiridilporfirinas de Mn(III) são compostos redox ativos que podem interagir com diferentes espécies reativas e agentes redutores presentes no meio biológico. Esses compostos de coordenação têm se destacado na catálise biomimética e como agentes terapêuticos moduladores redox em diversas doenças e sistemas de interesse biotecnológico associados ao estresse oxidativo. Nesta tese foram desenvolvidos quatro estudos independentes tendo como eixo central as 2-*N*-alquilpiridilporfirinas de Mn(III) como catalisadores biomiméticos e agentes terapêuticos redox ativos; o uso de Mn-porfirinas em modelo vegetal de estresse salino é descrito pela primeira vez. Inicialmente, foi investigada uma rota alternativa para a obtenção de duas Mn-porfirinas, *meso*-tetraquis(*N*-etilpiridínio-2-il)porfinatomanganês(III) (MnTE-2-PyPCL₅) e *meso*-tetraquis(*N*-*n*-hexilpiridínio-2-il)porfinatomanganês(III) (MnTnHex-2-PyPCL₅), tendo a *meso*-tetraquis(2-piridil)porfinatomanganês(III) (MnT-2-PyPCL) como intermediário. Foi desenvolvida uma nova metodologia para a síntese da MnT-2-PyPCL, utilizando meio aquoso ácido e um método de purificação sem uso de solventes orgânicos. Foi avaliado o potencial de desenvolvimento da MnTE-2-PyP⁵⁺ e de uma série de outros compostos redox ativos para oxidação de tióis como modelos biomiméticos das enzimas tiol peroxidase e oxidase. A MnTE-2-PyP⁵⁺ apresentou as maiores velocidades na oxidação da glutatona e de outros tióis e estudos espectrofotométricos e eletroquímicos das reações evidenciaram a participação do O₂ no sistema. Adicionalmente, para explorar a ação das 2-*N*-alquilpiridilporfirinas de Mn(III) em modelos *in vivo* associados ao estresse oxidativo, foram realizados estudos em modelos animal e vegetal. Foi estudado, em modelo de câncer de mama em camundongos Balb/C, o uso combinado de MnPs com outros tratamentos antitumoral, como quimioterapia com ascorbato (Asc) e radioterapia (RT), utilizando três MnPs com características distintas: MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺, MnTE-2-PyP⁵⁺ e MnTBAP³⁻. Além disso, foi analisada a bioacumulação em tecidos de tumor, músculo e fígado utilizando a técnica de LC-MS/MS. As MnPs catiônicas foram muito eficientes em potencializar os efeitos dos tratamentos de Asc+RT na diminuição do crescimento do tumor, com inibição tumoral de ~73% em relação ao controle. Os resultados semelhantes destas MnPs são justificados pelas propriedades redox e reatividades similares e acúmulo no tecido-alvo (tumor) na mesma ordem de magnitude. Foi realizada pela primeira vez o estudo de bioacumulação da MnTBAP³⁻ utilizando a técnica de LC-MS/MS. Embora a MnP aniônica não tenha apresentado efeito terapêutico no modelo estudado, ela apresentou bioacumulação ~20 vezes superior ao das MnPs catiônicas no tumor. Por fim, visando ampliar os estudos de MnPs em modelos *in vivo*, foi desenvolvido um modelo vegetal de cultivo em laboratório para o sorgo sacarino [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] variedade *Wray*, sob estresse salino, em meio hidropônico. Estudaram-se os efeitos de variados níveis de MnTE-2-PyPCL₅ no desenvolvimento inicial planta sob estresse salino (100 mmol L⁻¹ de NaCl) e sem estresse salino (8 mmol L⁻¹ de NaCl), avaliando-se parâmetros como altura da planta, biomassa e massa seca. Dentre as concentrações de MnP testadas (0-100 µmol L⁻¹), a análise de variância apontou para efeitos significativos com impacto positivo na altura para o tratamento de 10 µmol L⁻¹ de MnTE-2-PyPCL₅ nas plantas sob estresse salino. As análises dos parâmetros de massa seca indicaram que a concentração de 100 µmol L⁻¹ da MnP limitaram o desenvolvimento do sorgo sacarino em ambos os níveis de salinidade, apontando para uma ligeira toxicidade da MnTE-2-PyPCL₅ a essa concentração. Esse estudo caracterizou-se como o primeiro de uso de moduladores redox à base de Mn-porfirinas para atenuação do efeito de estresse salino no crescimento de plantas.

Palavras Chave: porfirinas de Mn, atividade tiol (per)oxidase, radiosensibilização, sorgo sacarino, atenuador de estresse salino.

ABSTRACT

Mn(III) 2-*N*-alkylpyridylporphyrins are redox-active compounds that can react with different reactive species and reducing agents present in the biological milieu. These coordination compounds have been intensively studied as biomimetic catalysts and redox-active therapeutics in several diseases and systems of biotechnological interest associated with oxidative stress. In this thesis, four independent studies were carried out centered on exploring the Mn(III) 2-*N*-alkylpyridylporphyrins as biomimetic catalysts and redox-active therapeutics; the use of Mn-porphyrins in a plant model of saline stress was described for the first time. Initially, an alternative route for obtaining two Mn(III) 2-*N*-alkylpyridylporphyrins, Mn(III) *meso*-tetrakis(*N*-ethylpyridinium-2-yl)porphyrin (MnTE-2-PyPCL₅) and Mn(III) *meso*-tetrakis(*N*-n-hexylpyridinium-2-yl)porphyrin (MnTnHex-2-PyPCL₅), was investigated using Mn(III) *meso*-tetrakis(2-pyridyl)porphyrin chloride (MnT-2-PyPCL) as intermediate. A new methodology for the synthesis of MnT-2-PyPCL in aqueous acidic medium was developed with purification with no organic solvents. The catalytic activity of MnTE-2-PyP⁵⁺ and a series of other redox-active compounds for thiol oxidation as biomimetic models of the thiol peroxidase and oxidase enzymes was evaluated. MnTE-2-PyP⁵⁺ presented the highest rates for the oxidation of glutathione and other thiols; additionally, spectrophotometric and electrochemical studies of the reactions showed the participation of O₂ in these systems. Furthermore, to explore the action of Mn(III) 2-*N*-alkylpyridylporphyrins in *in vivo* oxidative stress-related models, studies were carried in animal and plant models. The combined use of MnP with other antitumoral treatments, such as ascorbate (Asc) and radiotherapy (RT), was investigated in a Balb/C mice breast cancer model, using three distinct MnPs: MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺, MnTE-2-PyP⁵⁺ e MnTBAP³⁻. Additionally, bioaccumulation in tumor, muscle and liver tissues were analyzed by LC-MS/MS technique. The cationic MnPs were very efficient in enhancing the effects of Asc+RT treatments in reducing tumor growth, with tumor inhibition of ~73% in relation to the control. Similar results of these cationic MnPs are justified by their similar redox and reactivity properties and accumulation in the target tissue (tumor) in the same order of magnitude. For the first time a bioaccumulation study of MnTBAP³⁻ using the LC-MS/MS technique was performed. Although the anionic MnP did not present therapeutic effect in the studied model, it bioaccumulated in the tumor ~20-fold more than cationic MnPs did. Finally, in order to expand the studies of MnPs in *in vivo* models, a plant model of laboratory cultivation was developed for the Wray variety of sweet sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] under saline stress, in hydroponic medium. Effects of various levels of MnTE-2-PyPCL₅ on initial plant development under saline stress (100 mmol L⁻¹ of NaCl) and without saline stress (8 mmol L⁻¹ of NaCl) were studied, assessing parameters such as plant height, biomass, and dry mass. Among the MnP concentration range tested (0–100 μmol L⁻¹), the analysis of variance showed significant positive effects on plant height associated with treatment with 10 μmol L⁻¹ MnTE-2-PyPCL₅ in plants under salt stress. Analysis of dry mass parameters indicated that MnP at 100 μmol L⁻¹ concentration limited the development of sweet sorghum at both levels of salinity, pointing to a slight toxicity of MnTE-2-PyPCL₅ at high concentration. This study represented the first use of MnP-based redox modulators for attenuation plant growth associated with of saline stress.

Keywords: Mn porphyrins, thiol (per)oxidase activity, radiosensitization, sweet sorghum, attenuator of saline stress.

LISTA DE ABREVIATURAS

Asc: ascorbato

BPA: biomassa da parte aérea

BR: biomassa da raiz

BT: biomassa total

CCD: cromatografia em camada delgada

(CMn/CH₂P)_{inicial}: razão molar inicial entre Mn²⁺ e H₂T-2-PyP

Cys L-cisteína

DTT DL-ditiotreitol

GPx: glutational peroxidase

GR: glutational redutase

GSH: glutational na forma reduzida

GSSG: glutational na forma oxidada

H₂P porfirina base livre

MnP: Manganês porfirinas

MSPA: massa seca da parte aérea

MSR: massa seca da raiz

MST: massa seca total

NAC: N-acetil-L-cisteína

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NADP⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada

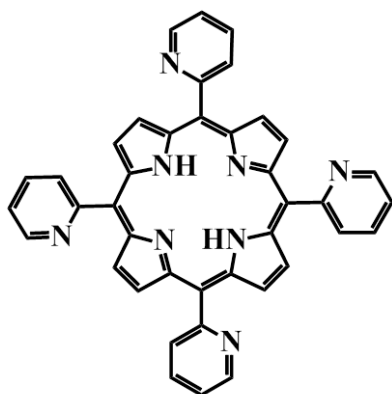
NHE: Eletrodo Normal de Hidrogênio

pNBT: *p*-nitrobenzenotiol

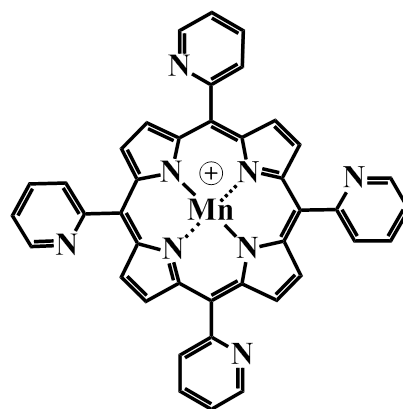
RT: radioterapia

SOD Enzimas Superóxido dismutase

LISTA DE ESTRUTURAS

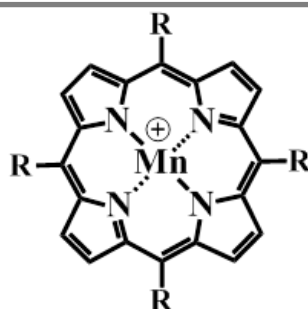


H₂T-2-PyP



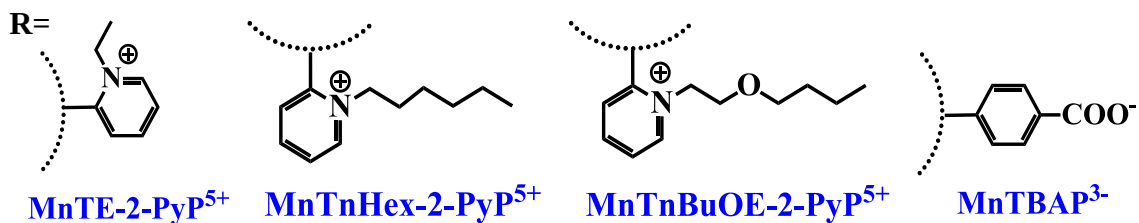
MnT-2-PyP⁺

OUTRAS PORFIRINAS

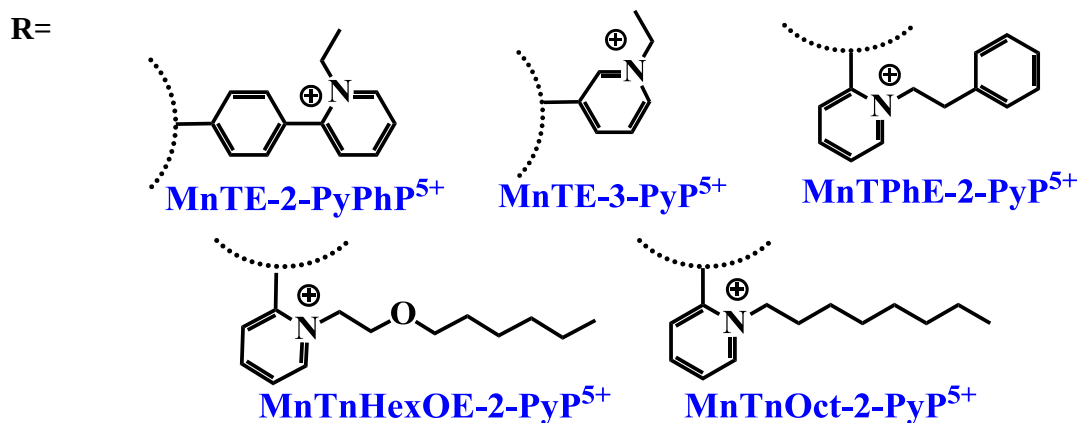


Estrutura base do macrociclo das Mn-porfirinas

MnPs mais utilizadas na tese



Outras MnPs utilizadas nos estudos de consumo de O₂ e com *t*-BuOOH (**Capítulo 3**)



LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Estrutura base do macrociclo das porfirinas (H_2P) e representação geral da síntese de uma metaloporfirina (MP).....	2
Figura 1.2 Espectros UV-VIS típicos de (A) porfirinas base livre e (B) Mn-porfirinas.....	3
Figura 1.3 Estrutura base do macrociclo porfirínico, com indicação das posições β -pirrólicas e <i>meso</i> , e exemplos importantes de Mn-porfirinas <i>meso</i> -substituídas da classe das 2- <i>N</i> -piridilporfirinas de Mn(III).....	4
Figura 2.1. Esquema geral de obtenção das Mn-porfirinas.....	9
Figura 2.2. Esquema da síntese de Mn-porfirinas pelo método de clorofórmio/metanol.....	10
Figura 2.3 Metodologia de síntese para a obtenção das <i>N</i> -alquilpiridinioporfirinas de Mn(III) pela rota clássica. R= alquil. Essa metodologia é empregada também na obtenção dos isômeros <i>meta</i> e <i>para</i> . (Batinić-Haberle <i>et al.</i> , 1998; 1999; 2002)	10
Figura 2.4 Esquema da rota de obtenção, desenvolvida por Pinto (2013), para a síntese da <i>N</i> -metilpiridinioporfirina de Mn(III) ($MnTM-2-PyP^{5+}$; R= Metil). Os outros dois isômeros $MnTM-3-PyP^{5+}$ e $MnTM-4-PyP^{5+}$ foram preparados de modo análogo (R= Metil)	11
Figura 2.5 Cubo tetraedro apresentando a localização dos 13 pontos experimentais para três fatores codificados (X_1 , X_2 , X_3) e sua representação em 2D.....	14
Figura 2.6 Esquema de síntese da porfirina $MnT-2-PyP^{Cl}$ em solvente aquoso.....	20
Figura 2.7 Esquema de síntese da $MnT_{alquil}-2-PyP^{Cl_5}$ (alquil ou R= Et ou <i>n</i> -Hex) a partir da $MnT-2-PyP^{Cl}$	22
Figura 2.8 Espectros de absorção eletrônico na região do UV-VIS de amostras-padrão de base livre $H_2T-2-PyP$ (formalmente, uma mistura das espécies $H_6T-2-PyP^{4+}$, $H_7T-2-PyP^{5+}$ e $H_8T-2-PyP^{6+}$ em meio ácido) e $MnT-2-PyP^+$ em HCl 0,1 mol L ⁻¹	26
Figura 2.9 Tempos necessário para formação de 50% da $MnT-2-PyP^+$ (t_{50}), em minutos, obtidos do planejamento de Doehlert. NR significa experimento não realizado; * refere-se a média dos tempos das replicatas do experimento I (para Ia, Ib e Ic foram 73, 67 e 61 minutos, respectivamente).....	27
Figura 2.10 Superfície de resposta de t_{50} em função da temperatura vs $(C_{H_2P}/C_{Mn})_{inicial}$ na concentração de ácido sulfúrico de 95 mmol L ⁻¹	30

Figura 2.11 Rotas para obtenção de 2- <i>N</i> -alquilpiridinioporfirinas de Mn(III): a clássica (Rota A) e a alternativa, realizada neste trabalho (Rota B).....	34
Figura 3.1 Ciclo catalítico da enzima glutathione peroxidase (GPx) (adaptado de Muges <i>et al.</i> , 2001).....	40
Figura 3.2 Ciclo redox da glutathione: interconversão entre suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação enzimática da glutathione peroxidase (GPx), glutathione oxidase (GO) e glutathione reductase (GR). ROOH refere-se a um peróxido orgânico ou H ₂ O ₂ e ROH refere-se ao respectivo álcool ou H ₂ O, caso R=H (adaptado de Rover Júnior <i>et al.</i> , 2001).....	41
Figura 3.3 Estrutura das Mn-porfirinas <i>meso</i> -substituídas estudadas como mimico da Glutathione peroxidase.....	43
Figura 3.4 Estrutura de compostos redox-ativos comumente usados como modelos de SOD ou mimicos de glutathione peroxidase (GPx).....	44
Figura 3.5 Estrutura dos tióis utilizados nesse capítulo em estudo da reatividade da MnTE-2-PyP ⁵⁺ com diversos tióis em modelo tiol peroxidase/ oxidase.....	44
Figura 3.6 Estudos espectrofotométricos da oxidação da glutathione catalisada pela MnTE-2-PyP ⁵⁺ : Acompanhamento do decaimento da absorbância do NADPH (340 nm) ao longo do tempo, utilizando concentrações de MnP variando de 0 a 10 µmol L ⁻¹ . Em destaque as curvas normalizadas pelos seus valores máximos.....	51
Figura 3.7 Estudos espectrofotométricos da oxidação da glutathione catalisada pela MnTE-2-PyP ⁵⁺ e sua dependência com o pH: Velocidades iniciais de oxidação do NADPH em diferentes valores de pH. Experimentos realizados em duplicata.....	52
Figura 3.8 Esquema da análise eletroquímica dos níveis de oxigênio no sistema H ₂ O ₂ /MnP/GSH, sob condições iniciais anaeróbicas: situação a) predominância da atividade catalase sobre a atividade glutathione peroxidase; situação b) predominância da atividade glutathione peroxidase sobre a atividade catalase.....	53
Figura 3.9 Análise eletroquímica dos níveis de oxigênio no sistema H ₂ O ₂ /MnP/GSH, sob condições iniciais anaeróbicas: predominância da atividade glutathione (per)oxidase sobre a atividade catalase. Experimento realizado em pH 7,4, tampão tris, 25 ± 1°C. As concentrações foram ajustadas conforme o modelo catalase (Tovmasyan <i>et al.</i> , 2015): H ₂ O ₂ = 1 mol L ⁻¹ ; GSH = 2 mmol L ⁻¹ ; MnTE-2-PyP ⁵⁺ = 20 µmol L ⁻¹	54

Figura 3.10 Monitoramento eletroquímico do consumo de oxigênio em modelo de glutathione (per)oxidase em meio aeróbio neutro (pH 7,4). Experimentos realizados em tampão Tris, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, nas concentrações: $\text{H}_2\text{O}_2 = 0,5 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{GSH} = 1 \text{ mmol L}^{-1}$; $\text{MnTE-2-PyP}^{5+} = 10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$	55
Figura 3.11 Monitoramento eletroquímico do consumo de oxigênio em modelo de glutathione oxidase em meio aeróbio neutro (pH 7,4). Experimentos realizados em tampão Tris, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, nas concentrações: $\text{GSH} = 1 \text{ mmol L}^{-1}$; $\text{MnTE-2-PyP}^{5+} = 10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$	56
Figura 3.12 Monitoramento eletroquímico do consumo de oxigênio em modelo de tiol oxidase e glutathione peroxidase em meio aeróbio e pH ácido (4,2). Experimentos realizados em tampão tris, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, nas concentrações: $\text{H}_2\text{O}_2 = 0,5 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{GSH} = 1 \text{ mmol L}^{-1}$; $\text{MnTE-2-PyP}^{5+} = 10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$	57
Figura 3.13 Acompanhamento espectral da MnTE-2-PyP^{5+} em modelo A) catalase e B) GPx. Primeiro foi adicionada MnP e o primeiro espectro foi registrado. Em modelo GPx adicionou-se GSH e registrou-se outro espectro. Após a adição de H_2O_2 aos sistemas os espectros foram registrados de 1 em 1 minuto até completar 30 minutos. Experimentos realizados em pH 7,4, em tampão Tris, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, nas concentrações: $\text{H}_2\text{O}_2 = 0,5 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{GSH} = 1 \text{ mmol L}^{-1}$; $\text{MnTE-2-PyP}^{5+} = 10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$	58
Figura 3.14 Acompanhamento espectral da MnTE-2-PyP^{5+} em modelo GPx ($\text{GSH}/\text{MnTE-2-PyP}^{5+}/\text{H}_2\text{O}_2$) em meio aeróbio e ácido (pH 4,2). Primeiro foi adicionada MnP ao tampão Tris e registrado o primeiro espectro, depois adicionou-se GSH e registrou-se outro espectro, após a adição de H_2O_2 os espectros foram registrados de 1 em 1 minuto até completar 30 minutos. Experimento realizado em tampão Tris, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, nas concentrações: $\text{H}_2\text{O}_2 = 0,5 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{GSH} = 1 \text{ mmol L}^{-1}$; $\text{MnTE-2-PyP}^{5+} = 10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$	59
Figura 3.15 Acompanhamento espectral da MnTE-2-PyP^{5+} em modelo GPx ($\text{GSH}/\text{MnTE-2-PyP}^{5+}/\text{H}_2\text{O}_2$) em meio inicial anaeróbio e pH 7,4. Foram adicionados ao tampão a MnP, GSH e H_2O_2 e os espectros foram registrados de 1 em 1 minuto por 30 minutos. A linha tracejada da MnP foi inserida a título de comparação. Experimento realizado em tampão Tris, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, nas concentrações: $\text{H}_2\text{O}_2 = 0,5 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{GSH} = 1 \text{ mmol L}^{-1}$; $\text{MnTE-2-PyP}^{5+} = 10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$	60
Figura 3.16 Esquema do ciclo proposto para as possíveis interações no modelo glutathione (per)oxidase, sendo MnP como mímico. Em destaque, os pares mais sensíveis à presença do oxigênio.....	60

Figura 3.17 Atividade de glutatona peroxidase em relação ao potencial de redução Mn^{3+}/Mn^{2+} para as MnPs estudadas. 1: MnTBAP³⁻; 2: MnTE-2-PyPhP⁵⁺; 3: MnTE-3-PyP⁵⁺; 4: MnTnHex-3-PyP⁵⁺; 5: MnTnHex-4-PyP⁵⁺; 6: MnTE-4-PyP⁵⁺; 7: MnTnOct-3-PyP⁵⁺; 8: MnTE-2-PyP⁵⁺; 9: MnTPhE-2-PyP⁵⁺; 10: MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺; 11: MnTnHexOE-2-PyP⁵⁺; 12: MnTnHex-2-PyP⁵⁺; 13: MnTnOct-2-PyP⁵⁺; 14: MnTDE-2-ImP⁵⁺ 62

Figura 3.18. Consumo de oxigênio em sistema GSH/H₂O₂/MnP por MnPs com diferentes características. Experimentos realizados em pH 7,4 em tampão Tris. As cargas das porfirinas estão omitidas na figura, para a MnTBAP a carga é 3- e as demais MnPs apresentam carga 5+ 63

Figura 3.19 Atividade catalítica dos compostos redox-ativos na oxidação da glutatona com diferentes peróxidos avaliada espectrofotometricamente *via* determinação das velocidades iniciais da oxidação do NADPH. As cargas das porfirinas estão omitidas na figura, para a MnTBAP a carga é 3- e as demais apresentam carga 5+..... 64

Figura 3.20 Velocidades de consumo de oxigênio ($v_0(O_2)_{cons}$) em sistema utilizando MnTE-2-PyP⁵⁺ para catalisar a oxidação da glutatona com H₂O₂ ou *t*-BuOOH, avaliado eletroquimicamente *via* análises do nível de oxigênio em meio aeróbio..... 65

Figura 3.21 Análise das velocidades de consumo de oxigênio em sistema contendo MnTE-2-PyP⁵⁺ como catalisador e diferentes tióis como substrato, na ausência (barra azul) e presença de peróxido de hidrogênio (barra laranja)..... 66

Figura 4.1 Estrutura das Mn porfirinas utilizadas nos estudos *in vivo*..... 72

Figura 4.2. Design dos experimentos em modelo animal de câncer de mama em camundongos Balb/C. A administração de Mn-porfirina (MnP) foi pela *via* subcutânea (sc), com doses de 0,2 mg/kg/dia (**Experimento III**) ou 2 mg/kg/dia (**Experimento I e II**) e de ascorbato (Asc) foi *via* intraperitoneal (ip). RT: radiação (adaptado de Tovmasyan *et al.*, 2018)..... 74

Figura 4.3 Curva de crescimento do tumor em relação aos dias de tratamento: **Experimento I** – Estudo dos efeitos combinados de MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺/Asc/RT, com doses de 2 mg/kg/dia de MnP. Sendo, RT: radiação; MnBuOE: MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺; Asc: ascorbato..... 80

Figura 4.4 Inibição tumoral em relação ao tratamento controle, ao término do experimento (14º dia): **Experimento I** – Estudo dos efeitos combinados de MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺/Asc/RT, com doses de 2 mg/kg/dia de MnP. Sendo, RT: radiação; MnBuOE: MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺; Asc: ascorbato..... 81

Figura 4.5 Curva de crescimento do tumor em relação aos dias de tratamento: Experimento II – Estudo dos efeitos combinados de MnP/Asc/RT, com doses de 2 mg/kg/dia de MnTE-2-PyP ⁵⁺ . MnE: MnTE-2-PyP ⁵⁺ , Asc: ascorbato, RT: radiação.....	82
Figura 4.6 Inibição tumoral em relação ao tratamento controle, ao término do experimento (13º dia): Experimento II – Estudo dos efeitos combinados de MnP/Asc/RT, com doses de 2 mg/kg/dia de MnP. Sendo, MnTBAP ³⁻ ou MnTE-2-PyP ⁵⁺ como MnP. MnTBAP: MnTBAP ³⁻ , MnE: MnTE-2-PyP ⁵⁺ , Asc: ascorbato, RT: radiação.....	82
Figura 4.7 Curva de crescimento do tumor em relação aos dias de tratamento: Experimento II – Estudo dos efeitos combinados de MnP/Asc/RT, com doses de 2 mg/kg/dia de MnP. MnTBAP ³⁻ como MnP. MnTBAP: MnTBAP ³⁻ , Asc: ascorbato, RT: radiação.....	83
Figura 4.8 Curva de crescimento do tumor em relação aos dias de tratamento: Experimento III – Estudo dos efeitos combinados de MnTnBuOE-2-PyP ⁵⁺ /Asc/RT, com doses de 0,2 mg/kg/dia de MnP. MnBuOE: MnTnBuOE-2-PyP ⁵⁺ , Asc: ascorbato, RT: radiação.....	84
Figura 4.9 Inibição tumoral em relação ao tratamento controle, ao término do experimento (13º dia): Experimento I – Estudo dos efeitos combinados de MnTnBuOE-2-PyP ⁵⁺ /Asc/RT, com doses de 0,2 mg/kg/dia de MnP. Sendo, RT: radiação; MnBuOE: MnTnBuOE-2-PyP ⁵⁺ ; Asc: ascorbato.....	84
Figura 4.10 Efeito na razão GSSG/GSH nos tecidos coletados do Experimento II: A) tumor; B) fígado; C) músculo. MnE: MnTE-2-PyP ⁵⁺ , Asc: ascorbato, RT: radiação.....	87
Figura 4.11 Acumulação de Mn-porfirinas nos tecidos de camundongos para os Experimentos I e II . Doses de MnP: 2 mg/kg/dia. Os dados de bioacumulação da MnTnBuOE-2-PyP ⁵⁺ estão expostas a título de comparação, os dados foram obtidos anteriormente pelo grupo (Tovmasyan <i>et al.</i> , 2018). Sendo MnE a MnTE-2-PyP ⁵⁺ , MnBuOE a MnTnBuOE-2-PyP ⁵⁺ e MnTBAP a MnTBAP ³⁻	89
Figura 4.12 Acumulação de Mn-porfirinas em fígado de camundongos submetidos a diferentes tratamentos. Dose diária de MnP: 2 mg/kg/dia. Os dados da MnTnBuOE-2-PyP ⁵⁺ estão expostas a título de comparação, os dados foram obtidos anteriormente pelo grupo (Tovmasyan <i>et al.</i> , 2018).....	90

Figura 4.13 Acumulação de Mn-porfirinas em tecido muscular de camundongos submetidos a diferentes tratamentos. Dose diária de MnP: 2 mg/kg/dia. Os dados da MnTnBuOE-2-PyP ⁵⁺ estão expostas a título de comparação, os dados foram obtidos anteriormente pelo grupo (Tovmasyan <i>et al.</i> , 2018).....	91
Figura 4.14 Acumulação de Mn-porfirinas em tumor de camundongos submetidos a diferentes tratamentos. Dose diária de MnP: 2 mg/kg/dia. Os dados da MnTnBuOE-2-PyP ⁵⁺ estão expostas a título de comparação, os dados foram obtidos anteriormente pelo grupo (Tovmasyan <i>et al.</i> , 2018).....	91
Figura 5.1 Esquema dos potes de cultivo utilizados nos Experimentos I-IV . As letras a e b se referem aos furos nas tampas sobre as covas nos quais as sementes foram plantadas e pelos quais as plântulas emergiram. A letra c se refere ao furo na tampa no qual foi realizada a reposição de água evapotranspirada.....	98
Figura 5.2 Desenho do experimento V realizado em esquema fatorial 2x4, com dois níveis de salinidade (S0= 8 mmol L ⁻¹ ; S1= 100 mmol L ⁻¹ de NaCl) e quatro níveis de MnTE-2-PyPCL ₅ (E0= 0 µmol L ⁻¹ ; E1= 1 µmol L ⁻¹ ; E2= 10 µmol L ⁻¹ ; E3= 100 µmol L ⁻¹), em quadruplicata.....	99
Figura 5.3 Biomassa do sorgo sacarino (<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench), cultivado 14 dias, sob sistema hidropônico, substrato areia, com variados níveis de nitrogênio e salinidade: Efeitos do nitrogênio e salinidade. Níveis de salinidade: S1= 0,8 mmol L ⁻¹ e S2= 75 mmol L ⁻¹ de NaCl. Níveis de nitrogênio: N0= 4 mmol L ⁻¹ ; N1= 16 mmol L ⁻¹ . As médias (n=4) com letras maiúsculas distintas diferem quanto aos níveis de NaCl e as letras minúsculas distintas diferem quanto aos níveis de nitrogênio pelo teste de Tukey (p<0,05).....	102
Figura 5.4 Teste de salinidade – Desenvolvimento do <i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench, variedade Wray, uma semana após a germinação em diferentes níveis de NaCl: 8, 80, 120, 160, 200 e 240 mmol L ⁻¹ (da esquerda para direita), cultivado sob sistema hidropônico com areia em câmara de crescimento.....	104
Figura 5.5 Altura do sorgo sacarino (<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench), cultivado 16 dias, sob sistema hidropônico, substrato perlita, na dependência do nível de NaCl e MnTE-2-PyPCL ₅ : S0= 8 mmol L ⁻¹ e S1= 100 mmol L ⁻¹ de NaCl. Níveis de MnTE-2-PyPCL ₅ : E0= 0 µmol L ⁻¹ ; E1= 1 µmol L ⁻¹ ; E2= 10 µmol L ⁻¹ ; E3= 100 µmol L ⁻¹ . As médias (n=4) com letras maiúsculas distintas diferem quanto aos níveis de NaCl e as letras minúsculas distintas diferem quanto aos níveis de MnTE-2-PyPCL ₅ pelo teste de Duncan (p<0,05).....	107

Figura 5.6 Produção de matéria seca no sorgo sacarino (<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench), cultivado 16 dias, sob sistema hidropônico, substrato perlita, na dependência do nível de NaCl e MnTE-2-PyPCl ₅ : S0= 8 mmol L ⁻¹ e S1= 100 mmol L ⁻¹ de NaCl. Níveis de MnTE-2-PyPCl ₅ : E0= 0 μmol L ⁻¹ ; E1= 1 μmol L ⁻¹ ; E2= 10 μmol L ⁻¹ ; E3= 100 μmol L ⁻¹ . A) Massa seca da raiz; B) Massa Seca Total. As médias (n=4) com letras maiúsculas distintas diferem quanto aos níveis de NaCl e as letras minúsculas distintas diferem quanto aos níveis de MnTE-2-PyPCl ₅ pelo teste de Duncan (p<0,05).....	108
Figura A.1 Curva cinética da formação da MnT-2-PyP ⁺ para o Experimento Ia do planejamento de Doehlert.....	125
Figura A.2 Curva cinética da formação da MnT-2-PyP ⁺ para o Experimento Ib do planejamento de Doehlert.....	125
Figura A.3 Curva cinética da formação da MnT-2-PyP ⁺ para o Experimento Ic do planejamento de Doehlert.....	126
Figura A.4 Curva cinética da formação da MnT-2-PyP ⁺ para o Experimento II do planejamento de Doehlert.....	126
Figura A.5 Curva cinética da formação da MnT-2-PyP ⁺ para o Experimento III do planejamento de Doehlert.....	127
Figura A.6 Curva cinética da formação da MnT-2-PyP ⁺ para o Experimento V do planejamento de Doehlert.....	127
Figura A.7 Curva cinética da formação da MnT-2-PyP ⁺ para o Experimento VI do planejamento de Doehlert.....	128
Figura A.8 Curva cinética da formação da MnT-2-PyP ⁺ para o Experimento VII do planejamento de Doehlert.....	128
Figura A.9 Curva cinética da formação da MnT-2-PyP ⁺ para o Experimento VIII do planejamento de Doehlert.....	129
Figura A.10 Curva cinética da formação da MnT-2-PyP ⁺ para o Experimento X do planejamento de Doehlert.....	129
Figura A.11 Curva cinética da formação da MnT-2-PyP ⁺ para o Experimento XI do planejamento de Doehlert.....	130

Figura A.12 Curva cinética da formação da MnT-2-PyP ⁺ para o Experimento XII do planejamento de Doehlert.....	130
Figura A.13 Curva cinética da formação da MnT-2-PyP ⁺ para o Experimento XIII do planejamento de Doehlert.....	131
Figura A.14 Curva cinética da formação da MnT-2-PyP ⁺ para o Experimento E1	131
Figura A.15 Curva cinética da formação da MnT-2-PyP ⁺ para o Experimento E2	132
Figura C.1 Gráfico de correlação entre a resposta predita pela equação do modelo ajustado nas condições experimentais do planejamento de Doehlert e a resposta experimental (t_{50}).....	134
Figura C.2 Distribuição dos resíduos em função dos valores da resposta predita pela equação do modelo ajustado nas condições experimentais do planejamento de Doehlert.....	134
Figura D.1 Espectro de absorção (normalizado) da MnT-2-PyP ⁺ em H ₂ O.....	135
Figura D.2 Espectro de absorção (normalizado) da MnTE-2-PyP ⁵⁺ em H ₂ O.....	135
Figura D.3 Espectro de absorção (normalizado) da MnTnHex-2-PyP ⁵⁺ em H ₂ O.....	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Fatores, número de níveis e domínio experimental do planejamento de Doehlert desenvolvido para o estudo da síntese da MnT-2-PyP ⁺ em meio aquoso ácido..	16
Tabela 2.2 Matriz experimental proposta para otimização da síntese da MnT-2-PyP ⁺ usando planejamento de Doehlert de 3 fatores (entre parênteses estão os valores codificados para os fatores).....	17
Tabela 2.3 Volumes utilizados para preparo das soluções s1-s5, bem como as respectivas concentrações finais de H ₂ T-2-PyP e H ₂ SO ₄ . Os volumes finais das soluções foram aferidos com água destilada.....	18
Tabela 2.4 Soluções-estoque utilizadas para cada experimento quimiométrico.....	18
Tabela 2.5 Condições para os experimentos extras e soluções-estoque utilizadas.....	20
Tabela 2.6 Coeficientes do modelo global obtidos para t ₅₀ como resposta, sendo EP o erro-padrão.....	28
Tabela 2.7 Coeficientes do modelo ajustado obtidos para t ₅₀ como resposta, sendo EP o erro-padrão. Todos os valores foram significativos (p < 0,05).....	29
Tabela 2.8 Condições experimentais, tempo necessário para formação de 50% da MnT-2-PyP ⁺ (t ₅₀), em minutos, obtido experimentalmente e previsto (por extrapolação) a partir do modelo ajustado do planejamento de Doehlert.....	31
Tabela 2.9 Dados dos espectros eletrônico na região do UV-VIS em H ₂ O da MnT-2-PyP ⁺ e da série de N-alkilpiridinioporfirinas de Mn(III): comparativo entre as porfirinas sintetizadas e as reportadas na literatura.....	36
Tabela 3.1. Atividade catalítica de compostos redox-ativos para a oxidação da glutathione em modelo Glutathione peroxidase (GPx) avaliada espectrofotometricamente indiretamente via determinação das velocidades iniciais da oxidação do NADPH, v ₀ (NADPH) _{ox}	61
Tabela 4.1. Distribuição dos grupos de tratamento e doses diárias de MnP utilizados nos experimentos em modelo animal de câncer de mama.....	74
Tabela 4.2 Propriedades físico-químicas das Mn(III)-porfirinas estudadas.....	79
Tabela 5.1 Altura e massa seca da parte aérea do sorgo sacarino (<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench), variedade Wray, cultivado 14 dias, sob sistema hidropônico com areia, com variados níveis de salinidade.....	102
Tabela 5.2 Desempenho do sorgo sacarino (<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench), variedade Wray, cultivado 11 dias, sob sistema hidropônico com areia, na dependência do nível de NaCl.....	103

Tabela 5.3 Desempenho do sorgo sacarino (<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench), variedade Wray, cultivado 15 dias, sob sistema hidropônico com areia, na dependência do nível de NaCl.....	105
Tabela B.1 Tempo de formação de 50% da MnT-2-PyP ⁺ (t₅₀) obtida do planejamento de Doehlert.....	133

CAPÍTULO 1: Introdução Geral

As Mn-porfirinas (MnPs) catiônicas derivadas da 2-*N*-alquilpiridilporfirinas fazem parte de uma classe de metaloporfirinas de interesse biotecnológico, uma vez que são poderosos compostos redox-ativos, sendo utilizados em catálise biomimética e como agentes terapêuticos (Batinić-Haberle *et al.*, 2016a; Pinto *et al.*, 2016). Dentre os campos com interesse nessa classe de MnPs, destaca-se o terapêutico, no qual as Mn-porfirinas *meso*-tetraquis(*N*-etilpiridínio-2-il)porfinatomanganês(III) (MnTE-2-PyP⁵⁺) e *meso*-tetraquis(*N*-butoxietilpiridínio-2-il)porfinatomanganês(III) (MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺), encontram-se em testes clínicos (fases I e/ou I/II) em humanos no Canadá e EUA (Batinić-Haberle *et al.*, 2018).

Essas MnPs catiônicas apresentam potenciais de redução Mn(III)/Mn(II) compatíveis para a reação com vários compostos celulares; além disso, as cargas positivas dos grupos *N*-alquilpiridínios permitem a atração eletrostática com compostos aniônicos. Essas propriedades físico-químicas associadas ao meio biológico rico em espécies reativas possibilitam reações diversas dentro do organismo, o que permite a aplicação dessa classe de porfirinas em diferentes modelos associados ao estresse oxidativo.

Com isso, para que os estudos evoluam dos experimentos em modelo animal para testes clínicos ou aplicações em sistemas de interesse biotecnológico, é necessário o desenvolvimento de rotas eficientes para obtenção das 2-*N*-alquilpiridilporfirinas de Mn(III) com menor impacto ambiental e menores custos.

1.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1.1 Aspectos gerais de porfirinas e metaloporfirinas

Porfirinas são compostos macrocíclicos, aromáticos, altamente conjugados cuja base estrutural é formada por 4 anéis pirrólicos unidos por átomos de carbono sp² (**Fig. 1.1**). São parte integrante de várias biomoléculas, como a hemoglobina, mioglobina e citocromos P450 (Wijeskera; Dolphin, 1994, Milgrom, 1997).

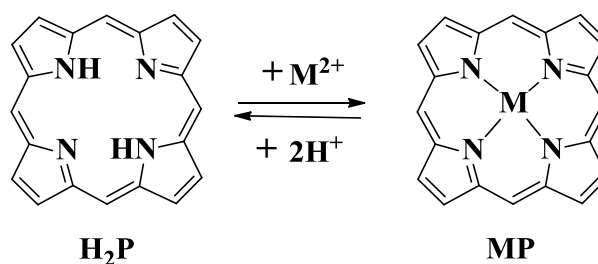
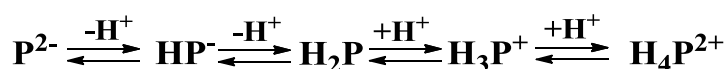


Figura 1.1 Estrutura base do macrociclo das porfirinas (H_2P) e representação geral da síntese de uma metaloporfirina (MP).

Os átomos de nitrogênio do macrociclo porfirínico possuem pares de elétrons não ligantes que podem atuar como bases de Lewis, por isso a denominação de “base livre” (H_2P) quando nenhum centro metálico está coordenado à porfirina. Quando há a coordenação de íon metálico ao centro da porfirina, tem-se a formação da denominada metaloporfirina (MP). Além da possibilidade de complexação metálica, a presença desses pares de elétrons no macrociclo tornam as H_2P sensíveis ao pH do meio. A desprotonação da base livre leva à formação das espécies diânionicas (P^{2-}) e monoânionicas (HP^-); já a presença de ácidos fortes pode gerar espécies monocatiônicas (H_3P^+) ou dicatiônicas (H_4P^{2+}).



As bandas de absorção eletrônica das porfirinas são atribuídas às transições $\pi-\pi^*$ do macrociclo porfirínico. O espectro típico de qualquer porfirina apresenta uma banda de alta intensidade, denominada de banda Soret ($\epsilon \sim 10^5 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) próximo a 400 nm (**Fig. 1.2**).

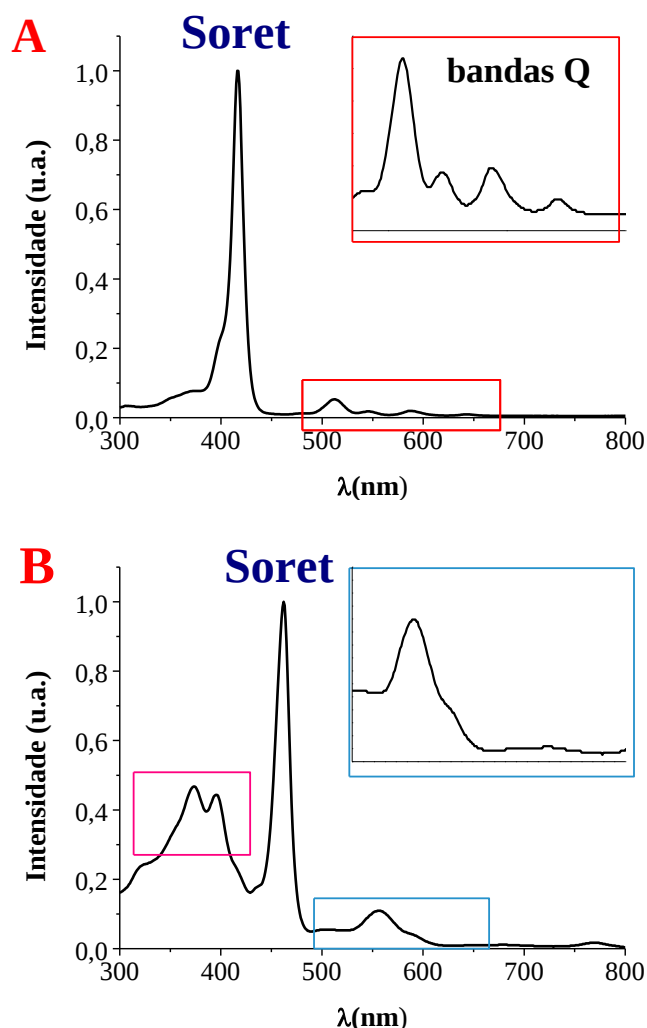


Figura 1.2 Espectros UV-VIS típicos de (A) porfirinas base livre e (B) Mn-porfirinas.

O espectro da porfirina base livre apresenta, adicionalmente, mais quatro bandas de menor intensidade ($\epsilon \sim 10^4 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) na região de 450 a 800 nm (bandas Q) – **Fig. 1.2A**. Já o espectro de uma metaloporfirinas geralmente apresenta apenas duas bandas (α e β) de baixa intensidade ($\epsilon \sim 10^3 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) na região de 500 a 800 nm, – **Fig. 1.2B**. Essa redução no número de bandas nessa região ocorre devido ao aumento de simetria local (D_{2h} para D_{4h}) da metaloporfirina em comparação à base livre. Como as espécies de porfirina base livre diânionica e dicatiônica também apresentam aumento de simetria da molécula, seus espectros na região de 500 a 800 nm se assemelham àqueles das metaloporfirinas. As Mn-porfirinas (MnPs), além das três bandas típicas de MPs (Soret, α e β) apresentam um conjunto de bandas na região de 300 a 400 nm, resultantes da transferência de carga ligante-metal (TCLM) – **Fig. 1.2B**.

Por apresentarem grandes diferenças entre os espectros de absorção entre as espécies base livre e metalada, o acompanhamento das reações de metalação é comumente realizado por espectroscopia de absorção na região do UV-Visível (UV-VIS).

1.1.2 2-*N*-piridilporfirinas de Mn(III)

As porfirinas, além de serem ligantes que geram complexos metálicos altamente estáveis quanto à desmetalção (prevenindo a perda de metais para o meio), também apresentam uma grande diversidade estrutural a partir de substituições nas posições (β e *meso*) da estrutura base do macrociclo porfirínico (**Fig. 1.3**).

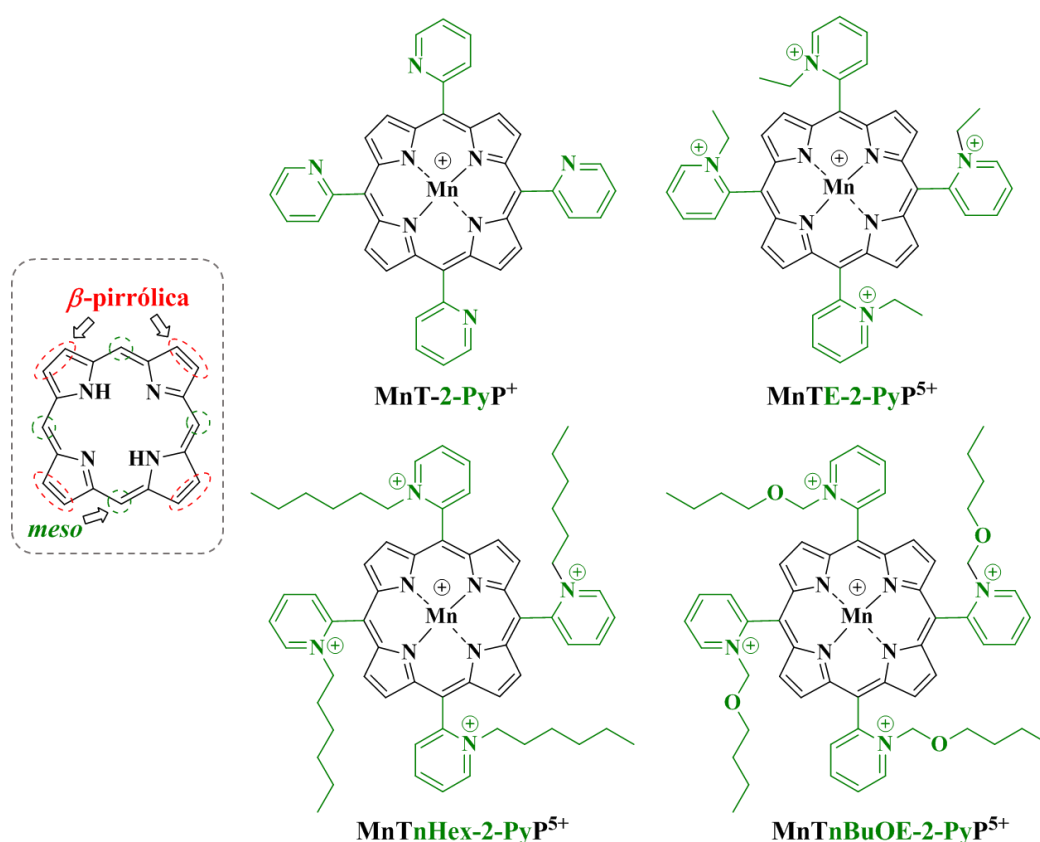


Figura 1.3 Estrutura base do macrociclo porfirínico, com indicação das posições β -pírrólicas e *meso*, e exemplos importantes de Mn-porfirinas *meso*-substituídas da classe das 2-*N*-piridilporfirinas de Mn(III).

As porfirinas naturais apresentam apenas substituintes nas posições β . Já as sintéticas podem ser modificadas em ambas as posições, de acordo com as propriedades desejadas para a aplicação dessas (solubilidade em água, lipofilia, propriedades redox, etc.). As porfirinas da classe da 2-*N*-piridilporfirinas de Mn(III) são porfirinas catiônicas *meso*-substituídas, que apresentam o grupo 2-piridila como substituinte na posição *meso* do anel porfirínico (**Fig. 1.3**). Modificações nos grupos 2-piridila *meso*-substituídos podem gerar características distintas entre os compostos; por exemplo, a *N*-alquilação de todos os 4 grupos piridilas da MnT-2-PyP⁺,

gera compostos pentacatiônicos com maior solubilidade em água e maior potencial de redução que a Mn-porfirina monocatiônica de origem. Além disso, as modificações adicionais como o aumento da cadeia alquílica podem conferir maior lipofilia à Mn-porfirina, como na comparação entre a MnTE-2-PyP⁵⁺ e a *meso*-tetraquis(*N*-*n*-hexilpiridínio-2-il)porfinatomangânês(III) (MnTnHex-2-PyP⁵⁺) (**Fig. 1.3**). Já a *N*-alcoxialquilação (cadeias alquila contendo um grupamento alquiléter) dos grupos piridilas pode diminuir a toxicidade da MnP para as aplicações *in vivo*, sem modificar a lipofilia do composto em relação à sua correspondente alquilada, como é o caso da MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺ em relação a MnTnHex-2-PyP⁵⁺ (**Fig. 1.3**) (Batinić-Haberle *et al.*, 2011a, 2011b, 2016a; Kos *et al.*, 2009a; Rajić *et al.*, 2012, 2017).

As Mn-porfirinas catiônicas derivadas da 2-*N*-piridilporfirinas fazem parte de uma classe de metaloporfirinas de interesse biotecnológico, por serem compostos redox-ativos com aplicabilidade em catálise química e biomimética (Meunier, 1992; Pinto *et al.*, 2016), e como agentes terapêuticos (Batinić-Haberle *et al.*, 2016a). As 2-*N*-alquilpiridínioporfirinas de Mn(III) são normalmente estudadas como agentes terapêuticos em doenças e estados patológicos associados com o estresse oxidativo, como processos inflamatórios, diabetes, câncer, acidente vascular cerebral, entre outros (Batinić-Haberle *et al.*, 2010, 2016a, 2018).

1.1.3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é caracterizado como um desequilíbrio entre a formação e a eliminação de espécies reativas impactando na homeostase celular, com o favorecimento de processos pró-oxidantes e danos oxidativos (Halliwell e Gutteridge, 2007; Kohen; Nyska, 2002). Os oxidantes são comumente as espécies reativas de oxigênio – tais como, radical superóxido (O₂^{•-}), radical hidroxila (•OH), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), oxigênio singleto (¹O₂) e ozônio (O₃) – e de nitrogênio – tais como, óxido nítrico (NO•) e o ânion peroxinitrito (ONOO⁻) –, que podem ser provenientes do próprio metabolismo celular (fontes endógenas) ou de fatores abióticos (fontes exógenas – exposição à radiação, comidas, drogas, xenobióticos, etc.) (Halliwell e Gutteridge, 2007; Kohen; Nyska, 2002).

Os antioxidantes são os responsáveis pelos mecanismos de defesa contra os danos causados pelas espécies reativas e esses moduladores redox podem ser enzimáticos (enzimas superóxido dismutase, catalase e peroxidase, por exemplo) ou não enzimáticos (α -tocoferol, β -caroteno, ascorbato, glutatona, etc.) (Augusto, 2006; Halliwell e Gutteridge, 2007; Kohen; Nyska, 2002).

No entanto, sob certas condições patológicas o arsenal antioxidante pode ser reduzido ou comprometido levando ao acúmulo de espécies reativas e às condições de estresse oxidativo, acarretando danos celulares, tais como peroxidação lipídica, degradação e inativação de proteínas e/ou modificação de bases do DNA. Esses danos celulares podem, consequentemente, contribuir ou agravar doenças degenerativas e o envelhecimento (Batinić-Haberle *et al.* 2010, 2011a, 2011b; Halliwell e Gutteridge, 2007; Kohen; Nyska, 2002).

O uso de agentes terapêuticos com propriedades redox, tais como as MnPs catiônicas, pode resultar na modulação redox do estresse oxidativo e, com isso, na manutenção ou restabelecimento da homeostase (Halliwell e Gutteridge, 2007). A ação antioxidante de MnPs catiônicas pode ocorrer através de inibição da formação de espécies reativas, interação com mecanismos de sinalização redox e/ou reação com espécies reativas gerando produtos menos tóxicos (Batinić-Haberle *et al.*, 2010, 2016^a, 2016b).

1.1.4 2-*N*-alquilpiridilporfirinas de Mn(III) em sistemas biológicos

As enzimas da família da Superóxido Dismutase (SOD) destacam-se como as principais enzimas do sistema de defesa antioxidante em células eucarióticas. Elas são responsáveis pela catálise do desproporcionamento (ou dismutação) do radical superóxido, acelerando em ~10.000 vezes essa dismutação (Batinić-Haberle *et al.*, 2010; Sheng *et al.*, 2014).

O desenvolvimento das porfirinas pentacatiônicas da classe das 2-*N*-piridilporfirinas de Mn(III) como mímicos de Superóxido Dismutase (SOD) foi baseado nas propriedades termodinâmicas e eletrostáticas dessas enzimas. Ajustes/modificações nas estruturas da porfirina foram realizadas para a obtenção de compostos que apresentassem atividade catalítica próxima a das SOD, $\log k_{\text{cat}}(\text{O}_2^{\cdot-}) \sim 9$: **i**) potencial redox próximo ao da enzima, $\sim +300$ mV vs. NHE (correspondente ao ponto médio entre o potencial de redução e de oxidação do $\text{O}_2^{\cdot-}$); **ii**) ligantes que, semelhantemente à porção proteica dessas enzimas, apresentassem um arranjo catiônico que facilitasse eletrostaticamente a aproximação e o direcionamento desse íon até o centro metálico ativo, favorecendo a dismutação do ânion radical superóxido; (Batinić-Haberle *et al.*, 2010, 2015; Sheng *et al.*, 2014; Rebouças *et al.*, 2008a, 2008b).

Supõe-se que os potenciais de redução Mn(III)/Mn(II) e, consequentemente, as altas atividades catalítica na dismutação do superóxido das 2-*N*-alquil(ou alcoxil)piridinioporfirinas de Mn(III) ocorram devido à combinação das características estruturais e eletrostáticas: as quatro cargas catiônicas, geradas pela *N*-alquilação do grupo piridila, o efeito retirador de elétrons do grupo *meso*-piridínio e a posição do N no grupo 2-piridil (mais próximo ao sítio

metálico do os isômeros correspondentes, como as 3-*N*-alquilpiridinioporfirinas de Mn(III)). Destacam-se, nessa classe de porfirinas, dois potentes mímicos: a MnTE-2-PyP⁵⁺ ($E_{1/2} = +228$ mV vs NHE, $\log k_{\text{cat}}(\text{O}_2^{\bullet-}) = 7,76$) e a MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺ ($E_{1/2} = +277$ mV vs NHE, $\log k_{\text{cat}}(\text{O}_2^{\bullet-}) = 7,83$).

As MnPs pentacatiônicas que mimetizam essa enzima na dismutação do íon radical superóxido não apresentam a mesma seletividade catalítica que as enzimas SOD. Essas MnPs possuem um sítio metálico elétron-deficiente com rica química redox (podendo assumir quatro estados de oxidação (+2, +3, +4, +5) *in vivo* e com potenciais de redução compatíveis para a reação com vários compostos celulares), além das cargas positivas dos grupos alquilpiridínios (que permitem a atração eletrostática com compostos aniônicos). Assim, essas MnPs exibem inúmeras possibilidades de reações com as espécies reativas do organismo, com compostos redutores presentes no meio celular (ascorbato, glutathiona, cisteína, tetraidrobiopterina) e/ou com sítios redox-ativos de proteínas, como os tióis (Batinić-Haberle *et al.*, 2016a; Tovmasyan *et al.*, 2014a; 2015a; 2015b; Ferrer-Sueta *et al.*, 2003).

Essa ampla reatividade associada às características do tecido alvo (redutores presentes, sistema antioxidante) possibilitam que as MnPs pentacatiônicas da classe das 2-*N*-piridilporfirinas de Mn(III) apresentem tanto ação antioxidante como pró-oxidante, como reportado nos estudos com câncer. Estas MnPs apresentam potencial antitumoral e quimiossensibilizador (ação pró-oxidante), sendo capazes de inibir os tumores ou aumentar a eficácia da radioterapia ou quimioterápicos em células tumorais (*versus* células normais) (Jaramillo *et al.*, 2012; 2015), bem como efeito radioprotetor (ação antioxidante), minimizando os danos da radiação em células normais (*versus* células de câncer) (Ashcraft *et al.*, 2015).

1.2 OBJETIVOS GERAIS

Dada a importância das 2-*N*-alquilpiridilporfirinas de Mn(III) têm-se por objetivos gerais dessa tese:

- ✓ Avaliar a obtenção da MnT-2-PyP_{Cl} em meio aquoso, seguida por derivatização com tosilatos de alquila, buscando-se uma metodologia alternativa para síntese da série de 2-*N*-alquilpiridilporfirinas de Mn(III) com menor impacto ambiental;
- ✓ Investigar o potencial de desenvolvimento da MnTE-2-PyP⁵⁺ e de uma série de outros compostos redox ativos para oxidação de tióis como modelos das enzimas tiol oxidase e peroxidase;

- ✓ Avaliar os efeitos terapêuticos dessas Mn-porfirinas no uso combinado com ascorbato e radioterapia (RT), em modelo animal de câncer de mama;
- ✓ Investigar o uso de MnP como agente atenuador de estresse salino em modelo vegetal de sorgo sacarino.

CAPÍTULO 2: Obtenção da 2-*N*-piridilporfirina de Mn(III) (MnT-2-PyPCL) em meio aquoso usando técnicas quimiométricas e derivatização para síntese de Mn-porfirinas catiônicas

2.1 INTRODUÇÃO

2.1.1 Síntese de Mn-porfirinas

A síntese para obtenção de Mn-porfirinas, a metalação, consiste basicamente na reação da porfirina base livre (H_2P) com excesso de sal (MnX_2), formando além da $Mn^{II}P$ o correspondente ácido (HX) – **Fig. 2.1**. A reação inversa, a desmetalção, é favorecida em presença de ácido forte (Buchler, 1972). Em atmosfera oxidante, como o meio aeróbio, a $Mn^{II}P$ é rapidamente oxidada a $Mn^{III}P^+$, resultando numa metalção irreversível (Boucher, 1972).

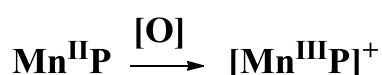
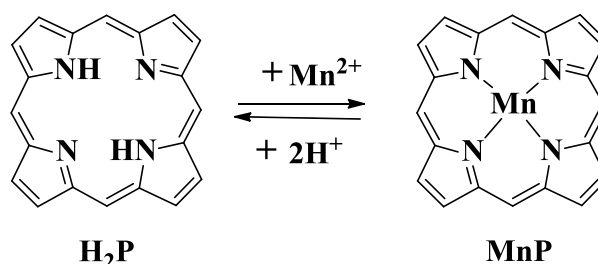
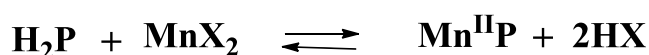


Figura 2.1. Esquema geral de obtenção das Mn-porfirinas.

Dentre os métodos para obtenção de metaloporfirinas, como a MnT-2-PyP⁺ (Rebouças *et al.*, 2002), está o método conhecido como “método de clorofórmio/metanol”, no qual uma solução saturada de sal de Mn^{2+} em metanol é adicionada a uma solução concentrada de H_2P em clorofórmio, sob refluxo (Wijesekera; Dolphin, 1994) – **Fig. 2.2**.

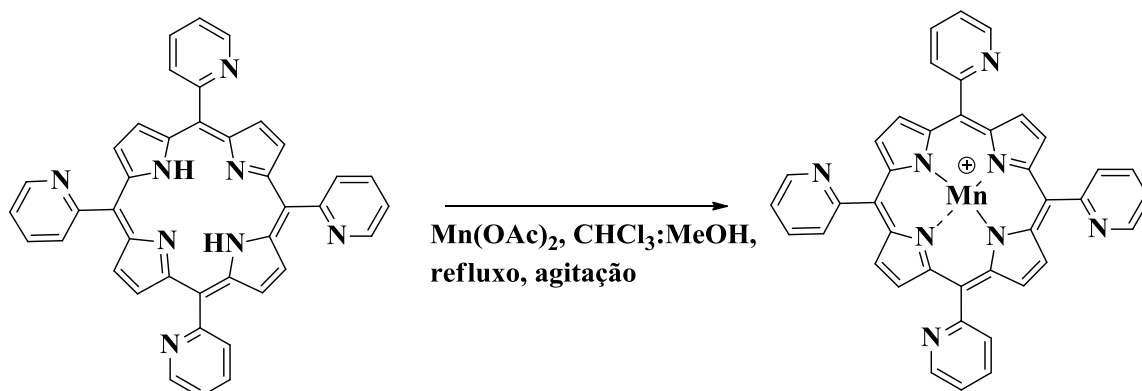


Figura 2.2. Esquema da síntese de Mn-porfirinas pelo método de clorofórmio/metanol.

A metodologia clássica de obtenção das *N*-alquilpiridinioporfirinas de Mn(III) é realizada em duas etapas: a primeira etapa é caracterizada pela alquilação da *N*-piridilporfirina ($\text{H}_2\text{T-X-PyP}$, $\text{X} = 2, 3, 4$) gerando a *N*-alquilpiridilporfirina catiônica correspondente ($\text{H}_2\text{Talquil-X-PyP}^{4+}$), enquanto, na segunda etapa 2, realiza-se a complexação metálica (**Fig. 2.3**) (Batinić-Haberle *et al.*, 1998, 1999, 2002).

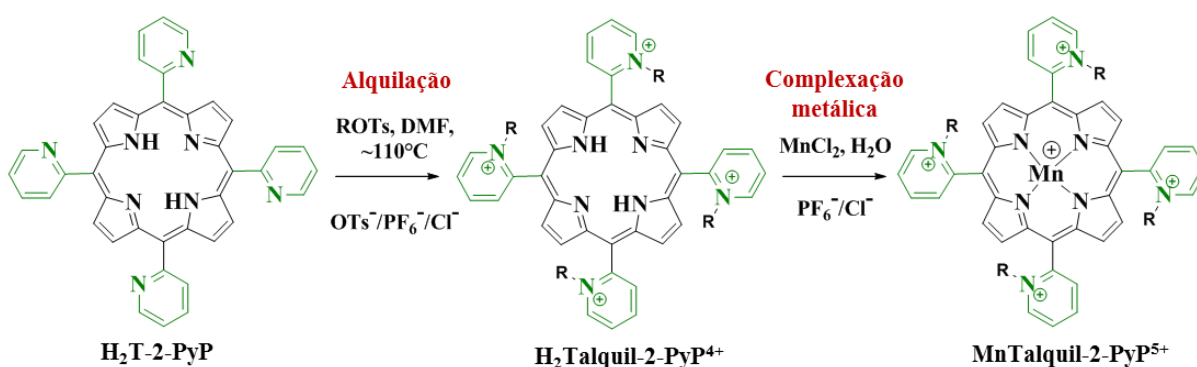


Figura 2.3 Metodologia de síntese para a obtenção das *N*-alquilpiridinioporfirinas de Mn(III) pela rota clássica. R= alquil. Essa metodologia é empregada também na obtenção dos isômeros *meta* e *para*. (Batinić-Haberle *et al.*, 1998, 1999, 2002)

Nesse método, há a formação de porfirinas e Mn-porfirinas hidrossolúveis ($\text{H}_2\text{Talquil-2-PyP}^{4+}$ e $\text{MnTalquil-2-PyP}^{5+}$, respectivamente) o que restringe a purificação, em ambas as etapas, a meios de alta polaridade e há necessidade de sucessivas precipitações *via* metátese (utilizando os sais NH_4PF_6 e cloreto de *N*-alquilamônio) para isolar essas porfirinas – na rota clássica os compostos catiônicos formados não precipitam facilmente em meio aquoso. Assim, para purificação emprega-se inicialmente o contra-íon volumoso PF_6^- , sendo a porfirina precipitada do meio aquoso na forma deste sal. Este sal formado é isolado e dissolvido em um solvente orgânico de alta polaridade, como acetona, capaz de dissolver também um cloreto de *N*-alquilamônio; nestas condições o sal de cloreto da porfirina é essencialmente insolúvel e

precipita do sistema orgânico. Tanto o NH_4PF_6 quanto os cloretos de *N*-alquilamônio são reagentes de alto custo. Geralmente essas purificações via metátese resultam em isolados de alta pureza, mas, caso haja a necessidade de eliminar alguma impureza em particular, há a possibilidade, embora bastante laboriosa e complexa, de purificação por cromatografia em coluna, em camada delgada preparativa, ou cromatografia líquida de alta eficiência. Esses procedimentos cromatográficos com porfirinas catiônicas são geralmente evitados devido à necessidade de utilização de eluentes de alta polaridade e, invariavelmente, de alta salinidade, como a mistura $\text{KNO}_3(\text{aq, sat})\text{:H}_2\text{O:MeCN}$ (1:1:8, v/v/v), que resultam em fatores de retenção (R_f) pelo menos aceitáveis; a eliminação do eluente e do grande excesso de sal nas frações cromatográficas representa um obstáculo adicional nessa rota de purificação (Rebouças *et al.*, 2008a; Batinić-Haberle *et al.*, 1999).

Em sua tese de doutorado, Pinto (2013) propôs a síntese dos três isômeros das *N*-metilpiridinioporfirinas de Mn(III) (MnTM-X-PyP^{5+} , X= 2, 3 e 4) por uma rota alternativa, na qual a ordem das etapas de alquilação e metalação foi invertida. Ou seja, a primeira etapa envolve a metalação da porfirina base livre neutra, utilizando o método clássico de clorofórmio/metanol, sendo a etapa de purificação cromatográfica MnT-X-PyP^+ resultante substituída por precipitação com NaCl. Na segunda etapa de síntese, foi realizada a alquilação em DMF para gerar as MnPs catiônicas correspondentes, que foram purificadas por metátese ($\text{OTs}^-/\text{PF}_6^-/\text{Cl}^-$) (Fig. 2.4).

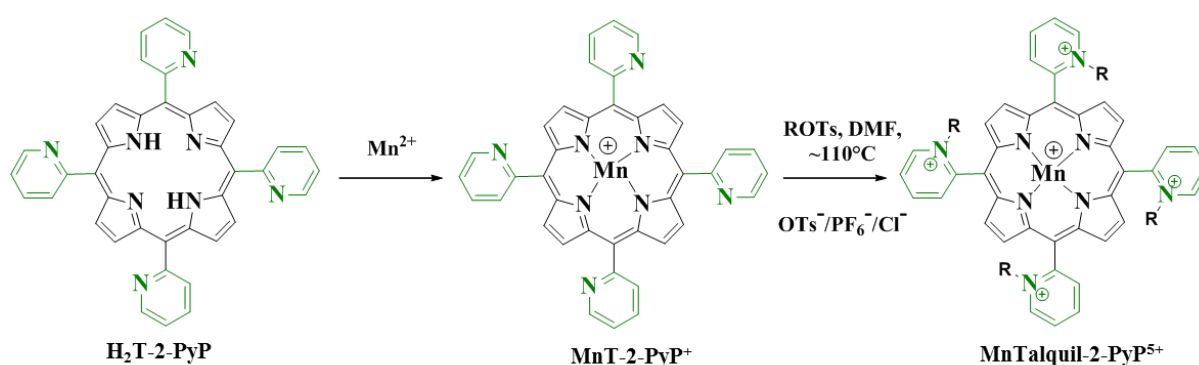


Figura 2.4 Esquema da rota de obtenção, desenvolvida por Pinto (2013), para a síntese da *N*-metilpiridinioporfirina de Mn(III) (MnTM-2-PyP^{5+} ; R= Metil). Os outros dois isômeros MnTM-3-PyP^{5+} e MnTM-4-PyP^{5+} foram preparados de modo análogo (R= Metil).

Essa rota alternativa para obtenção de porfirinas da classe das *N*-piridilporfirinas foi utilizada também para outros centros metálicos, como na síntese da $[\text{Ru}(\text{TM-4-PyP})\text{CO}]^{4+}$ a partir da metilação da porfirina de Ru(II), $\text{RuT-4-PyP}(\text{CO})$ (Hartmann *et al.*, 1997), nas sínteses

de FeTnHex-2-PyP⁵⁺ e FeTnOct-2-PyP⁵⁺, sintetizadas a partir da FeT-2-PyP⁺ (Tovmasyan *et al.*, 2013a), da ZnTE-2-PyP⁴⁺ a partir da ZnT-2-PyP (Viana *et al.*, 2015).

Os rendimentos isolados globais das *N*-metilpiridinioporfirinas de Mn (III) – MnTM-X-PyPCL₅ (X= 2, 3 e 4) – a partir da H₂T-X-PyP (X= 2, 3 e 4) são comparáveis aos da rota clássica para os isômeros MnTM-2-PyPCL₅ e MnTM-3-PyPCL₅ (~78 %) (Pinto, 2013) e foi de 57 % para a MnTM-4-PyPCL₅ (Falcão, 2016).

Dentre as vantagens postuladas para esta rota alternativa para a síntese de *N*-2-alquilpiridinioporfirinas de Mn(III) em relação à clássica, destaca-se a formação do intermediário neutro MnT-2-PyPCL, que para a obtenção de uma série de porfirinas derivadas com cadeia alquílica distintas, acarreta na diminuição no número de etapas de síntese e de purificação.

2.1.2 Quimiometria e síntese de porfirinas

A quimiometria compreende um ramo da química analítica que faz uso de modelos matemáticos, princípios estatísticos e métodos baseados na lógica matemática para obter informações relevantes sobre o sistema investigado (Brown *et al.*, 1994; Gemperline, 2006).

Técnicas quimiométricas podem ser utilizados para a otimização de análises químicas e procedimentos experimentais (tal como síntese de fármacos, etc.). O uso de ferramentas quimiométricas na otimização da síntese de porfirinas é escasso. Apenas estudos de síntese de porfirinas base livre foram encontrados, como os de Corkan e colaboradores (1992) e Johnstone e colaboradores (1996), que realizaram planejamento fatorial para a construção da superfície de resposta e métodos simplex para otimização da síntese de *meso*-arilporfirinas. Além desses artigos, há duas dissertações do nosso grupo na UFPB que investigaram as condições ótimas para a síntese de porfirinas base-livre da classe das *N*-alquilpiridilporfirinas, H₂T-2-PyP (Maia, 2015) e H₂T-3-PyP (Peixoto, 2012), por meio do uso de técnicas quimiométricas (planejamento fatorial e superfície de resposta).

A metodologia de superfície de resposta (RSM) é um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas utilizadas para modelar e analisar problemas cujas respostas dependem de diversos fatores, com o intuito de otimizar essas respostas (Montgomery, 2001). O planejamento de experimentos é parte da RSM e é utilizado como estratégia para a obtenção das respostas desejadas utilizando-se o mínimo de experimentos e gastos possível. (Stoyanov, Walmsley, 2006). A partir do planejamento experimental pode-se construir um modelo estatístico para a superfície de resposta, portanto, a escolha adequada do planejamento é

essencial para definir uma superfície de resposta eficaz para a otimização da resposta (Barros Neto *et al.*, 2010).

Para os dados cuja superfície de resposta não apresentam curvatura, modelos de primeira ordem (como o planejamento fatorial ou o de Plackett-Burman, por exemplo) podem ser utilizados para a descrição do sistema. Esses tipos de planejamento, normalmente, são utilizados como escaneamento (varredura) dos fatores relevantes para a obtenção da resposta, bem como das interações entre os fatores. Para a otimização da resposta e para os dados que não podem ser descritos por modelos lineares empregam-se planejamentos de experimentos para funções quadráticas, como os planejamentos fatorial de três níveis, de Box–Behnken, de Doehlert, entre outros (Bezerra *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2004).

O planejamento experimental de Doehlert aplicado à metodologia de superfície de resposta permite explorar uma ampla faixa de domínio experimental, com distribuição uniforme, no qual cada fator é estudado com diferentes números de níveis, o que permite maior flexibilidade para arranjar os fatores segundo restrições (de custo ou instrumental) ou ainda explorar com mais níveis a variável que se considera de maior importância para a resposta (Bezerra *et al.*, 2008). Em uma matriz de Doehlert de três fatores, por exemplo, são necessários 3, 5 e 7 níveis em 13 experimentos descrevendo um espaço esférico (**Figura 2.5**). Outra característica desse planejamento é a possibilidade da reutilização de alguns experimentos em novos planejamentos de Doehlert, para situações em que os limites do primeiro não foram bem escolhidos ou em que se deseja explorar novas regiões do domínio experimental (Ferreira, 2007; Bezerra *et al.*, 2008; Bensalah *et al.*, 2010).

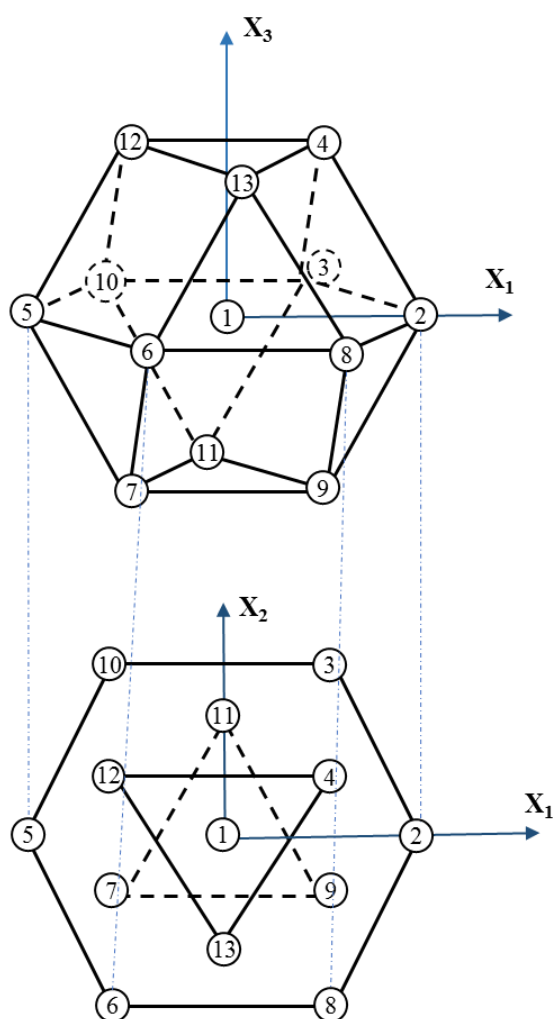


Figura 2.5 Cubo tetraedro apresentando a localização dos 13 pontos experimentais para três fatores codificados (X_1 , X_2 , X_3) e sua representação em 2D.

2.2 OBJETIVOS

Teve-se como objetivo, o desenvolvimento de uma nova metodologia para a síntese da MnT-2-PyPcl por meio de uma rota sintética com menor impacto ambiental, utilizando meio aquoso ácido e estender a rota alternativa de obtenção de MnPs catiônicas (Pinto, 2013) para incluir derivados de cadeia alquílica longa.

Para tanto, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Inaugurar a síntese da MnT-2-PyP⁺ em meio aquoso e investigar a influência de diferentes fatores (concentrações de ácido, excesso de Mn e temperatura) na obtenção da MnT-2-PyP⁺, em pequena escala, através de um estudo quimiométrico usando planejamento de Doehlert.

- ✓ Testar, em escala preparativa, as condições sintéticas selecionadas do estudo quimiométrico e desenvolver um método de purificação da MnT-2-PyPCL sem uso de solventes orgânicos.
- ✓ Estudar a derivatização da MnT-2-PyPCL, como intermediário para obtenção das 2-*N*-alquilpiridinioporfirinas de Mn(III) – MnTE-2-PyPCL₅ e MnTnHex-2-PyPCL₅.

2.3 PARTE EXPERIMENTAL

2.3.1 Reagentes e solventes

O tosilato de etila foi preparado segundo a metodologia de Oikawa (1999). Os demais compostos foram adquiridos comercialmente e utilizados sem purificação adicional. A porfirina base-livre *meso*-tetraquis(2-piridil)porfirina (H₂T-2-PyP) foi obtida da BioMimetix Inc.. O tosilato de *n*-hexila foi adquirido da TCI America. O cloreto de manganês (II) tetraidratado (MnCl₂·4H₂O), cloreto de sódio (NaCl), hexafluorofosfato de amônio (NH₄PF₆), nitrato de amônio (NH₄NO₃) e Aliquat foram obtidos da Sigma-Aldrich. e sulfato de manganês (II) monoidratado (MnSO₄·H₂O) da VETEC. O ácido clorídrico e hidróxido de sódio foram da Química Moderna. Os solventes utilizados: *N,N*-dimetilformamida (DMF), acetona, etanol, éter etílico, clorofórmio, diclorometano, acetona, acetonitrila (MeCN) foram adquiridos da Tedia.

2.3.2 Equipamentos

Para as análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas placas de sílica-gel sem indicador de fluorescência da Sigma-Aldrich. Os espectros eletrônicos de absorção na região do UV-VIS (300-800 nm) foram registrados em espectrofotômetro da marca Agilent (modelo Cary 60 UV-VIS) ou da marca Shimadzu (modelo UV-1800), com resolução 1 nm, utilizando-se cubetas de plástico, vidro e/ou quartzo com caminho óptico de 10 mm.

2.3.3 Estudo quimiométrico para obtenção da cloreto de 5,10,15,20-tetra(2-piridil)porfirinatomanganês(III) MnT-2-PyP⁺ em meio aquoso ácido

Inicialmente foram definidos os fatores e o domínio experimental utilizados no estudo quimiométrico (**Tabela 2.1**).

Tabela 2.1 Fatores, número de níveis e domínio experimental do planejamento de Doehlert desenvolvido para o estudo da síntese da MnT-2-PyP⁺ em meio aquoso ácido.

Fatores codificados	Fatores	Número de níveis	Intervalo
X_1	[H ₂ SO ₄]	5	65 – 125 mmol L ⁻¹
X_2	(C _{Mn} /C _{H2P}) _{inicial}	7	2,5 – 11,5
X_3	T	3	40 – 60 °C

Os ensaios para a obtenção da síntese da MnT-2-PyP⁺ foram efetuados conforme as condições propostas no planejamento quimiométrico de Doehlert com 3 fatores, como exposto na **Tabela 2.2**.

Tabela 2.2 Matriz experimental proposta para otimização da síntese da MnT-2-PyP⁺ usando planejamento de Doehlert de 3 fatores (entre parênteses estão os valores codificados para os fatores)

Experimentos	Valores experimentais (X_i)		
	[H ₂ SO ₄]	(C _{Mn} /C _{H2P}) _{inicial}	T
	mmol L ⁻¹		°C/ ± 2
I	95 (0)	7,0 (0)	50 (0)
II	125 (1)	7,0 (0)	50 (0)
III	110 (0,5)	11,5 (0,866)	50 (0)
IV	110 (0,5)	8,5 (0,289)	60 (0,817)
V	65 (-1)	7,0 (0)	50 (0)
VI	80 (-0,5)	2,5 (-0,866)	50 (0)
VII	80 (-0,5)	5,5 (-0,289)	40 (-0,817)
VIII	110 (0,5)	2,5 (-0,866)	50 (0)
IX	110 (0,5)	5,5 (-0,289)	50 (0)
X	80 (-0,5)	11,5 (0,866)	50 (0)
XI	95 (0)	10,0 (0,577)	40 (-0,817)
XII	80 (-0,5)	8,5 (0,289)	60 (0,817)
XIII	95 (0)	4,0 (-0,577)	60 (0,817)

Em seguida, foram preparadas três soluções-estoque: **1)** Solução aquosa de H₂SO₄ a 1 mol L⁻¹ (**Solução A**); **2)** Soluções aquosas de MnSO₄.H₂O **a-g**, com as seguintes concentrações de Mn²⁺ (mol L⁻¹): **a** = 0,128; **b** = 0,204; **c** = 0,280; **d** = 0,357; **e** = 0,434; **f** = 0,510; **g** = 0,586. **3)** Solução aquosa ácida de H₂T-2-PyP a 13,6 mmol L⁻¹ contendo H₂SO₄ a 0,091 mol L⁻¹ (**Solução S0**), que foi preparada com a dissolução de 168 mg de H₂T-2-PyP em 1,81 mL de H₂SO₄ 1 mol L⁻¹, sob agitação no vórtex, e em seguida alíquotas de 500 µL de água destilada foram adicionadas até aferir o volume de 20 mL. **4)** Soluções estoque **s_n (n=1-5)**, preparadas a partir das soluções ácidas **A** e **S0**, utilizando-se diferentes volumes dessas e obtendo-se concentrações variadas de H₂SO₄, conforme **Tabela 2.3**.

Tabela 2.3 Volumes utilizados para preparo das soluções **s1-s5**, bem como as respectivas concentrações finais de H₂T-2-PyP e H₂SO₄. Os volumes finais das soluções foram aferidos com água destilada.

s_n	V(Solução S0)	V(Solução A)	V_{final} da solução	[H₂SO₄]	[H₂T-2-PyP]
	(mL)	(μL)	(mL)	(mmol L ⁻¹)	(mmol L ⁻¹)
s₁	1,5	85	3	74	6,8
s₂	5,0	450	10	91	6,8
s₃	5,0	620	10	108	6,8
s₄	5,0	790	10	125	6,8
s₅	1,5	290	3	142	6,8

Os experimentos foram realizados em tubos de ensaio de 10 mL com tampa rosqueada, nos quais foram adicionados 1500 μL da solução **s_n** apropriada e 200 μL da solução aquosa de MnSO₄.H₂O de concentração adequada para cada experimento, conforme indicado na **Tabela 2.4**.

Tabela 2.4 Soluções-estoque utilizadas para cada experimento quimiométrico.

Experimento	Solução-estoque	
	s_n	a-g
I	s₃	d
II	s₅	d
III	s₄	g
IV	s₂	e
V	s₁	d
VI	s₂	a
VII	s₂	c
VIII	s₄	a
IX	s₄	c
X	s₂	g
XI	s₄	f
XII	s₂	e
XIII	s₃	b

Na sequência, os tubos foram fechados e imersos em banho de óleo na temperatura desejada para o experimento (**Tabela 2.2**). Para o acompanhamento da reação *via* espectroscopia de absorção na região do UV-VIS, foram retiradas da reação alíquotas de 10 μL periodicamente (na primeira hora de síntese, de 15 em 15 minutos; na sequência, de 30 em 30 minutos; e, após 50% do produto formado, de 1 em 1h), as quais foram imediatamente

analisadas por espectroscopia de absorção no UV-VIS. Essas alíquotas foram primeiramente diluídas em 790 µL de HCl 0,1 mol L⁻¹; em seguida, 100 µL dessa solução foram transferidos para cubeta de plástico contendo 910 µL de HCl 0,1 mol L⁻¹, correspondendo a um fator de diluição total de 1/808. Os espectros foram registrados no intervalo de 300 a 800 nm. Os experimentos foram interrompidos após 24 h.

Para o tratamento dos dados, em cada experimento foi construído um gráfico da concentração ao longo do tempo de reação. As concentrações da porfirina de partida (H₂P) e da Mn-porfirina resultante (MnP) foram determinadas utilizando a lei de Beer-Lambert, considerando o caminho ótico de 1 cm, os valores de absorvidade molar nos comprimentos de onda de 416 e 457 nm para duas espécies (H₂P e MnP) e a solução do sistema de duas equações e duas incógnitas (**Eqs. 2.1 e 2.2**):

$$A_{416} = \varepsilon_{416}^{MnP} [MnP] + \varepsilon_{416}^{H_2P} [H_2P] \quad \text{Eq. 2.1}$$

$$A_{457} = \varepsilon_{457}^{MnP} [MnP] + \varepsilon_{457}^{H_2P} [H_2P] \quad \text{Eq. 2.2}$$

Os valores das absorvidades molar da MnT-2-PyPCL ($\varepsilon_{416 \text{ nm}} = 24565 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\varepsilon_{457 \text{ nm}} = 122826 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.) e H₂T-2-PyP ($\varepsilon_{416 \text{ nm}} = 212762 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\varepsilon_{457 \text{ nm}} = 11904 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) foram determinados em HCl 0,1 mol L⁻¹ a partir de amostras padrão.

Em seguida, utilizando o programa OriginPro8, foi realizado o ajuste em modelo exponencial da cinética de metalação e a partir da equação ajustada foi calculado o tempo em que a concentração seria equivalente a 50% de conversão da base livre H₂T-2-PyP, **t**₅₀, que corresponde à resposta a ser utilizada para análise quimiométrica.

Para determinação da superfície de resposta pelo modelo de Doehlert, os efeitos dos três fatores sobre o **t**₅₀ foram estimados pela análise de regressão múltipla, realizada considerando os efeitos lineares e quadráticos dos três fatores, bem como suas possíveis interações. O modelo foi construído com o inverso de X_2 (definido como $X'_2 = \frac{1}{X_2}$), usando o software RStudio 1.2.5033 (RStudio, Inc.) como ferramenta estatística para análise de regressão múltiplas.

2.3.4 Experimentos extras de obtenção da cloreto de 5,10,15,20-tetra(2-piridil)porfirinatomanganês(III) MnT-2-PyPcl em meio aquoso ácido

Experimentos em pequena escala com duas condições extra (E1 e E2) ao planejamento de Doehlert foram realizados e as condições estão apresentadas na **Tabela 2.5**.

Tabela 2.5 Condições para os experimentos extras e soluções-estoque utilizadas.

Experimentos	Valores experimentais			Soluções-estoque S _n + a-g
	X ₁	X ₂	X ₃	
	[H ₂ SO ₄] mmol L ⁻¹	(C _{Mn} /C _{H2P}) _{inicia} I	T°C (± 2)	
E1	110	11,5	60	S ₄ + e
E2	110	5,5	60	S ₄ + c

Os procedimentos de realização dos experimentos, acompanhamento reacional e análise dos dados foram os mesmos adotados no procedimento descrito para os experimentos do planejamento quimiométrico.

2.3.5 Síntese em escala preparativa da MnT-2-PyPcl em meio aquoso ácido

As reações para obtenção da MnT-2-PyP em meio aquoso (**Fig. 2.6**) foram baseadas no escalonamento (de 6,3 vezes) de duas condições em pequena escala: o experimento XII do estudo quimiométricos e o experimento extra E2. A solução estoque (S₀) foi preparada com concentração de 13,6 mmol L⁻¹ de H₂T-2-PyP e 125 mmol L⁻¹ de ácido sulfúrico.

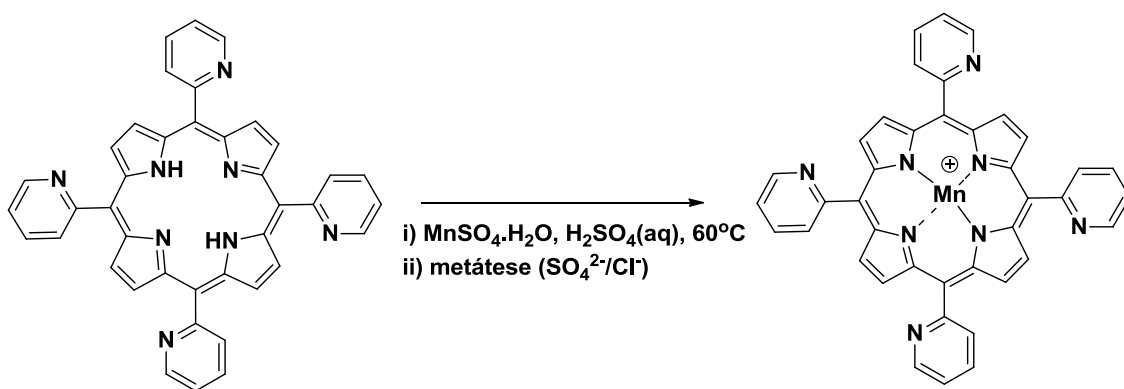


Figura 2.6 Esquema de síntese da porfirina MnT-2-PyPcl em solvente aquoso.

Para o escalonamento do **experimento XII** foram adicionados 0,27 mL de H₂SO₄(aq) 1 mol L⁻¹ a 4,75 mL da solução estoque de H₂T-2-PyP (S₀), então 4,49 mL de água foram adicionados. As adições foram realizadas sob agitação. Em seguida, 1,27 mL de solução de sulfato de Mn(II) a 0,43 mol L⁻¹ foi adicionado, completando um volume total de reação de

10,78 mL. O sistema foi fechado e aquecido a 60 °C, sob agitação. A metalação foi acompanhada periodicamente por espectroscopia de absorção eletrônica da região do UV-VIS e CCD-SiO₂ (CHCl₃:MeOH, 9:1, v/v). Completadas 6 h, o aquecimento foi interrompido e, após a solução atingir a temperatura ambiente, o volume da reação foi medido (~7 mL) e a concentração da solução de MnT-2-PyPcl foi determinada *via* espectrofotometria. A seguir, o pH da solução inicial de ~1,1 foi ajustado lentamente para 5,4 com 300 µL de solução aquosa de NaOH (5 mol L⁻¹). Em seguida, o bulbo do pHmetro foi lavado com 300 µL de H₂O deionizada e a solução foi filtrada sob pressão reduzida em funil de placa sinterizada, com capacidade para 10 mL. O precipitado foi lavado lentamente com alíquotas de HCl 0,02 mol L⁻¹ (6 x 500 µL). O pH da solução foi ajustado para 7,5 com 12 µL de solução aquosa de NaOH (5 mol L⁻¹) e, na sequência, o bulbo do pHmetro lavado com 300 µL de H₂O deionizada. A primeira precipitação da MnP foi realizada pela adição ao filtrado de 4,95 mL de uma solução de NaCl (6 mol L⁻¹), correspondendo a um excesso molar de ~500 vezes (vs MnP). Após 40 min, o precipitado formado foi recuperado em funil de placa sinterizada. E o procedimento foi repetido: o sólido foi redissolvido em 8,5 mL de solução de aquosa de HCl 0,02 mol L⁻¹, o pH foi reajustado para 7,5 com 18 µL de solução aquosa de NaOH (5 mol L⁻¹) e o bulbo do pHmetro lavado com 300 µL de H₂O deionizada. Posteriormente, a MnP foi reprecipitada com a adição de 2,0 mL de uma solução aquosa de NaCl (6 mol L⁻¹), correspondendo agora a um excesso molar de 200 vezes (vs MnP). Em seguida o precipitado foi filtrado e lavado com 2,5 mL água gelada sob pressão reduzida. Foram realizadas três sínteses independentes, cujos rendimentos isolados foram de 43,4 mg (95%), 37,3 mg (83%) e 30,8 mg (80%).

O **experimento E2** foi realizado pela adição de 0,59 mL de H₂SO₄(aq) 1 mol L⁻¹ a 4,75 mL da solução estoque de H₂T-2-PyP (S₀), então 4,16 mL de água foram adicionados. As adições foram realizadas sob agitação. Em seguida, 1,27 mL de solução de sulfato de Mn(II) a 0,28 mol L⁻¹ foi adicionado, o sistema foi aquecido a 60 °C e mantido sob agitação por 25 h. Os procedimentos de purificação foram os mesmos adotados no procedimento descrito para o **experimento XII**. Foram realizadas duas sínteses independentes, cujos rendimentos isolados foram de 33,2 mg (79%) e 32,4 mg (83%).

2.3.6 Alquilação da MnT-2-PyPcl: síntese dos cloretos de 5,10,15,20-tetra(*N*-alquilpiridínio-2-il)porfirinatomanganês(III) (MnTalquil-2-PyP)Cl₅, sendo alquil = etil e *n*-hexil

A síntese para a obtenção da MnTalquil-2-PyPcl₅ (Figura 2.7) foi adaptada da metodologia de Batinić-Haberle (1998, 1999, 2002) para alquilação da H₂T-2-PyP.

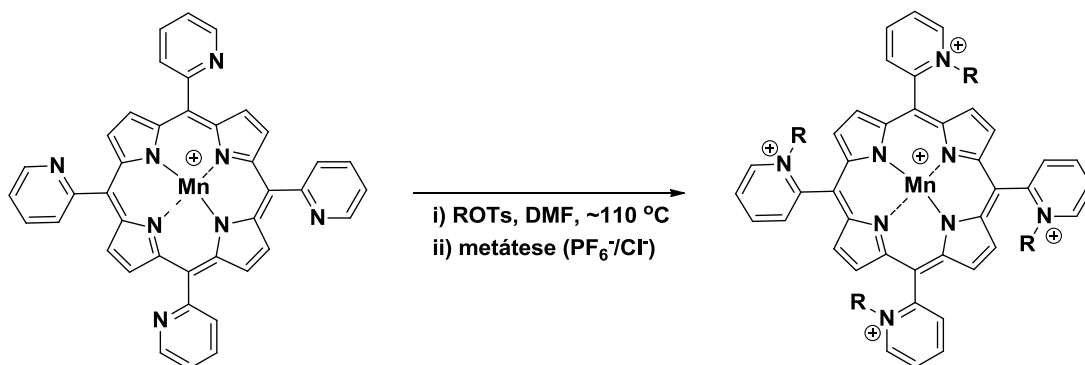


Figura 2.7 Esquema de síntese da MnTalquil-2-PyPcl₅ (alquil ou R= Et ou *n*-Hex) a partir da MnT-2-PyPcl.

Para a síntese da **MnTE-2-PyPcl₅**, o procedimento de alquilação foi realizado dissolvendo 51 mg (0,072 mmol) de MnT-2-PyPcl em 8,3 mL de DMF, que posteriormente foi aquecida a 105-110 °C. Após 20 min, foram adicionados 1,23 mL (7,21 mmol) de tosilato de etila. A reação foi acompanhada por CCD-SiO₂ (KNO₃(aq, sat):H₂O:MeCN, 1:1:8, v/v/v) e por espectroscopia eletrônica de absorção UV-VIS. Após 25 h o sistema foi resfriado à temperatura ambiente e transferido para um erlenmeyer de 50 mL. Na sequência, ~30 mL de éter etílico foi adicionado, o sistema foi agitado manualmente e formou-se um material viscoso que aderiu às paredes do erlenmeyer. A fase líquida fluida foi descartada e o material viscoso foi lavado mais 5 vezes com porções de aproximadamente 3 mL de éter etílico. Após completa remoção do éter etílico, 5 mL de água deionizada foram adicionados para solubilizar o material viscoso. Em seguida, a Mn-porfirina foi precipitada com a adição gota a gota de uma solução aquosa de NH₄PF₆ (3 mol L⁻¹). O sólido formado foi filtrado e lavado com éter etílico, seco ao ar por sucção em funil de placa sinterizada e em estufa a 70 °C por 4 horas. Posteriormente, a metátese de PF₆⁻ para Cl⁻ foi realizada pela dissolução da MnP em acetona e, posteriormente, foi adicionada gota a gota uma solução de Aliquat a 10% (v/v) em acetona. O precipitado formado foi lavado com acetona, seco ao ar por sucção em funil de placa sinterizada, e depois em estufa a 70 °C por 8 h e sob pressão reduzida durante 12 horas. O sólido obtido foi isolado e a parte

que ficou impregnada no funil foi solubilizada em água destilada. Rendimento isolado: 69,21 mg (99%).

A síntese e purificação da **MnTnHex-2-PyPCl₅** foi realizada conforme descrito pelo procedimento acima, utilizando-se 49,5 mg (0,070 mmol) de MnT-2-PyPCl e 3,29 mL (0,014 mol) de tosilato de *n*-hexila. Após 172 horas de reação, o sistema foi resfriado e a purificação foi realizada como no caso da **MnTE-2-PyPCl₅**. O rendimento isolado foi de 93%.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Estudo quimiométrico para obtenção da MnT-2-PyPcl em meio aquoso ácido

O desenvolvimento de uma rota alternativa e mais verde para preparação da MnT-2-PyPcl iniciou-se com a escolha de um solvente não-orgânico para a reação de complexação metálica da H₂T-2-PyP.

Apesar de água ser o solvente verde não-orgânico clássico, foi proposto neste trabalho o uso de uma solução aquosa de um ácido inorgânico como solvente da metalação, visto que a porfirina base livre não é hidrossolúvel em meio neutro. Na literatura (Choi; Fleischer, 1963; Fleischer *et al.*, 1964) foram estudados em escala espectrofotométrica os mecanismos da reação de metalação do isômero H₂T-4-PyP com diferentes metais (Mn²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺ e Cd²⁺) utilizando diferentes solventes, como o ácido acético glacial, solução aquosa de ácido perclórico em pH 1,92 (com 8,3% de ácido acético) e solução aquosa de nitrato de sódio em pH 2,0 (pH ajustado com HNO₃). Nesses trabalhos, apesar de as reações terem sido conduzidas em concentrações espectroscópicas, não preparativas e sem tentativa de isolamento dos produtos, serviram como indicativo de que é possível estabelecer condições preparativas para metalação do isômero de interesse H₂T-2-PyP em meio ácido.

Soluções aquosas de ácido sulfúrico e clorídrico foram pré-selecionadas para testes de solubilidade da porfirina base livre H₂T-2-PyP e de reatividade com Mn²⁺. As condições iniciais do estudo corresponderam ao refluxo de H₂T-2-PyP (a 6 mmol L⁻¹) em pH ~ 1,5. Foram observados tempos de reação superior a 24 h para as reações com solução aquosa de HCl como solvente e de ~5 h quando a solução com ácido sulfúrico foi o solvente. Desse modo, a solução aquosa de ácido sulfúrico foi selecionada como solvente para os estudos quimiométricos. A menor reatividade em HCl é provavelmente associada à competição pelo Mn²⁺ aquoso exercida pelos íons cloretos (um ânion coordenante), limitando a metalação da porfirina.

Forma inicialmente elencados quatro fatores que poderiam eventualmente influenciar na formação da Mn-porfirina: pH, temperatura, razão molar inicial entre Mn²⁺ e porfirina (C_{Mn}/C_{H_2P})_{inicial} e a concentração de H₂T-2-PyP no meio. Para o planejamento experimental, no entanto, a concentração da porfirina base livre H₂T-2-PyP no meio de reação foi fixada em 6 mmol L⁻¹, em todos os experimentos. Devido a limitações experimentais para se controlar com precisão valores de pH menores que 2

utilizando o eletrodo de vidro (Zhou *et al.*, 2008), optou-se por trabalhar neste estudo com a concentração de H_2SO_4 (X_1), ao invés de pH, como variável independente. O intervalo de concentração do ácido foi determinado a partir de testes preliminares, no qual foi determinada a concentração de ácido mínima para solubilizar completamente a porfirina base livre e mantê-la solúvel nas condições de temperatura e excesso de Mn^{2+} do experimento I. Desse modo, 65 mmol L^{-1} de H_2SO_4 foi definido como o menor valor para X_1 . O valor máximo da concentração de ácido foi limitado para evitar a condição que contém alta concentração de espécies chamadas, em química de porfirinas, de dications (embora a porfirina $\text{H}_2\text{T-2-PyP}$ totalmente protonada apresente carga total $+6$, $\text{H}_8\text{T-2-PyP}^{6+}$, o termo dication refere-se apenas à protonação dos nitrogênios pirrólicos internos, ignorando as cargas dos substituintes do macrociclo).

A relação molar de $\text{Mn}^{2+}:\text{H}_2\text{P}$ reportada na literatura para a preparação de metaloporfirinas derivadas das *N*-piridilporfirinas variam de 6-20. Assim, para o fator $(\text{C}_{\text{Mn}}/\text{C}_{\text{H}_2\text{P}})_{\text{inicial}}$ (X_2), selecionou-se o intervalo de 2,5-11,5. O menor valor foi escolhido com o intuito de reduzir o excesso de Mn^{2+} no sistema, mas tentando minimizar o prejuízo no tempo de reação. Foram realizados testes prévios também para a definição do intervalo da temperatura (X_3), nos quais foi observado que o aumento da temperatura para condições de refluxo no sistema aquoso ácido ocasionou a precipitação da H_2P . Em geral, foi notado que a solubilidade da base livre $\text{H}_2\text{T-2-PyP}$ em meio ácido diminuiu com o aumento da temperatura. Com base nessas observações, o intervalo de temperatura no planejamento experimental foi definido entre 40 e 60 °C. A temperatura de 40°C foi escolhida como valor mínimo por ser a menor temperatura adequadamente estabilizada no sistema de aquecimento disponível no laboratório; destaca-se, no entanto, que também se verifica progresso da reação mesmo à temperatura ambiente, $\sim 28^\circ\text{C}$.

A partir das considerações apresentadas acima, com o domínio experimental selecionado, montou-se a matriz de planejamento de Doehlert. Embora, normalmente seja realizado um planejamento fatorial para varredura inicial (dos fatores, suas interações e região a ser estudada), nesse estudo optou-se por desenvolver diretamente o planejamento de Doehlert, devido às características do sistema que restringem as redefinições dos limites do domínio experimental tipicamente utilizados para preparação de Mn-porfirinas. Desse modo, a escolha do planejamento Doehlert foi realizada considerando as vantagens de utilizar essa metodologia: uma distribuição esférica uniforme do domínio experimental, estudo das variáveis em diferentes níveis e

possibilidade de aproveitar experimentos para realização (caso necessário) de novo planejamento.

Os experimentos foram realizados conforme planejamento descrito na Tabela 2.. O acompanhamento dos experimentos foi realizado espectrofotometricamente, uma vez que os espectros de absorção eletrônico na região do UV-VIS da porfirina base livre $H_2T-2-PyP$ (formalmente, uma mistura das espécies $H_6T-2-PyP^{4+}$, $H_7T-2-PyP^{5+}$ e $H_8T-2-PyP^{6+}$ em meio ácido de análise) e do produto metalado $MnT-2-PyP^+$, registrados em HCl $0,1\text{ mol L}^{-1}$, apresentam perfis espectrais bastante distintos entre si (**Fig. 2.8**). A banda Soret da porfirina base livre localiza-se em 416 nm, enquanto na MnP essa banda é deslocada para 457 nm.

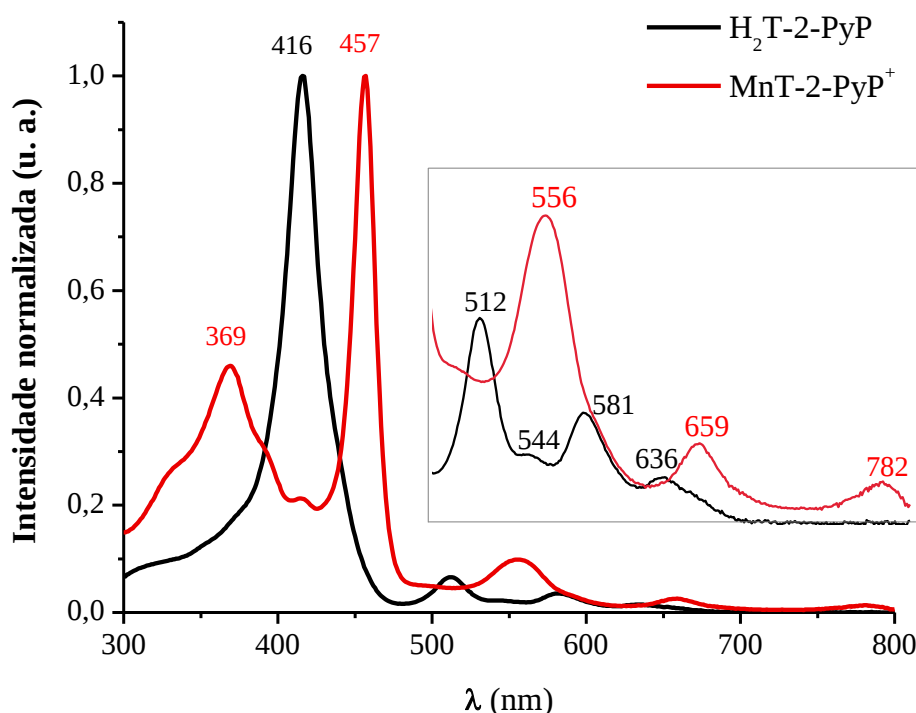


Figura 2.8 Espectros de absorção eletrônico na região do UV-VIS de amostras-padrão de base livre $H_2T-2-PyP$ (formalmente, uma mistura das espécies $H_6T-2-PyP^{4+}$, $H_7T-2-PyP^{5+}$ e $H_8T-2-PyP^{6+}$ em meio ácido) e $MnT-2-PyP^+$ em HCl $0,1\text{ mol L}^{-1}$.

A partir das medidas de absorbância acompanhadas ao longo tempo, utilizando-se os coeficientes de absortividade molar de cada composto nos comprimentos de onda de 416 e 457 nm, foram construídos gráficos da $[MnT-2-PyP^+]$ ao longo do tempo, que foram ajustados mono-exponencialmente (**APÊNDICE A**). Como todas as reações levaram eventualmente a uma metalação completa, fez-se necessário definir o tempo de

reação como parâmetros a ser otimizado. Assim, o tempo necessário para formação de 50% da MnT-2-PyP⁺ (t_{50}) foi calculado para cada experimento, sendo definido como a variável dependente/resposta a ser otimizada (**Figura 2.9, APÊNDICE B**).

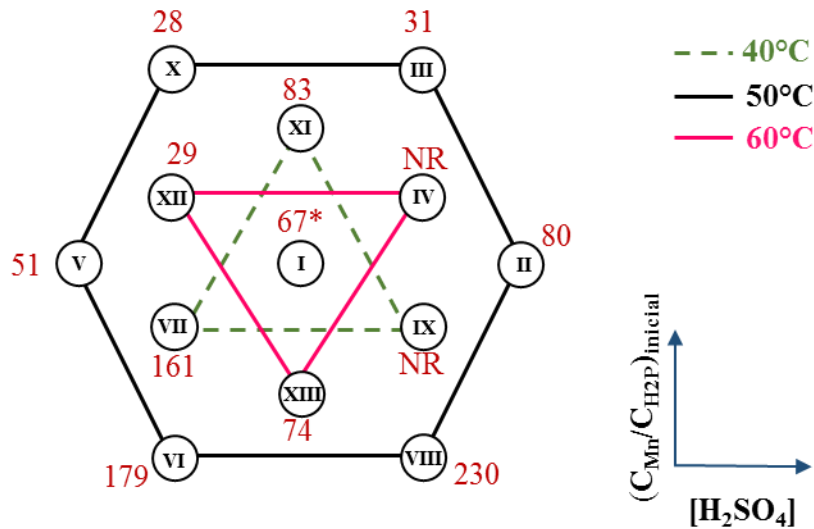


Figura 2.9 Tempos necessário para formação de 50% da MnT-2-PyP⁺ (t_{50}), em minutos, obtidos do planejamento de Doehlert. NR significa experimento não realizado; * refere-se a média dos tempos das replicatas do experimento I (para Ia, Ib e Ic foram 73, 67 e 61 minutos, respectivamente)

O modelo matemático para descrever o espaço experimental foi construído a partir das respostas (t_{50}) dos experimentos realizados. Nesta modelagem, foi utilizado o inverso de X_2 (definido como $X'_2 = \frac{1}{X_2}$, ou seja, a razão entre $(C_{H_2P}/C_{Mn})_{inicial}$). Assim, os efeitos lineares e quadráticos para os três fatores e suas interações foi determinado por meio da análise de regressão múltipla usando o método de mínimos quadrados. Com isso, a equação global proposta para descrever os resultados como um modelo polinomial de segunda ordem considerando todos os coeficientes foi:

$$t_{50} = b_0 + b_1X_1 + b_2X'_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X'^2_2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X'_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X'_2X_3,$$

cujas estimativas dos coeficientes para eles modelo (denominado modelo global) estão listadas na **Tabela 2.6**.

Tabela 2.6 Coeficientes do modelo global obtidos para t_{50} como resposta, sendo EP o erro-padrão.

coeficiente	Estimativa ($\pm$ EP)
b_0	626,7 ($\pm$ 275,8)
b_1	-2,0 ($\pm$ 2,7)
b_2	2006,0 ($\pm$ 311,6) *
b_3	-23,2 ($\pm$ 6,4) *
b_{11}	$-1,7 \cdot 10^{-3} (\pm 5,1 \cdot 10^{-3})$
b_{22}	-404,1 ($\pm$ 265,2)
b_{33}	0,2 ($\pm$ 0,04) *
b_{12}	4,9 ($\pm$ 0,95) *
b_{13}	$-4,2 \cdot 10^{-2} (\pm 4,9 \cdot 10^{-2})$
b_{23}	-35,5 ($\pm$ 5,0) *

*valores significativos ($p < 0,05$)

Neste modelo global, observou-se que nem todos os coeficientes são estatisticamente significativos. Assim, uma sequência de ajustes do modelo foi realizado pela retirada, um a um e nesta ordem, dos coeficientes não significativos b_1^2 , b_1b_3 e b_1 , (isto é, os coeficientes que apresentaram $p > 0,05$ em cada novo modelo, considerando a hipótese nula, $H_0: b=0$, que considera que a relação da regressão é nula), sendo observado critérios como R^2 ajustado, diminuição do erro padrão residual e aumento nos graus de liberdade. Com isso, obteve-se finalmente o modelo ajustado com a seguinte equação:

$$t_{50} = b_0 + b_2X_2' + b_3X_3 + b_{22}X_2'^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2' + b_{23}X_2'X_3,$$

na qual todos os coeficientes são significativos e estão listados na **Tabela 2.7**

Tabela 2.7 Coeficientes do modelo ajustado obtidos para t_{50} como resposta, sendo EP o erro-padrão. Todos os valores foram significativos ($p < 0,05$).

coeficiente	Estimativa ($\pm$ EP)
b_0	432,0 ($\pm 82,1$)
b_2	2253,2 ($\pm 253,9$)
b_3	-19,8 ($\pm 3,1$)
b_{22}	-540,3 ($\pm 182,3$)
b_{33}	0,2 ($\pm 0,03$)
b_{12}	3,8 ($\pm 0,5$)
b_{23}	-35,8 ($\pm 4,5$)

De acordo com o coeficiente de regressão, r^2 (99,71%), e o r^2 ajustado (99,41%) os dados experimentais podem ser descritos pelo modelo proposto, indicando que esse modelo de regressão ajustado correlaciona-se bem com os dados experimentais. Além disso, o modelo apresentou erro padrão residual de 4,8 e coeficiente de variância de 5,4%. O ajuste do modelo pode ser verificado pelos gráficos de correlação entre as respostas preditas e as respostas experimentais, bem como pelo gráfico de resíduos deixado pela equação do modelo ajustado (**APÊNDICE C**).

Os coeficientes da variável $[H_2SO_4]$ (b_1), sua função quadrática (b_1^2) e a interação entre $[H_2SO_4]$ e T (b_{13}) não apresentaram valores significativos, evidenciando que dentre os fatores estudados no planejamento quimiométrico, a concentração da solução aquosa de H_2SO_4 , dentro da faixa estudada, não apresentou influência significativa nos tempos de reação. Ainda assim, vale destacar que a solubilidade da H_2T -2-PyP diminuiu com o aumento do pH e que soluções mais ácidas podem levar à protonação dos nitrogênios internos do anel porfirínico desfavorecendo a reação de metalação.

Quanto maior o valor absoluto dos coeficientes do modelo, maior a influência da variável na resposta. Com isso, podemos afirmar, conforme indicado pelo valor de b_2 ($2253,2 \pm 253,9$), que a razão $(C_{H_2P}/C_{Mn})_{inicial}$ foi o fator que causou maior impacto na resposta. O valor positivo de b_2 indicou que quanto menor a $(C_{H_2P}/C_{Mn})_{inicial}$ (maior excesso de Mn^{2+}) menor será o tempo para obtenção de 50% do produto (t_{50}). O valor de b_3 sendo baixo ($-19,8 \pm 3,1$) evidenciou que a temperatura apresentou menor impacto na resposta; este coeficiente sendo negativo indicou que o aumento da temperatura, na

faixa de 40 a 60 °C, contribui para a diminuição do tempo de reação. Ressalta-se, no entanto, a tendência à precipitação da H_2P em solução aquosa de ácido sulfúrico em temperaturas mais elevadas que 60 °C, o que prejudica consideravelmente o avanço da reação.

As interações contendo a razão molar de $H_2P:Mn^{2+}$, a saber $[H_2SO_4]$ e $H_2P:Mn^{2+}$ (b_{12}), e $H_2P:Mn^{2+}$ e T (b_{23}), apresentaram interações significativas. O valor do coeficiente b_{23} ($-35,8 \pm 4,5$) indica que a interação entre a razão $H_2P:Mn^{2+}$ e T foi a que apresentou maior influência sinérgica sobre a resposta. Já o menor valor de b_{12} ($3,8 \pm 0,5$) revela o menor impacto da concentração de ácido sulfúrico na interação com $H_2P:Mn^{2+}$ e concorda com o observado para os demais coeficientes contendo $[H_2SO_4]$ quanto à menor relevância desse fator.

A superfície de resposta de t_{50} em função da temperatura e $(C_{H_2P}/C_{Mn})_{inicial}$ (Fig. 2.10) em concentração de ácido fixa a 95 mmol L⁻¹, construída a partir do modelo ajustado de regressão, indicaram que maiores temperaturas e maior equivalente de Mn^{2+} tendem a diminuir o tempo de reação.

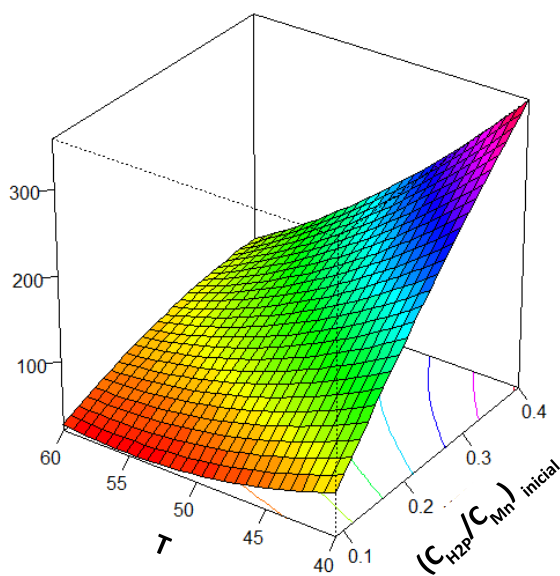


Figura 2.10 Superfície de resposta de t_{50} em função da temperatura vs $(C_{H_2P}/C_{Mn})_{inicial}$ na concentração de ácido sulfúrico de 95 mmol L⁻¹.

De modo geral, o modelo apontou que o uso de temperaturas maiores favoreceu os menores valores de t_{50} (no intervalo de 40-60 °C). No entanto, vale salientar que nos testes preliminares o uso de temperatura superior ao do planejamento (ou sistema sob

refluxo) gerou a precipitação da H₂T-2-PyP no meio reacional, inviabilizando a síntese. Antes que temperaturas superiores às empregadas nesse planejamento sejam utilizadas é necessário a realização de testes de solubilidade nas condições dos experimentos.

As condições experimentais e os valores de t_{50} para os experimentos extras (E1 e E2) realizados foram do planejamento Doehlert são apresentados na **Tabela 2.8**.

Tabela 2.8 Condições experimentais, tempo necessário para formação de 50% da MnT-2-PyP⁺ (t_{50}), em minutos, obtido experimentalmente e previsto (por extrapolação) a partir do modelo ajustado do planejamento de Doehlert.

Experimentos	Condições experimentais			t_{50} experimental min	t_{50} previsto min
	X_1	X_2	X_3		
	[H ₂ SO ₄] mmol L ⁻¹	(C _{Mn} /C _{H2P}) _{inicial}	T°C (± 2)		
E1	110	11,5	60	24	31
E2	110	5,5	60	65	67

As predições foram realizadas substituindo-se as condições experimentais dos fatores X_1 , X_2 e X_3 no modelo de regressão ajustado. Por se tratar de uma extrapolação do domínio experimental, estes experimentos extras podem ser um bom indicador da robustez do modelo. O experimento E2 apresentou um resíduo ($t_{50\text{experimental}} - t_{50\text{previsto}}$) igual a -2, dentro do erro padrão do modelo ajustado (± 6). Já o E1 apresentou resíduo de -7, ligeiramente superior ao erro padrão do modelo ajustado. Esses experimentos extras apresentam condições dentro do planejamento de Doehlert, porém para o experimento E1 o ponto experimental que estaria numa região do espaço amostral mais próxima desse, seria o exp. IV, que não foi realizado. Com isso, supõe-se que a realização dos experimentos não realizados (IV e IX) e construção de novo modelo de regressão possa melhorar a qualidade da estimativa (diminuindo o resíduo) para esses experimentos extras. No entanto, observa-se que o modelo proposto apresentou capacidade de predição de razoável (condição E2) a boa (condição E1), sendo um bom indicador das tendências de comportamento relativo da metalação da H₂T-2-PyP com Mn²⁺ em meio aquoso ácido.

Os experimentos para a síntese em escala preparativa foram selecionados do planejamento de Doehlert a partir daqueles que apresentaram $t_{50} \leq 65$ minutos (experimentos III, V, X e XII). Dentre esses, foram eliminados os que foram realizados

com os maiores valores de $(C_{Mn}/CH_2P)_{inicial}$ a 11,5 (maior excesso de Mn^{2+} utilizado no planejamento) para limitar o excesso de metal a ser eliminado nas etapas seguintes de purificação. Entre os experimentos restantes (V e XII), foi selecionado o que apresentou menor t_{50} (XII). Adicionalmente, entre os experimentos extras (E1 e E2) selecionou-se o que utilizou menor excesso de Mn^{2+} (E2) para síntese em escala preparativa.

2.4.2 Síntese em escala preparativa da MnT-2-PyPCL em meio aquoso ácido

O acompanhamento das sínteses da MnT-2-PyPCL em meio aquoso em escala preparativa foi realizado de modo semelhante ao dos experimentos em pequena escala do planejamento de Doehlert e experimento extra. A evolução das reações em maior escala (6,3 vezes maior) apresentou comportamento semelhante aos de seus respectivos experimentos em pequena escala.

Na literatura (Rebouças *et al.*, 2002; Pinto, 2013), a síntese da MnT-2-PyPCL é realizada pelo método adaptado do “clorofórmio/metanol” com acetato de Mn(II) como fonte do metal. Ao término da metalação, o solvente orgânico é evaporado e o sólido resultante é purificado por cromatografia em coluna cromatográfica de alumina neutra, utilizando eluente orgânico ($CH_2Cl_2:MeOH$, 9:1, v/v) para retirada de traços de $H_2T-2-PyP$ e demais contaminantes (incluindo excesso de Mn^{2+} e outras espécies de Mn geradas no meio reacional). Então (Pinto, 2013), o solvente é novamente evaporado e na sequência dissolvido em água destilada à quente para a realização da etapa de troca aniônica (que foi adaptada de Harriman e Porter, 1979), na qual o pH do sistema é ajustado para 7 (com $NaOH$ 1 mol L^{-1}) e solução aquosa de $NaCl$ (~800 equivalentes de sal em relação à porfirina) é adicionada para precipitação da MnT-2-PyPCL. A etapa de troca iônica é repetida e o sólido obtido é dissolvido em diclorometano para eliminação de possíveis excessos de $NaCl$ (Pinto, 2013).

A metalação da $H_2T-2-PyP$ por sulfato de Mn(II) em meio aquoso foi essencialmente quantitativa, comparável ao método convencional. Já a purificação, foi adaptada da metodologia desenvolvida no grupo da UFPB por Pinto (2013). Com o intuito de desenvolver uma metodologia com menor impacto ambiental para a obtenção da MnT-2-PyPCL, o uso de solventes orgânicos foi retirado da etapa de purificação, assim como na etapa de síntese. Portanto, adaptações da metodologia de Pinto (2013) nas condições de diluição e precipitação foram necessárias, visto que sistemas mais concentrados minimizaram as perdas durante as precipitações.

Com isso, a metodologia de purificação otimizada resultou no ajuste de pH para ~5 (com solução aquosa de NaOH 5 mol L⁻¹), para a hidrólise do excesso de Mn²⁺ presente no sistema, resultando na precipitação de óxidos e hidróxidos de Mn, e precipitação de H₂T-2-PyP residual (pouco solúvel nesse pH, devido à desprotonação dos grupos piridilas). A troca iônica e precipitação da MnP foi realizada com a diminuição no excesso de NaCl de 800 (Pinto, 2013) para 500 equivalentes a partir da adição de solução aquosa mais concentrada de NaCl (6 mol L⁻¹), para reduzir a diluição do sistema. Para a repetição da etapa de purificação por precipitação, o sólido foi redissolvido em solução aquosa de HCl 0,02 mol L⁻¹ (ao invés de água quente, como na literatura), visando diminuir o volume da solução final. Após o reajuste do pH, foram adicionados 200 equivalentes de sal a partir de solução aquosa de NaCl (6 mol L⁻¹). Ao término da purificação, na ausência de qualquer etapa cromatográfica, resquícios de base livre (não aparentes por espectroscopia UV-vis) foram verificados por CCD, mas em quantidades estimadas inferiores a 5%. Aplicações que possam requerer eliminação completa de resíduo de base livre necessitariam purificações cromatográficas para alcançar maior pureza.

O rendimento da MnT-2-PyP_{Cl} obtida nas reações em maior escala em meio aquoso ácido e isolada sem o uso de solventes orgânicos ou cromatografia foi de 84% (média das cinco sínteses realizadas nas condições dos experimentos XII e E2 em condições otimizadas de purificação), já os rendimentos para a obtenção dessa porfirina pela rota convencional foram de 89% (Pinto, 2013) e 90% (Rebouças, 1999). Embora o rendimento isolado nesta tese seja ligeiramente inferior aos obtido pelas rotas da literatura, essa metodologia tem a vantagem de apresentar menor impacto ambiental, visto que não utiliza solventes orgânicos nem na etapa de síntese nem de purificação.

2.4.3 Síntese das Mn-porfirinas catiônicas: cloreto de 5,10,15,20-tetra(*N*-alquilpiridínio-2-il)porfirinatomangânês(III) (MnTalquil-2-PyP)Cl₅

Além do uso da MnT-2-PyP_{Cl} em sistemas biomiméticos de citocromo P450, derivatizações podem ser realizadas, para a obtenção das 2-*N*-alquilpiridinioporfirinas de Mn(III), MnTalquil-2-PyP⁵⁺. A rota clássica para obtenção dessa classe de porfirinas envolve duas etapas de síntese, a primeira a alquilação da H₂T-2-PyP e a segunda *via* complexação metálica da porfirina alquilada (H₂Talquil-2-PyP⁴⁺) formada na primeira etapa (**Figura 2.11, rota A**), ou seja, para a obtenção de quatro porfirinas da série da 2-*N*-alquilpiridinioporfirinas de Mn(III) são realizadas 8 etapas de síntese e purificação (Batinić-Haberle *et al.*, 2002).

Uma alternativa para síntese de 2-*N*-alquilpiridinioporfirinas de Mn(III) foi proposta por Pinto (2013), na qual a síntese das metaloporfirinas alquiladas (MnTalquil-2-PyP⁵⁺) são realizadas primeiro pela metalação da porfirina base livre (H₂T-2-PyP), formando um intermediário central (MnT-2-PyP⁺), e posterior alquilação da MnT-2-PyP⁺ (**Figura 2.11, rota B**). Com isso, a obtenção de quatro porfirinas da série da 2-*N*-alquilpiridinioporfirinas de Mn(III), utilizando a **rota B**, pode ser realizada com apenas 5 etapas de síntese e purificação.

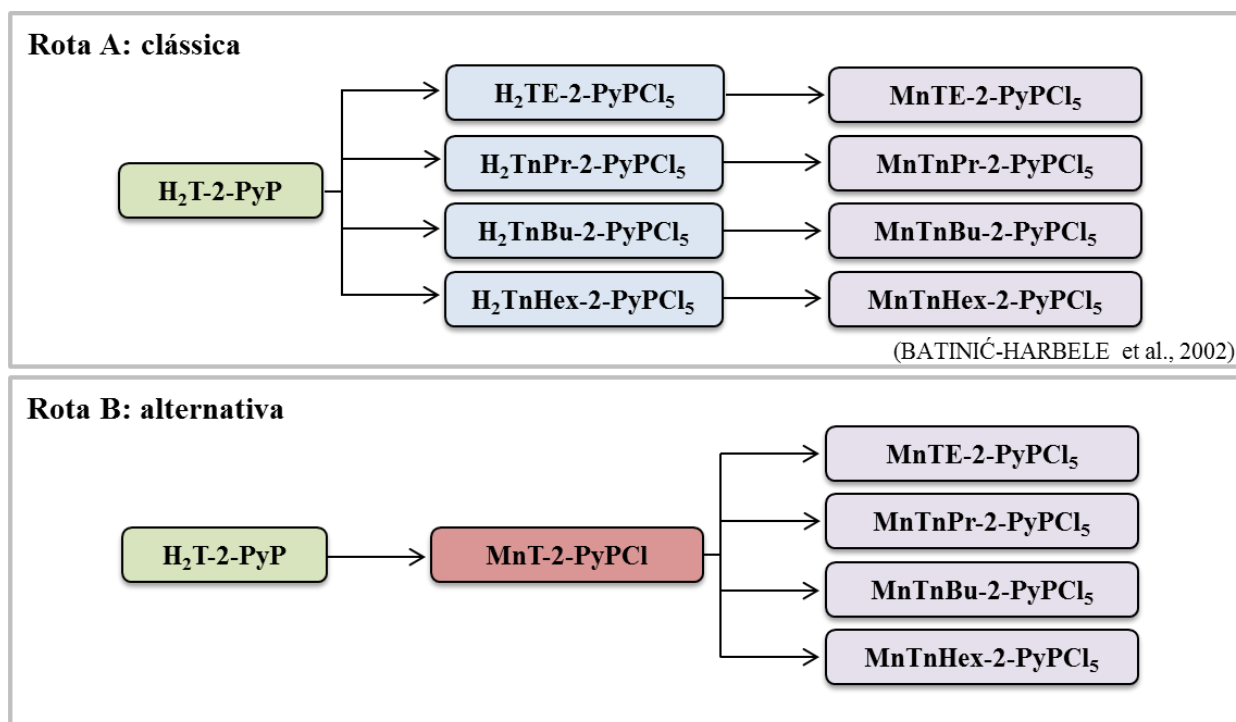


Figura 2.11 Rotas para obtenção de 2-*N*-alquilpiridinioporfirinas de Mn(III): a clássica (**Rota A**) e a alternativa, realizada neste trabalho (**Rota B**).

A síntese da MnTM-2-PyPCL pela rota alternativa (**Rota B**) foi realizada por Pinto (2013) como prova de conceito. Neste capítulo, as sínteses de outros dois derivados da MnT-2-PyPCL, com cadeias alquílicas maiores foram realizadas, a MnTE-2-PyPCL₅ e a MnTnHex-2-PyPCL₅, para testar a viabilidade, de fato, da rota proposta.

A metodologia de alquilação da MnT-2-PyPCL foi adaptada da metodologia clássica de alquilação da base livre H₂T-2-PyP (Batinić-Haberle *et al.*, 2002). As reações de alquilação também foram acompanhadas por meio de CCD-SiO₂ que evidenciaram a formação de compostos com valores de R_f (fator de retenção) menores que o do composto de partida MnT-2-PyPCL, o que é consistente com o aumento da polaridade associado à formação dos grupos *N*-alquilpiridínios catiônicos. Durante o progresso da reação, foram observadas múltiplas manchas na CCD, referentes às Mn-porfirinas parcialmente alquiladas (espécies mono, di, e tri-

alquiladas). Na alquilação da MnT-2-PyPcl com tosilato de *n*-hexila, devido à presença de atropoisômeros (isômeros rotacionais) no produto MnTnHex-2-PyP⁵⁺, ao término da reação observaram-se duas manchas na CCD; comparáveis com uma amostra padrão de MnTnHex-2-PyP⁵⁺. Essas duas manchas são atribuídas aos atropoisômeros (isômeros de rotação) – $\alpha\alpha\alpha\beta$ e $\alpha\alpha\beta\alpha$ – provenientes da restrição rotacional que os grupos *meso*-2-*N*-hexilpiridínio apresentam em relação ao plano porfirínico, devido a interação entre o grupo *N*-alquila e as posições β -pirrólicas da porfirina (todas as porfirinas com substituintes *meso* com substituintes *orto* ou *meta* arila ou piridil apresentam atropoisômeros, inclusive a MnTE-2-PyP⁵⁺).

Os tempos de reação para ambas as alquilações da MnT-2-PyPcl (Rota B) foram similares aos reportados para as alquilações da base livre H₂T-2-PyP (Rota A), com 25 h para a obtenção da MnTE-2-PyPcl₅ e 172 h para a MnTnHex-2-PyPcl₅. Assim como para as *N*-alquilações da H₂T-2-PyP (rota clássica), infere-se que o aumento do tempo de reação está associado ao impedimento estérico gerado pelo aumento das cadeias alquílicas.

Os rendimentos isolados obtidos pela Rota B investigada neste trabalho foram de 99% para a MnTE-2-PyPcl₅ e 93% para a MnTnHex-2-PyPcl₅. Para a síntese do derivado homólogo metilado, MnTM-2-PyPcl₅, investigada anteriormente pelo nosso grupo (Pinto, 2013; Falcão, 2016), também foram reportados rendimentos de ~90%.

O acompanhamento da reação foi realizado por CCD e espectroscopia UV-VIS. O monitoramento espectrofotométrico da reação explorou que os espectros da MnP alquilada em relação ao da MnT-2-PyPcl apresentam um deslocamento da banda Soret de ~8 nm para regiões de maior energia. A caracterização por espectroscopia eletrônica das MnPs (**APÊNDICE D**) sintetizadas são consistentes aos reportados na literatura (Pinto, 2013; Batinić-Haberle *et al.* 2002) – **Tabela 2.9**.

Tabela 2.9 Dados dos espectros eletrônico na região do UV-VIS em H₂O da MnT-2-PyP⁺ e da série de *N*-alquilpiridinioporfirinas de Mn(III): comparativo entre as porfirinas sintetizadas e as reportadas na literatura.

Porfirinas	λ /nm	ref
MnT-2-PyP ⁺	373, 395, 462 , 505, 556, 591, 770	a
	373,5; 395,5; 462,0 ; 503,5; 556,0; 770,5	c
MnTE-2-PyP ⁵⁺	363,5; 409; 454 ; 499; 558; 782	b
	363,5; 411,5; 454,0 ; 499,5; 558,0; 781,5	c
MnTnHex-2-PyP ⁵⁺	364,5; 415; 454,5 ; 507; 560; 780	b
	363,5; 413,5; 454,0 ; 503,0; 559,0; 780,5	c

^aPinto, 2013; ^bBatinić-Haberle *et al.* 2002.

Ao término da síntese, a MnTE-2-PyP⁵⁺ apresentou apenas uma mancha na placa CCD, cujo R_f = 0,06 concorda com o reportado na literatura (Kos, *et al.*, 2009b; Tovmasyan *et al.*, 2015b). Os R_fs obtidos ao término da síntese da MnTnHex-2-PyP⁵⁺ foram 0,46 – consistente com o R_f reportado por Tovmasyan e colaboradores (2015b) – e 0,35, que correspondem às misturas de atropoisômeros dessa MnP.

A obtenção das duas (MnTalquil-2-PyP)Cl₅ (MnTnHex-2-PyPCL₅ e MnTE-2-PyPCL₅) pelo método alternativo (**Rota B**) possibilitou a redução do número de etapas de sínteses/purificações em 25%. Adicionalmente, a síntese do intermediário de baixa hidrofília, permitiu uma gama de alterações na metodologia de purificação, que podem acarretar em menores custos, devido à redução do uso de reagentes de alto custo, como Aliquat, hexafluorofosfato de amônio e cloreto de tetrabutilamônio (compostos utilizados nas trocas iônicas nos processos de purificação das alquilações e metalações pela rota clássica).

A MnTnHex-2-PyPCL₅ foi armazenada em solução aquosa e após ~1,5 ano foi constatada, por CCD, a presença de pequenas quantidades de novas espécies que correspondem a uma desalquilação parcial da amostra. Não foram avaliadas degradações na amostra em tempos inferiores a esse, portanto, recomenda-se o armazenamento na fase sólida. Já a MnTE-2-PyPCL₅ foi armazenada tanto na forma sólida quanto em solução aquosa e nenhuma das amostras apresentou degradação (desmetalção ou desalquilação) após 1,5 ano de armazenamento.

Tentativas de alquilações da MnT-2-PyP⁺ com tosilatos de *n*-propila e *n*-butila também foram realizados, porém após mais de 80 horas as sínteses foram interrompidas e as MnPs não

havam sido completamente alquiladas. Tentativas de realquilação das amostras isoladas geraram desmetalação das MnPs. Situações semelhantes foram reportadas por outros membros do grupo, indicando a sensibilidade dessas MnPs catiônicas às condições de alquilação com tosilatos de alquila em DMF a 105 °C. Supõe que a presença de água no sistema possa levar à hidrólise dos tosilatos, gerando ácido p-toluenosulfônico, e, associada à decomposição térmica normal da DMF (em CO + HNMe₂), pode gerar um sistema redutor já bem caracterizado nos sistemas à base de Ru-porfirinas (Rebouças *et al.*, 2008c); a redução *in situ* de Mn(III)- a Mn(II)-porfirinas, seguida de solvólise ácida, poderia explicar a desmetalação parcial da MnP durante a tentativa de reprocessamento das MnPs catiônicas. Destaca-se que Mn(II)-porfirinas são sabidamente instáveis à solvólise ácida (Hambright, 1977).

2.5 CONCLUSÕES

Os estudos quimiométricos, realizados com planejamento de Doehlert, para explorar condições para a síntese da MnT-2-PyPcl utilizando meio aquoso ácido foram realizados utilizando como resposta o tempo necessário para formação de 50% da MnT-2-PyP. A partir das respostas, foi construído um modelo de regressão que apontou para alta influência de fatores como o excesso molar de Mn^{2+} e a interação entre temperatura e o excesso molar de Mn^{2+} .

Dos resultados obtidos no estudo em pequena escala, do planejamento quimiométrico e experimento extra, foram selecionados dois experimentos XII e E2 para preparação da MnT-2-PyPcl em maior escala por uma rota com menor impacto ambiental, sendo desenvolvida também uma metodologia de purificação sem utilização de solventes orgânicos. Os rendimentos isolados foram, em média, 84%.

A síntese de 2-*N*-alquilpiridínioporfirinas de Mn(III) (MnTalquil-2-PyP⁵⁺) *via* uma rota alternativa (**Rota B**), proposta por Pinto (2013), partindo da MnT-2-PyPcl foi ampliada nesse Capítulo com a síntese da MnTE-2-PyP⁵⁺ e MnTnHex-2-PyP⁵⁺, obtendo-se rendimentos isolados superiores a 90%. A escolha da rota alternativa, em comparação à rota clássica (**Rota A**), para obtenção dessas MnPs reduz o número de etapas de síntese e de purificação, reduzindo, assim, os custos.

CAPÍTULO 3: Estudo de Mn-porfirinas como modelo de glutational/tiol peroxidase e oxidase

3.1 INTRODUÇÃO

A oxidação e redução de tióis, livres ou pertencentes a estrutura de proteínas no organismo estão associadas ao controle redox da homeostase e mecanismos de sinalização celular (Buckberry e Teesdale-Spittle, 1996; Flohé, 2015). A glutational é o tiol não-proteico mais importante das células de mamíferos, de algumas plantas e de bactérias. Presente no organismo em concentrações milimolar ($0,5 - 10 \text{ mmol L}^{-1}$), a maior parte da glutational encontra-se na forma de tiol livre, mas pode estar presente também em combinações com proteínas (GS-proteína) e em sua forma oxidada (GSSG) (Buckberry e Teesdale-Spittle, 1996; Meister; Anderson, 1983).

A conversão entre as formas oxidada e reduzida da glutational e de outros tióis é controlada por diversas enzimas como as tiol peroxidases que são constituídas pelas glutational peroxidase (GPx) e a peroxirredoxinas (Prx) (Flohé, 2015). As tiol peroxidase podem utilizar como agente oxidante um amplo espectro de hidroperóxidos, seja o peróxido de hidrogênio, os hidroperóxidos orgânicos primários, secundários e terciários ou o peroxinitrito (Flohé *et al.*, 2011). As tiol peroxidase reduzem o hidroperóxido (H_2O_2 ou peróxido orgânico – ROOH), utilizando como cofator tióis de baixa massa molecular, como a glutational, ou proteínas com resíduos reativos de cisteína *via* mecanismo de substituição enzimática (Meister; Anderson, 1983; Flohé, 2015).

As enzimas da família da glutational peroxidase (GPx), são selenoproteínas, cujo átomo de selênio está presente no sítio ativo da enzima como selenocisteína, isto é, uma cisteína (R–SH) no qual o átomo de S foi substituído por um Se (R–SeH). Essa enzima é responsável pela redução de hidroperóxidos, utilizando a GSH como cofator. O ciclo catalítico proposto para a GPx (**Fig. 3.1**) é dividido em três etapas: **1)** A enzima na forma selenol (E–SeH) do resíduo da selenocisteína, reduz o hidroperóxido (ROOH) a água (ou álcool) sendo oxidada a ácido selênico (E–SeOH). **2)** O E–SeOH reage, na sequência, com um equivalente da GSH gerando o selenil dissulfeto (E–SeSG). **3)** Por fim, um segundo equivalente de GSH ataca o enxofre da E–SeSG regenerando o sítio ativo pela eliminação da GSSG (Meister; Anderson, 1983; Mugesh *et al.*, 2001; Flohé *et al.*, 2011; 2015).

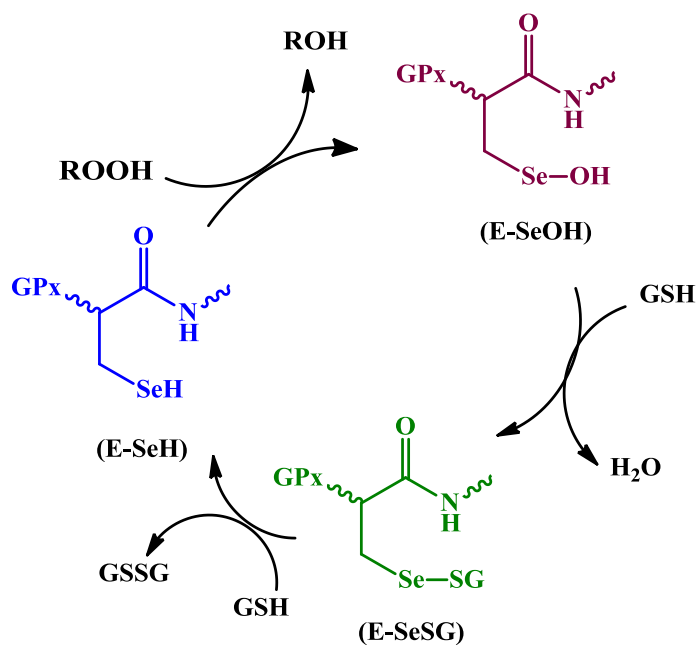


Figura 3.1 Ciclo catalítico da enzima glutathione peroxidase (GPx) (adaptado de Mughesh *et al.*, 2001).

A oxidação da GSH pode ser catalisada também por outra enzima, a glutathione oxidase (GO), a qual utiliza O_2 como aceptor de elétrons, obtendo como produtos o GSSG e H_2O_2 . A regeneração da GSH, em seu ciclo metabólico redox, ocorre através da redução da glutathione oxidada (GSSG) a GSH via reação enzimática da glutathione redutase (GR), que utiliza como cofator a molécula nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) (**Fig. 3.2**) (Meister; Anderson, 1983).

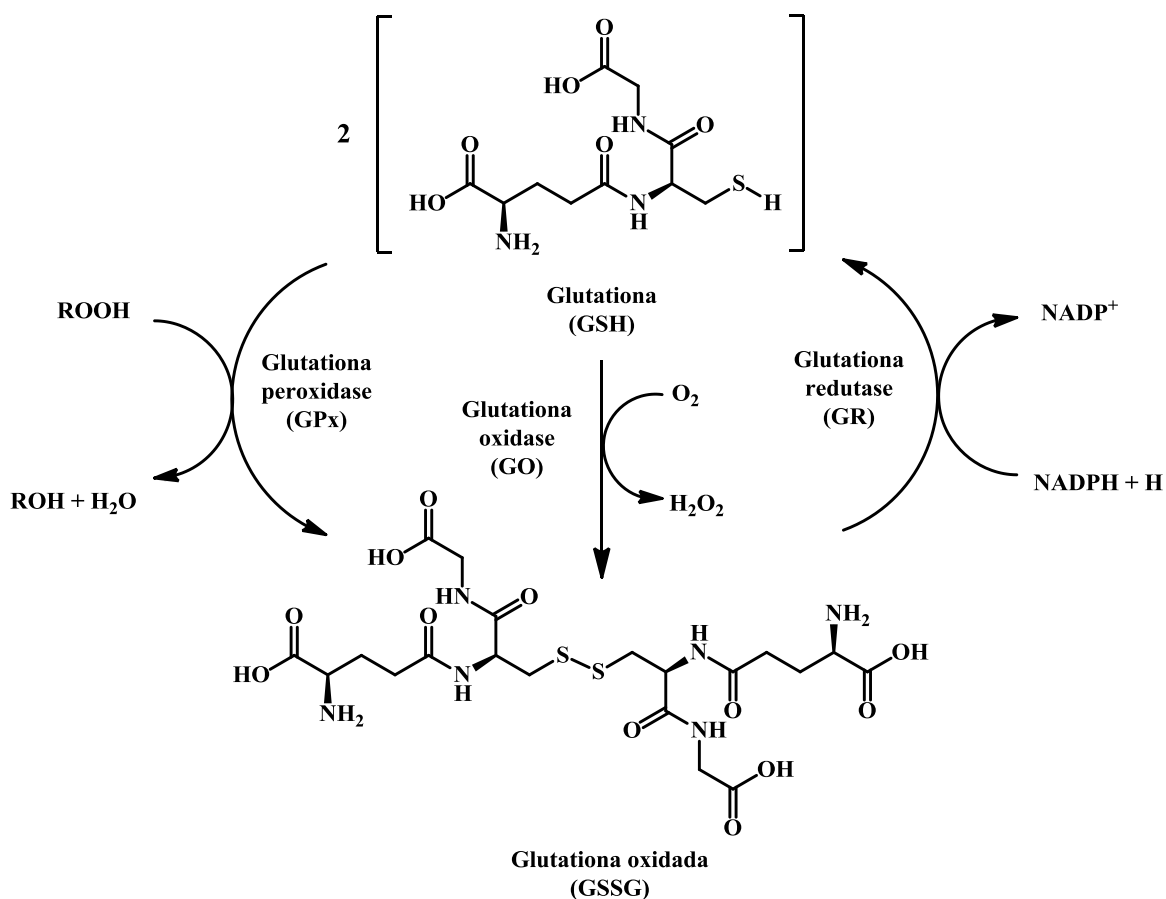


Figura 3.2 Ciclo redox da glutatona: interconversão entre suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação enzimática da glutatona peroxidase (GPx), glutatona oxidase (GO) e glutatona redutase (GR). ROOH refere-se a um peróxido orgânico ou H₂O₂ e ROH refere-se ao respectivo álcool ou H₂O, caso R=H (adaptado de Rover Júnior *et al.*, 2001).

A determinação de atividade GPx/tiol-oxidase de candidatos a mímicos pode ser realizada pelo método espectrofotométrico da medida indireta da oxidação do NADPH, em meio aquoso tamponado, em sistema contendo NADPH, GR, GSH e hidroperóxido (H₂O₂ ou peróxido orgânico – ROOH). Devido à reação paralela da glutatona redutase no ciclo redox (**Fig. 3.2**), pode-se correlacionar a oxidação da GSH através da oxidação do NADPH, sendo o decaimento da absorbância a 340 nm referente a oxidação de NADPH a NADP⁺ (Carlberg *et al.*, 1975).

Dado a gama de reações prováveis das Mn-Porfirinas no organismo, a investigação da reatividade de diferentes MnPs com tióis, tal como a GSH, por meio do estudo da atividade GPx pode contribuir para a compreensão de alguns efeitos observados nos estudos *in vivo* desses compostos, uma vez que a capacidade de catalisar a oxidação/S-glutationilação de

proteínas significa que as MnPs podem modular a rede de sinalização celular, contribuindo para sua ação terapêutica.

Os primeiros indícios de reatividade desses complexos de Mn como pró-oxidantes em sistemas biológicos foram apontados pelo grupo de Piganelli, sugerindo que as MnPs atuavam na oxidação das cisteínas da subunidade p50 do fator de transcrição NF- κ B (Tse *et al.* 2004). Desde então, inúmeros estudos com MnPs apontam para indícios da oxidação/S-glutationilação de grupos tióis de proteínas NF- κ B, p38 MAPK, Keap1 e fosfatase 2A, entre outros (Batinić-Haberle *et al.*, 2018; Batinić-Haberle; Tome, 2019; Tovmasyan *et al.*, 2016; Tong *et al.*, 2016). *In vitro*, a reatividade das MnPs catiônicas, usualmente desenvolvidas como mímicos de SOD, foi investigada com compostos tiolados, como a glutatona, *N*-acetilcisteína e com resíduos de cisteína (cys-62) da subunidade p50 do fator de transcrição NF- κ B (em meio livre de GSH) (Faulkner *et al.*, 1994; Ferrer-Sueta *et al.*, 1999; Tovmasyan *et al.*, 2012; Tse *et al.*, 2004; Araújo-Chaves *et al.*, 2011; Batinić-Haberle *et al.*, 2018). Estudos de Jaramillo e colaboradores (2012; 2015) em meio celular de linfoma, apontaram para a reação da MnTE-2-PyP⁵⁺ com glutatona e outros tióis em proteínas específicas (subunidades p65 do NF- κ B). Nesses sistemas, a MnP utiliza H₂O₂ e glutatona (GSH) para catalisar a S-glutationilação de proteínas de sinalização, atuando tanto como tiol oxidase quanto como glutatona peroxidase, o que pode, por sua vez, acarretar apoptose celular (Jaramillo *et al.*, 2012; 2015).

3.2 OBJETIVOS

O objetivo geral desse estudo foi investigar a atividade catalítica de uma série de Mn-porfirinas, comumente estudadas como moduladores redox, como mímico da glutatona peroxidase e comparar estes resultados com outros compostos redox-ativos de interesse terapêutico.

Para tanto, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Investigar a atividade catalítica da MnTE-2-PyP⁵⁺ na oxidação da glutatona, bem como a influência do oxigênio e pH do meio.
- Investigar a oxidação da glutatona, em modelo de glutatona peroxidase, para uma série de compostos redox-ativos, à base de Mn-porfirinas sintéticas (**Fig. 3.3**), em comparação com diferentes classes de compostos comumente estudados como mímicos SOD, agentes redox-ativos e mímicos de GPx (**Fig. 3.4**).

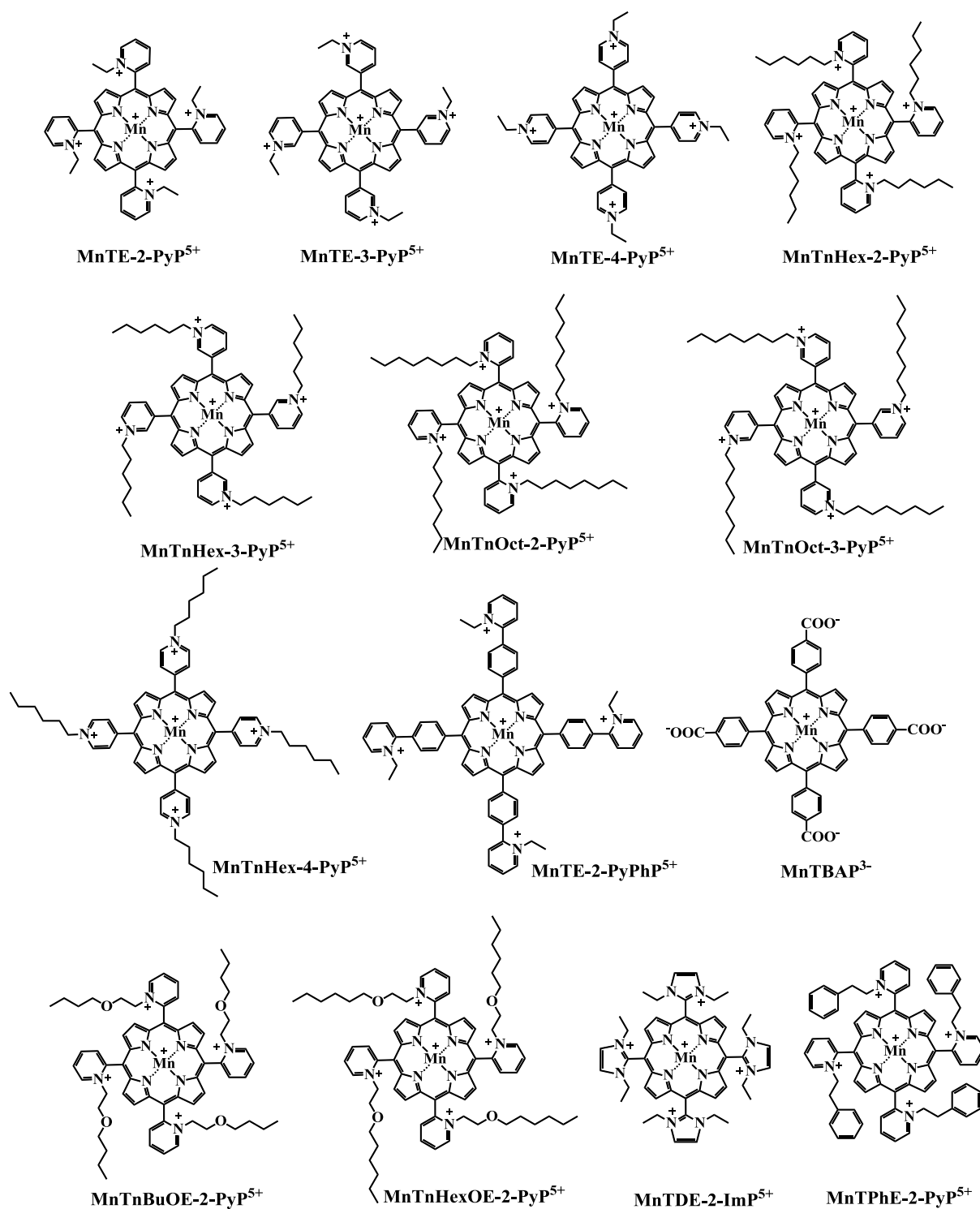


Figura 3.3 Estrutura das Mn-porfirinas *meso*-substituídas estudadas como mímico da Glutathione peroxidase.

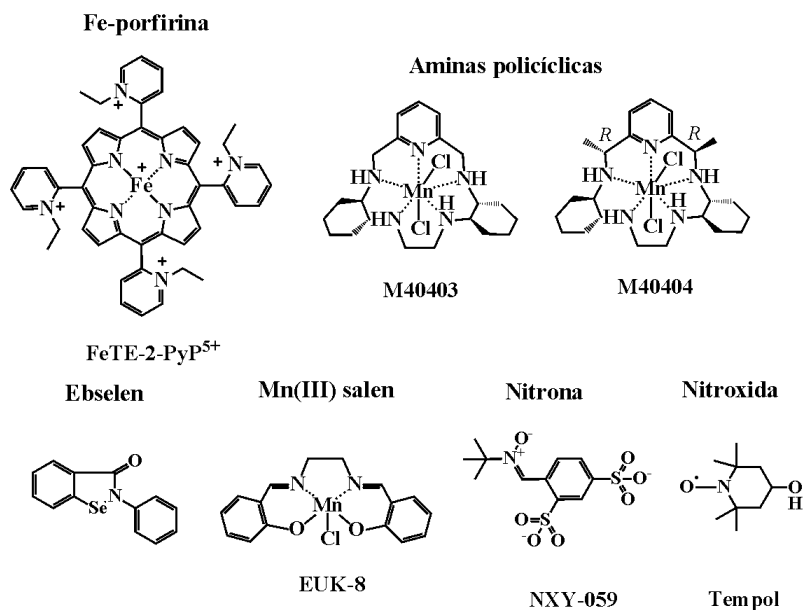


Figura 3.4 Estrutura de compostos redox-ativos comumente usados como modelos de SOD ou mímicos de glutationa peroxidase (GPx).

- Investigar, através de estudos espectrofotométrico e eletroquímico, a capacidade de alguns compostos redox-ativos (MnTBAP^{3-} , MnTE-2-PyPhP^{5+} , MnTE-3-PyP^{5+} , MnTE-2-PyP^{5+} , MnTPhE-2-PyP^{5+} , $\text{MnTnHexOE-2-PyP}^{5+}$ e $\text{MnTnOct-2-PyP}^{5+}$, ebselen e FeTE-2-PyP^{5+}) de catalisar a oxidação da glutationa utilizando outro peróxido, o *t*-BuOOH, como agente oxidante.
- Avaliar a reatividade da MnTE-2-PyP^{5+} na oxidação de outros tióis (pNBT, Cys, NAC e DTT) (**Fig. 3.5**) em modelo tiol peroxidase/ oxidase.

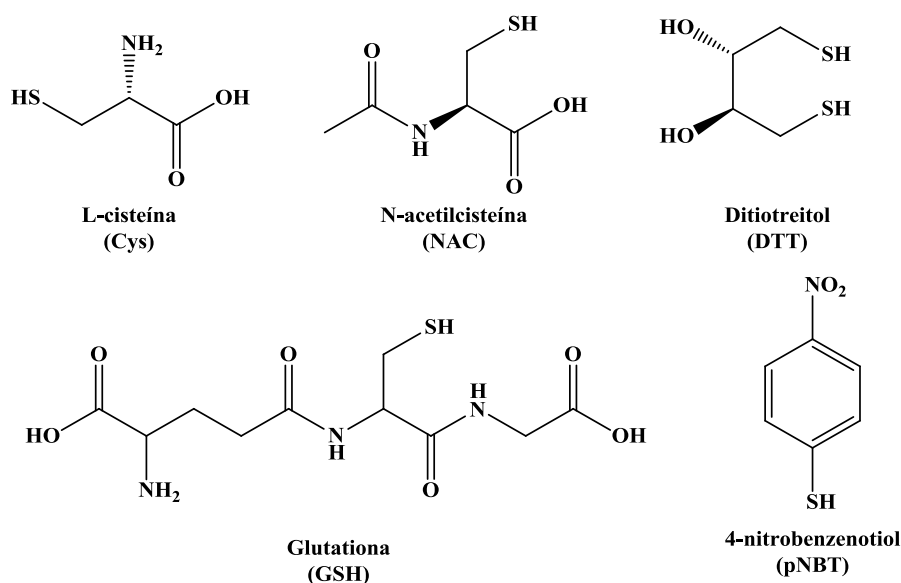


Figura 3.5 Estrutura dos tióis utilizados nesse capítulo em estudo da reatividade da MnTE-2-PyP^{5+} com

diversos tióis em modelo tiol peroxidase/ oxidase.

3.3 PARTE EXPERIMENTAL

3.3.1 Reagentes e solventes

MnPs, Fe-porfirinas e o Mn(salen), EUK-8, utilizados nesse trabalho foram preparados segundo os procedimentos descritos na literatura (Batinić-Haberle *et al.*, 2002; 2004; Spasojević *et al.*, 2001; Rajić *et al.*, 2012; Tovmasyan *et al.* 2013a; 2014a). As poliaminas cíclicas de Mn(II) (M40403 e M40404) foram sintetizadas conforme procedimento descrito por Aston *et al.* (2001).

A nitrona NXY-059 foi adquirida da Selleckchem, a nitroxida e o tempol foram obtidos da empresa Enzo. O cloreto de manganês (II) tetraidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) foi adquirido da Sigma-Aldrich. A Glutathione peroxidase (GPx) de eritrócitos bovino e a Glutathione reductase (GR) foram compradas da Sigma, NADPH da Merck, e o ebselen foi adquirido da Cayman Chemical Company. A N-acetil-L-cisteína (NAC) foi adquirida da Amresco, DL-Ditiotreitol (DTT) da Sigma, cloridrato de L-cisteína monohidrato (Cys) da Alfa Aesar, o *p*-nitrobenzenotiol (pNBT) foi adquirido da Matrix Scientific e a glutathione (GSH), o hidroperóxido de *tert*-butila (*t*-BuOOH), 70%, e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), 30%, foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O tris-(hidroximetil)-aminometano (Tris) foi utilizado como agente tamponante, previamente tratado com resina de troca iônica Chelex-100, 200–400 mesh, forma Na^+ , Bio-Rad Life Science. Os demais compostos foram usados como recebidos, sem purificação adicional.

3.3.2 Equipamentos

Os espectros eletrônicos de absorção na região do UV-VIS (300-800 nm) foram registrados em espectrofotômetro da marca Shimadzu (modelo UV-1800), com resolução de 0,5 nm, utilizando-se cubetas de vidro com caminho óptico de 10 mm. Já os dados eletroquímicos foram adquiridos utilizando o potenciostato CH Instruments modelo 600, acoplado a um eletrodo de Clark seletivo para O_2 .

3.3.3 Medidas espectrofotométricas

3.3.3.1 Determinação da taxa de oxidação do NADPH

O procedimento para determinação da oxidação do NADPH foi adaptado de Wilson *et al.*, 1989. Em um cubeta de vidro, contendo solução $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de Tris (pH 7,4) adicionaram-se as soluções de GSH, NADPH, GR e o composto redox-ativo de interesse (Mn-porfirina, EUK-8, etc), e em seguida o sistema foi homogeneizado. Os volumes de soluções utilizados

foram de tal modo que as concentrações finais na cubeta fossem: 0,5 mmol L⁻¹ de H₂O₂, 1 mmol L⁻¹ de GSH, 1 unidade¹/mL de GR, 0,2 mmol L⁻¹ de NADPH, com a concentração do composto redox ativo variando de 0 (controle) a 10 µmol L⁻¹. Em seguida, foi adicionada a solução de H₂O₂, o sistema foi novamente homogeneizado e a variação de absorbância em 340 nm (referente à oxidação do NADPH) foi acompanhada no espectrofotômetro por 100 s. Os experimentos para determinação das velocidades iniciais de oxidação do NADPH, $v_o(\text{NADPH})_{\text{ox}}$, foram medidos em condições aeróbicas a 25±1 °C. A absorvidade molar do NADPH foi reavaliada, obtendo-se: $\epsilon_{340} = 6200 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. As velocidades iniciais, $v_o(\text{NADPH})_{\text{ox}}$ (µmol L⁻¹ min⁻¹), foram calculadas baseando-se nos traços cinéticos obtidos para os primeiros 60 s. A velocidade da reação não-catalisada do NADPH foi subtraída dos valores de velocidades iniciais das reações catalisadas.

Para os estudos anaeróbios, o tampão e todas as soluções foram purgadas com N₂. As análises em meio ácido foram realizadas com solução de tampão Tris-HCl (pH 4,2) a 0,05 mol L⁻¹.

3.3.3.2 Acompanhamento espectrofotométrico da reação ao longo do tempo

As mudanças espectrais do sistema contendo MnP (10 µmol L⁻¹) foram acompanhadas espectrofotometricamente, na presença (ou ausência) de GSH (1 mmol L⁻¹), H₂O₂ (0,5 mmol L⁻¹), em pH 7,4 (ou 4,2) em tampão tris (0,05 mmol L⁻¹). Os espectros foram registrados no intervalo de 300-800 nm, a cada 1 minuto por 30 minutos.

3.3.4 Estudo eletroquímico dos níveis de oxigênio

Os procedimentos realizados para o estudo eletroquímico foram adaptados de Tovmasyan *et al.*, 2015a; 2015b.

3.3.4.1 Consumo de oxigênio durante o ciclo MnP/peróxido/tiol

Os experimentos foram realizados a 25 ± 1 °C em sistema aeróbio fechado utilizando eletrodo de Clark contendo tampão Tris a 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,4) em solução saturada de ar (21% oxigênio). O eletrodo de Clark sensível ao O₂ (contendo como solução de preenchimento KCl 0,1 mol L⁻¹) 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 $[\text{O}_2] =$

¹ 1 unidade (µmol/min) é definida como a quantidade de enzima que catalisa a conversão de um µmol de substrato, no caso NADPH, por minuto.

0,255 mmol L⁻¹ em solução saturada de ar (Benson *et al.*, 1980)), a solução de H₂O₂ foi adicionada, seguida da adição da solução de tiol e, após 100 segundos, a solução de MnP foi adicionada. Os volumes das soluções foram ajustados de modo que a concentração na cela de medida fosse 0,5 mmol L⁻¹ de H₂O₂, 1 mmol L⁻¹ de tiol (NAC, L-Cys, DTT ou pNBT) e 10 µmol L⁻¹ de MnP (MnTBAP³⁻, MnTE-2-PyPhP⁵⁺, MnTE-3-PyP⁵⁺, MnTE-2-PyP⁵⁺, MnTPhE-2-PyP⁵⁺, MnTnHexOE-2-PyP⁵⁺ ou MnTnOct-2-PyP⁵⁺). O decréscimo na corrente, I_{obs} , correspondente ao decréscimo na concentração de O₂, $\Delta[O_2]$, foi acompanhado por pelo menos 300 s. Em seguida, o sistema foi purgado com N₂ até que a corrente estabilizasse (I_{min} , correspondente a $[O_2] \approx 0$ mmol L⁻¹). Isso possibilitou o cálculo da concentração de O₂ em solução (em nmol L⁻¹), uma vez que: $[O_2]_{obs} = [(I_{obs} - I_{min}) \times 2,55 \times 10^5] / (I_{máx} - I_{min})$, onde I_{obs} é o valor para a corrente em qualquer dado momento da medida. A velocidade inicial da reação, $v_0 = -\Delta[O_2]_{obs} / \Delta t = -[(I_{obs2} - I_{obs1}) \times 2,55 \times 10^5] / [(I_{máx} - I_{min}) \times (t_{obs2} - t_{obs1})]$, onde I_{obs2} e I_{obs1} são os valores da corrente nos tempos observados, t_{obs2} e t_{obs1} , relacionados a um intervalo linear de 60 s após a adição da MnP. Além da ordem de adição citada acima (H₂O₂/tiol/MnTE-2-PyP⁵⁺) foram realizadas outras medidas com outras ordens de adição, como tiol/MnTE-2-PyP⁵⁺ e H₂O₂/MnTE-2-PyP⁵⁺, respeitando as concentrações supracitadas dos compostos na cela de medida (ou seja, 0,5 mmol L⁻¹ de H₂O₂, 1 mmol L⁻¹ de tiol e 10 µmol L⁻¹ de MnP). Foram realizadas também medidas para o sistema H₂O₂/GSH/MnTE-2-PyP⁵⁺, nas concentrações supracitadas, mas em meio ácido, com tampão Tris em pH 4,2.

As análises dos níveis de oxigênio utilizando o *t*-BuOOH como oxidante foram realizados conforme o procedimento descrito para o H₂O₂. As medidas do consumo de oxigênio para o *t*-BuOOH foram feitas com a MnTE-2-PyP⁵⁺ como catalisador e GSH como substrato. Foram registradas as seguintes medidas: *t*-BuOOH /GSH/MnTE-2-PyP⁵⁺ e *t*-BuOOH /MnTE-2-PyP⁵⁺. Os volumes das soluções foram ajustados de modo que a concentração na cela de medida fosse 0,5 mmol L⁻¹ de *t*-BuOOH, 1 mmol L⁻¹ de GSH e 10 µmol L⁻¹ de MnTE-2-PyP⁵⁺.

3.3.4.2 Geração de oxigênio, em meio anaeróbio, durante o ciclo MnP/peróxido/tiol

Os experimentos foram realizados com o eletrodo de Clark a 25 ± 1 °C em pH 7,4 em um sistema fechado. Antes das medidas, as soluções foram saturadas com ar (~21% oxigênio). O eletrodo de Clark sensível ao O₂ (0,1 mol L⁻¹ de 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 $[O_2] = 0,255$ mmol L⁻¹ em solução saturada de ar (Benson *et al.*, 1980)), a solução foi purgada com N₂ até a corrente

estabilizar novamente ($I_{\min}$, correspondente a $[O_2] \approx 0 \text{ mmol L}^{-1}$). Peróxido de hidrogênio foi adicionado, seguido da adição de tiol e, após 100 segundos, a solução de MnP foi adicionada. A corrente em função do tempo foi acompanhada por pelo menos 500 s. Outra ordem de adição também foi realizada com a adição de peróxido de hidrogênio, seguida de MnP e, após 100 segundos, foi adicionada a solução de GSH. Os volumes das soluções foram ajustados de modo que a concentração na cela de medida fosse $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de H_2O_2 , 1 mmol L^{-1} de tiol (NAC, Cys, DTT ou pNBT) e $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de MnP (MnTBAP³⁻, MnTE-2-PyPhP⁵⁺, MnTE-3-PyP⁵⁺, MnTE-2-PyP⁵⁺, MnTPhE-2-PyP⁵⁺, MnTnHexOE-2-PyP⁵⁺ ou MnTnOct-2-PyP⁵⁺). Além disso foram realizadas medidas para o sistema H_2O_2 /GSH/MnTE-2-PyP⁵⁺ e H_2O_2 /MnTE-2-PyP⁵⁺/GSH, nas concentrações supracitadas, em meio ácido, com tampão Tris em pH 4,2.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 MnTE-2-PyP⁵⁺ como catalisador da oxidação da glutathiona

Apresenta-se nesse capítulo o estudo da oxidação da glutathiona, em modelo de glutathiona peroxidase, pela MnTE-2-PyP⁵⁺, uma das mais notáveis Mn-porfirinas da classe das *meso-N*-alquil-2-piridinioporfirinas de Mn(III), utilizada em diversos estudos não-clínicos e clínicos associados ao estresse oxidativo (Batinić-Haberle, *et al.*, 2018; Batinić-Haberle; Tome, 2019; Borgstahl; Oberley-Deegan, 2018).

A eficiência catalítica da MnTE-2-PyP⁵⁺ na oxidação da glutathiona em modelo glutathiona peroxidase foi determinada indiretamente pelo acompanhamento espectrofotométrico da oxidação do NADPH; o decaimento da intensidade de absorbâncias do NADPH em 340 nm foi acompanhado ao longo do tempo, usando diferentes concentrações da MnP (**Fig. 3.6**). As medidas realizadas com concentração de MnTE-2-PyP⁵⁺ igual a zero se referem à reação não-catalisada de oxidação do NADPH. Observou-se que a absorbância ao longo do tempo diminuiu evidenciando o consumo do NADPH e a inclinação das retas indicaram que o aumento da concentração da MnTE-2-PyP⁵⁺ acelerou a oxidação do NADPH, que está ligado a oxidação da glutathiona (**Fig. 3.2**), portanto, quanto mais inclinada a reta mais rápida foi a oxidação da glutathiona, logo maior a atividade GPx. A partir desses dados, usando a lei de Beer, as absorbâncias foram convertidas em concentrações e foram calculadas as velocidades iniciais de oxidação do NADPH, $v_0(\text{NADPH})_{\text{ox}}$, obtendo-se o valor de $64,9 \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ para a concentração de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MnTE-2-PyP⁵⁺, que corresponde ao equivalente de 0,37% da atividade da enzima GPx (em análise realizada sob mesmas condições e $v_0(\text{NADPH})_{\text{ox}}$ calculado para $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ da enzima).

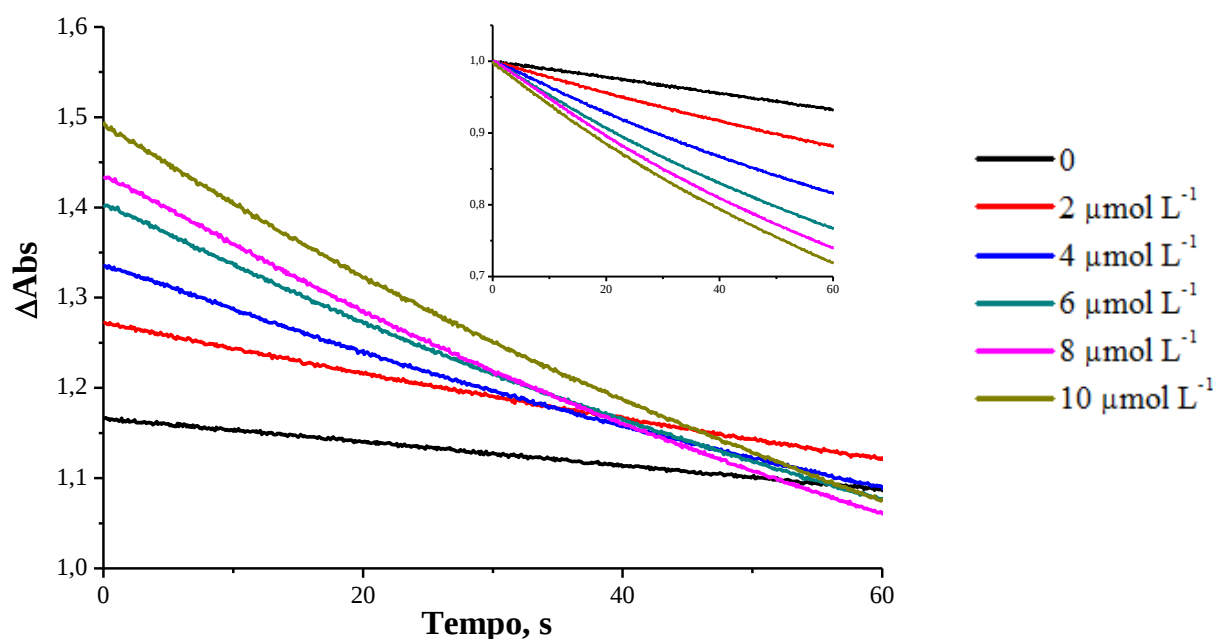


Figura 3.6 Estudos espectrofotométricos da oxidação da glutatona catalisada pela MnTE-2-PyP⁵⁺: Acompanhamento do decaimento da absorvância do NADPH (340 nm) ao longo do tempo, utilizando concentrações de MnP variando de 0 a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Em destaque as curvas normalizadas pelos seus valores máximos.

Posteriormente, com o intuito de avaliar a eficiência catalítica da MnP sob diferentes condições relevantes para os sistemas biológicos, foram investigados os efeitos do pH e do O₂ sobre a atividade glutatona peroxidase da MnTE-2-PyP⁵⁺ por meio de experimentos espectrofotométricos e eletroquímicos. O efeito do pH (4,2 versus 7,4) sobre a velocidade inicial de oxidação do NADPH foi avaliado espectrofotometricamente (**Fig. 3.7**).

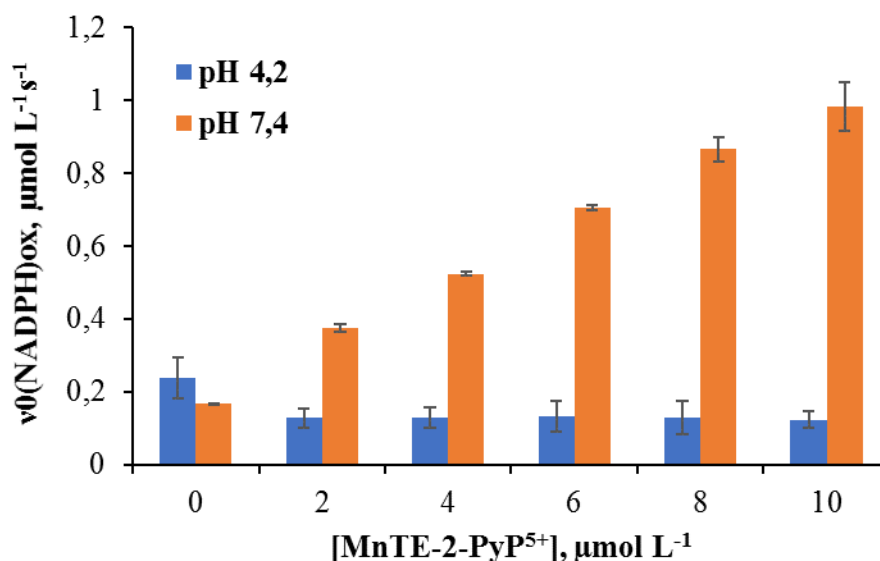


Figura 3.7 Estudos espectrofotométricos da oxidação da glutathiona catalisada pela MnTE-2-PyP⁵⁺ e sua dependência com o pH: Velocidades iniciais de oxidação do NADPH em diferentes valores de pH. Experimentos realizados em duplicata.

A velocidade inicial da oxidação do NADPH, que corresponde indiretamente a uma representação da atividade GPx, aumentou com a concentração de MnP em meio fisiológico típico, aproximadamente neutro (pH 7,4). Já em meio ácido (pH 4,2) não se observou atividade GPx neste sistema. Sendo o pK_a da GSH ~8,8 (Winterboun *et al.*, 1999), em pH ácido a molécula apresenta-se essencialmente em sua forma protonada; já em pH perto da neutralidade, por exemplo 7,4, há uma fração de glutathiona na forma desprotonada (GS⁻). Supõe-se que, em nosso sistema contendo MnP como catalisador da oxidação da glutathiona, a reação que leve à formação da glutathiona oxidada (GSSG), passe pela formação do radical GS[•], cuja formação é facilitada na glutathiona desprotonada (GS⁻) como forma reativa (Batinić-Haberle *et al.*, 2014).

A atividade catalase da MnTE-2-PyP⁵⁺ pode ser analisada eletroquimicamente, em meio anaeróbico, por coloumetria utilizando um eletrodo de O₂ de Clark, ligado a um potenciostato. Nos experimentos na presença de H₂O₂, se a MnP catalisar o desproporcionamento do H₂O₂ a H₂O e O₂, como um modelo de catalase, a produção de oxigênio resulta em um aumento de corrente (**Fig. 3.8**) (Tovmasyan *et al.*, 2015a).

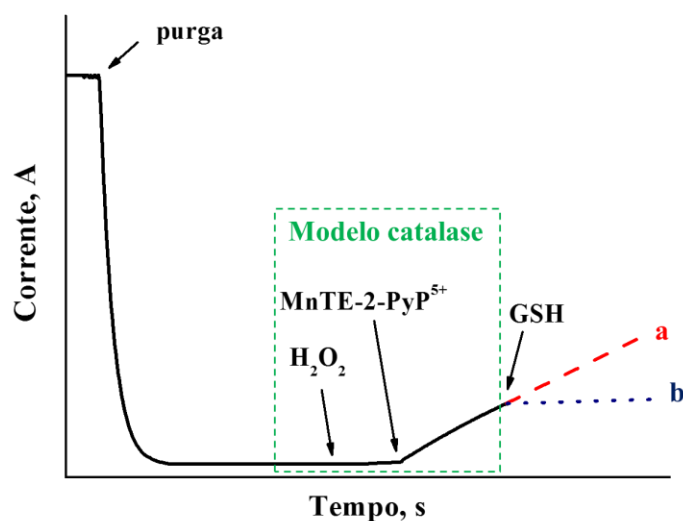


Figura 3.8 Esquema da análise eletroquímica dos níveis de oxigênio no sistema $\text{H}_2\text{O}_2/\text{MnP}/\text{GSH}$, sob condições iniciais anaeróbicas: **situação a)** predominância da atividade catalase sobre a atividade glutatona peroxidase; **situação b)** predominância da atividade glutatona peroxidase sobre a atividade catalase.

A adição de GSH a esse sistema ($\text{MnP} + \text{H}_2\text{O}_2$) pode gerar duas situações: **a)** prevalecendo o aumento dos níveis de oxigênio, indicando a predominância da atividade catalase sobre a atividade glutatona peroxidase; **b)** nível de O_2 constante, caso a atividade GPx seja predominante, visto que, no modelo glutatona peroxidase a oxidação do substrato (GSH) pelo oxidante (H_2O_2), produz GSSG e H_2O (**Fig. 3.2**), não havendo produção nem consumo de O_2 . No entanto, no estudo eletroquímico sob condições anaeróbicas (**Fig. 3.9**) observou-se que a adição de GSH ao sistema contendo MnP e peróxido de hidrogênio (modelo catalase) ocasionou a diminuição da corrente ao longo do tempo, indicando consumo de O_2 pelo sistema.

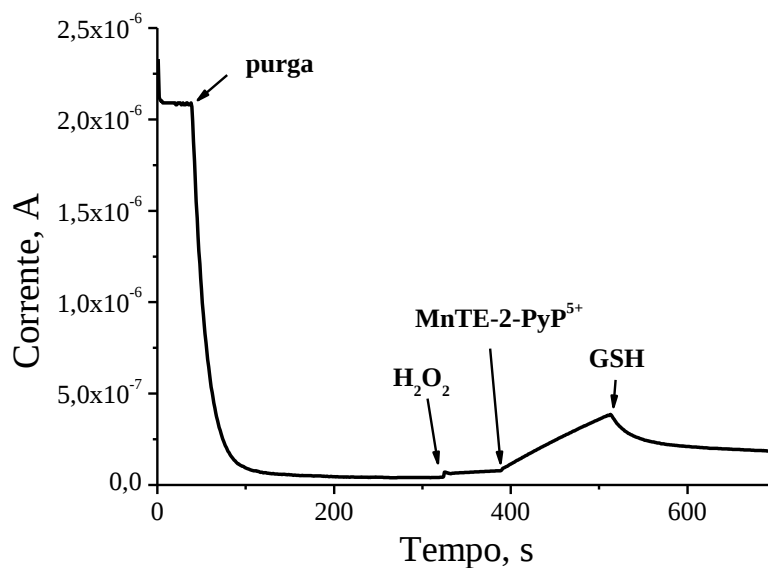


Figura 3.9 Análise eletroquímica dos níveis de oxigênio no sistema $\text{H}_2\text{O}_2/\text{MnP}/\text{GSH}$, sob condições iniciais anaeróbicas: predominância da atividade glutatona (per)oxidase sobre a atividade catalase. Experimento realizado em pH 7,4, tampão tris, $25 \pm 1^\circ\text{C}$. As concentrações foram ajustadas conforme o modelo catalase (Tovmasyan *et al.*, 2015a): $\text{H}_2\text{O}_2 = 1 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{GSH} = 2 \text{ mmol L}^{-1}$; $\text{MnTE-2-PyP}^{5+} = 20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

Desse modo, evidenciou-se a participação do O_2 na oxidação da glutatona sugerindo a existência de uma mistura de atividades de glutatona peroxidase (H_2O_2 como oxidante) e glutatona oxidase (O_2 como aceptor final de elétrons). Esses dados revelam que a presença da glutatona no sistema cessa a atividade catalase da MnP indicando que há predominância da oxidação da glutatona sobre a dismutação do peróxido de hidrogênio. Portanto, *in vivo*, supõe-se que dada a concentração milimolar de glutatona, a atividade catalítica de oxidação da glutatona da MnTE-2-PyP^{5+} é predominante em relação à atividade catalase.

As análises do nível de oxigênio em pH 7,4 para o sistema $\text{H}_2\text{O}_2/\text{GSH}/\text{MnTE-2-PyP}^{5+}$ (**Fig. 3.10**) em meio aeróbio concordaram com os resultados em meio inicialmente anaeróbio (**Fig. 3.9**) demonstrando a participação de oxigênio na oxidação da glutatona e possivelmente uma mistura de atividades glutatona oxidase e peroxidase.

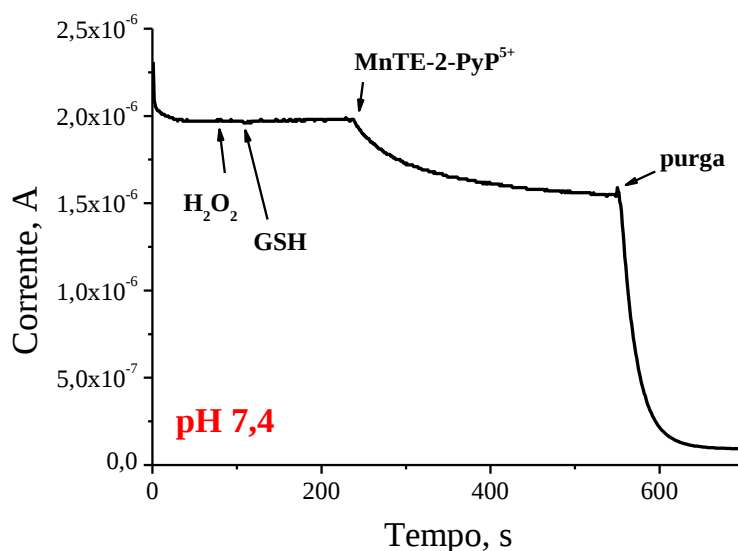


Figura 3.10 Monitoramento eletroquímico do consumo de oxigênio em modelo de glutathione (per)oxidase em meio aeróbio neutro (pH 7,4). Experimentos realizados em tampão Tris, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, nas concentrações: $\text{H}_2\text{O}_2 = 0,5 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{GSH} = 1 \text{ mmol L}^{-1}$; $\text{MnTE-2-PyP}^{5+} = 10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

No acompanhamento eletroquímico do nível de O_2 para o sistema em pH 7,4 contendo apenas $\text{GSH/MnTE-2-PyP}^{5+}$ (**Fig. 3.11**) também foi observado o leve consumo de oxigênio, indicando que mesmo na ausência de H_2O_2 há interação entre a MnP e a glutathione. Com isso, supõe-se que a Mn(III)P catalisa a oxidação da glutathione utilizando o O_2 como acceptor de elétrons em modelo tiol oxidase, porém com velocidade de consumo consideravelmente inferior à quando se tem peróxido de hidrogênio no sistema. Deve-se destacar, no entanto, que em condições onde a Mn-porfirina possa assumir outros estados de oxidação, a reatividade dessas novas espécies com O_2 não seria acessível a partir das medidas com Mn(III)P , conforme discutido a seguir.

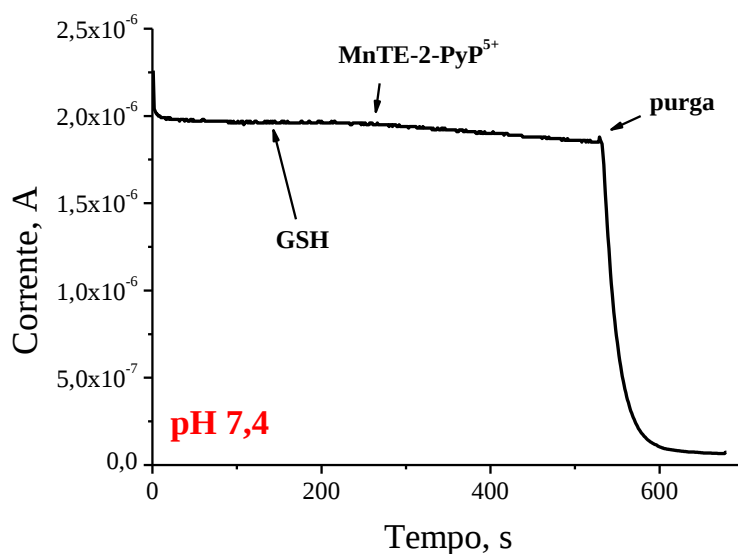


Figura 3.11 Monitoramento eletroquímico do consumo de oxigênio em modelo de glutatona oxidase em meio aeróbio neutro (pH 7,4). Experimentos realizados em tampão Tris, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, nas concentrações: GSH = 1 mmol L^{-1} ; MnTE-2-PyP $^{5+}$ = $10 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$.

É possível que a presença de H_2O_2 possibilite o acesso a espécies porfirínicas metal-oxo de alta valência que poderiam, então, atuar como bons modelos de tiol oxidase, utilizando O_2 como agente oxidante (Pinto *et al.*, 2016). Na ausência de H_2O_2 , o meio redutor rico em GSH favorece as espécies porfirínicas em estados de oxidação mais baixos (+2 ou +3), o que não parece ser compatível com a atividade tiol oxidase. Existe precedente na literatura para situação semelhante, onde um oxidante forte poderia atuar como um iniciador de processos radiculares que sustentaria as oxidações competitivas à base de O_2 (Nascimento *et al.*, 2005). No caso dos sistemas em estudo neste Capítulo, qualquer proposta de mecanismo envolvendo H_2O_2 ou O_2 resultaria no mesmo cenário final: GSH sendo oxidada a GSSG. Em sistemas correlatos de oxidação de cicloexeno, a epoxidação catalisada por MnP pode ser relacionada com um mecanismo não radicalar de transferência de oxigênio *via* espécie metal-oxo; já a oxidação alílica competitiva leva à formação de álcoois e cetonas alílicas, que são produtos associado à participação de O_2 *via* ativação da MnP por um oxidante, sustentando uma rota possivelmente radicalar. De modo aproximadamente análogo ao observado neste trabalho com GSH (**Fig. 3.11**), na ausência de um oxidante de iniciação, cicloexeno e MnP são indefinidamente estáveis mesmo na presença de O_2 .

Nas análises eletroquímicas do sistema sob condições aeróbicas em meio ácido (pH 4,2) não se observou consumo de oxigênio (**Fig. 3.12**), o que permite inferir a existência de

correlação entre o consumo de oxigênio e a catálise de oxidação da GSH, já que os resultados das análises espectrofotométricas mostraram a ausência de atividade em pH 4,2 (**Fig. 3.7**).

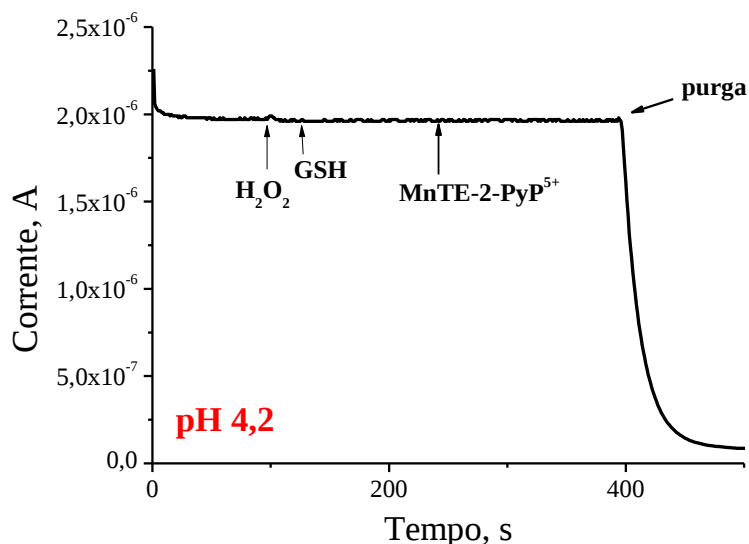


Figura 3.12 Monitoramento eletroquímico do consumo de oxigênio em modelo de tiol oxidase e glutatona peroxidase em meio aeróbio e pH ácido (4,2). Experimentos realizados em tampão tris, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, nas concentrações: $\text{H}_2\text{O}_2 = 0,5 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{GSH} = 1 \text{ mmol L}^{-1}$; $\text{MnTE-2-PyP}^{5+} = 10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

O acompanhamento espectral da MnTE-2-PyP^{5+} ao longo do tempo, em pH 7,4, foi realizado em modelo catalase ($\text{MnP}/\text{H}_2\text{O}_2$) e glutatona peroxidase ($\text{GSH}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{MnP}$) (**Fig. 3.13A e B**, respectivamente). Na ausência de GSH (**Fig. 3.13A**) foi observada a diminuição da banda Soret ao longo do tempo, provavelmente devido à formação de espécies de Mn-oxo de alta valência e a ausência de um substrato redutor gera o acúmulo dessas espécies de alto poder oxidante que pode levar a auto oxidação resultando em sua degradação (Tovmasyan *et al.*, 2015a). A presença de um redutor no sistema, GSH (**Fig. 3.13B**), muda completamente o perfil espectral ao longo do tempo, evidenciando que a presença de um substrato redutor é suficiente para evitar o acúmulo de espécies Mn-oxo de alta valência e a degradação do catalisador. Quando a GSH é adicionada ao sistema há um deslocamento hipsocrômico da Soret, o que, especula-se, seja devido à redução do metal a Mn^{II} , semelhante ao que ocorre no espectro da MnTE-2-PyP^{5+} quando se adiciona outro abundante redutor biológico, o ascorbato (Spasojević *et al.*, 2000).

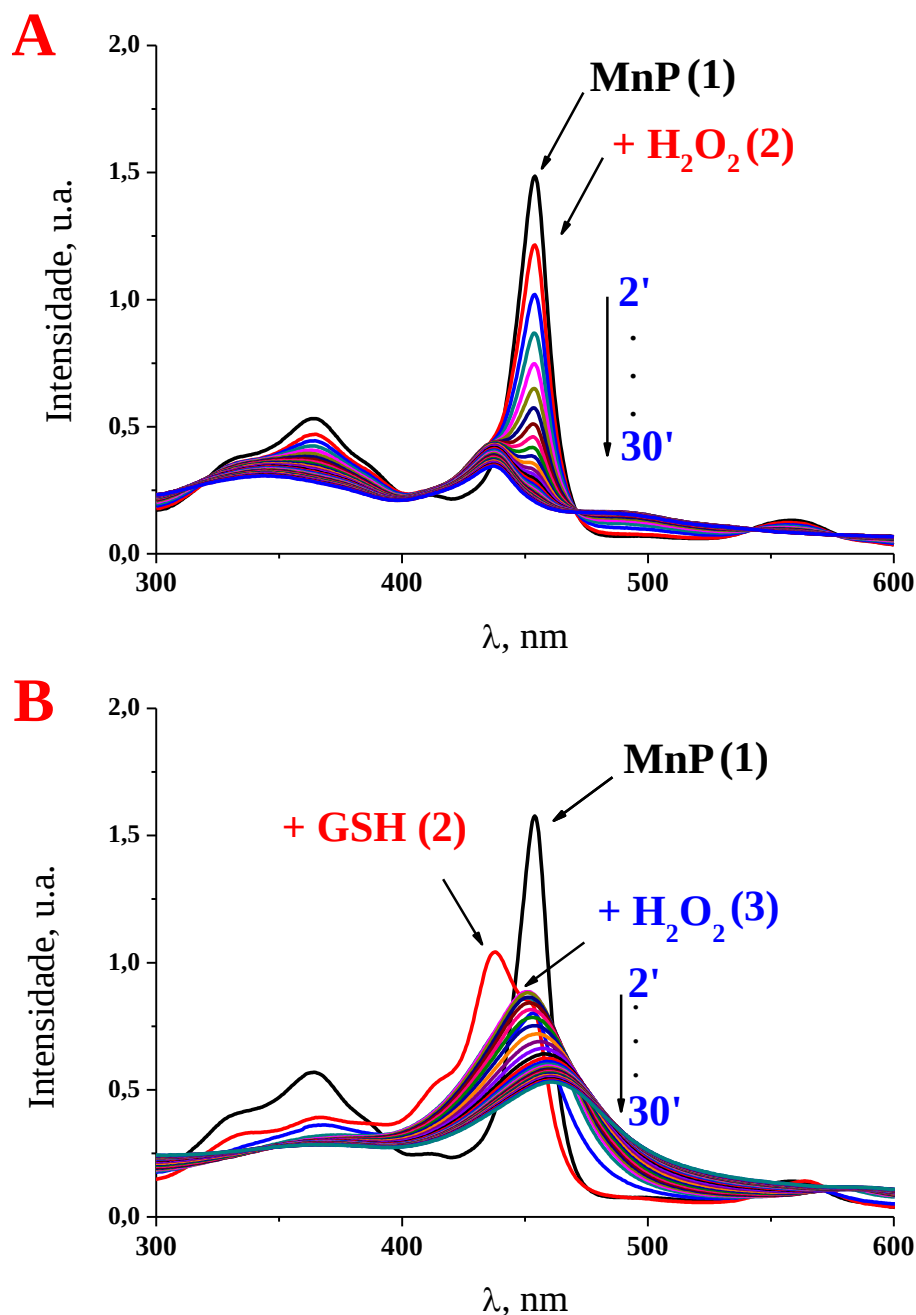


Figura 3.13 Acompanhamento espectral da MnTE-2-PyP⁵⁺ em modelo **A**) catalase e **B**) GPx. Primeiro foi adicionada MnP e o primeiro espectro foi registrado. Em modelo GPx adicionou-se GSH e registrou-se outro espectro. Após a adição de H₂O₂ aos sistemas os espectros foram registrados de 1 em 1 minuto até completar 30 minutos. Experimentos realizados em pH 7,4, em tampão Tris, 25 ± 1°C, nas concentrações: H₂O₂ = 0,5 mol L⁻¹; GSH = 1 mmol L⁻¹; MnTE-2-PyP⁵⁺ = 10 μmol L⁻¹.

No acompanhamento espectral na região de 300-600 nm em pH 4,2 (**Fig. 3.14**), observou-se que, mesmo na presença de GSH e H₂O₂, não ocorreu deslocamento da Soret ou mudanças significativas no perfil espectral, o que corrobora a ausência de atividade observada no experimento para determinação da velocidade inicial de oxidação do NADPH realizado

nesse mesmo pH (Fig. 3.7).

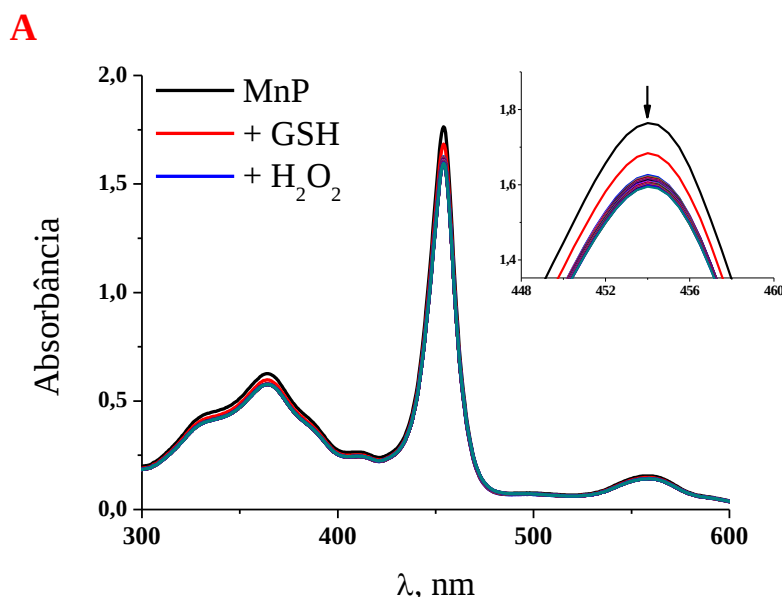


Figura 3.14 Acompanhamento espectral da MnTE-2-PyP⁵⁺ em modelo GPx (GSH/MnTE-2-PyP⁵⁺/H₂O₂) em meio aeróbio e ácido (pH 4,2). Primeiro foi adicionada MnP ao tampão Tris e registrado o primeiro espectro, depois adicionou-se GSH e registrou-se outro espectro, após a adição de H₂O₂ os espectros foram registrados de 1 em 1 minuto até completar 30 minutos. Experimento realizado em tampão Tris, 25 ± 1°C, nas concentrações: H₂O₂ = 0,5 mol L⁻¹; GSH = 1 mmol L⁻¹; MnTE-2-PyP⁵⁺ = 10 μmol L⁻¹.

O efeito de oxigênio no sistema analisado por meio do acompanhamento espectral em condições aeróbicas (Fig. 3.13 B) e anaeróbicas (Fig. 3.15) para a MnTE-2-PyP⁵⁺ em pH 7,4, evidenciaram que a presença de O₂ altera o comportamento do sistema, potencializando a oxidação da GSH, concordando com os dados obtidos para as velocidades de oxidação de NADPH em meio anaeróbio, $v_0(\text{NADPH})_{\text{ox}}$: 34,7 μmol L⁻¹ min⁻¹, e em meio aeróbio, $v_0(\text{NADPH})_{\text{ox}}$: 64,9 μmol L⁻¹ min⁻¹.

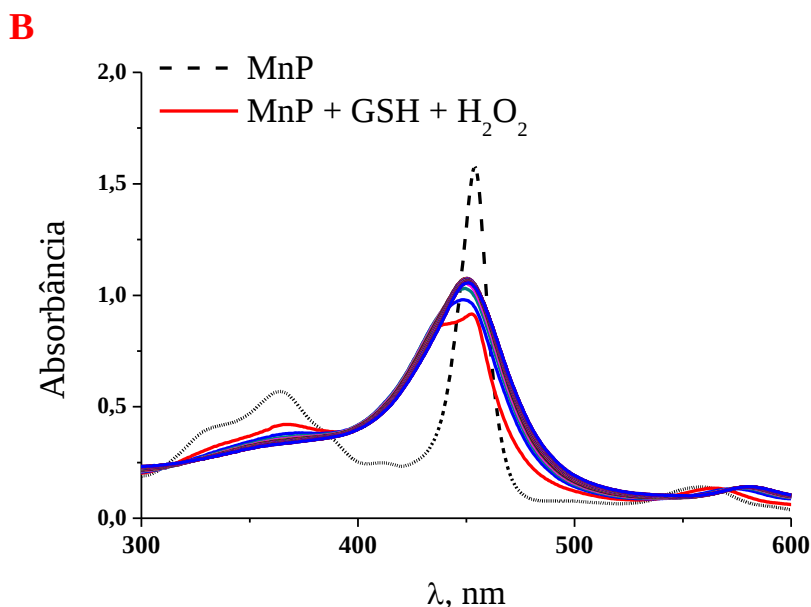


Figura 3.15 Acompanhamento espectral da MnTE-2-PyP⁵⁺ em modelo GPx (GSH/MnTE-2-PyP⁵⁺/H₂O₂) em meio inicial anaeróbio e pH 7,4. Foram adicionados ao tampão a MnP, GSH e H₂O₂ e os espectros foram registrados de 1 em 1 minuto por 30 minutos. A linha tracejada da MnP foi inserida a título de comparação. Experimento realizado em tampão Tris, 25 ± 1°C, nas concentrações: H₂O₂ = 0,5 mol L⁻¹; GSH = 1 mmol L⁻¹; MnTE-2-PyP⁵⁺ = 10 μmol L⁻¹.

Tendo em vista a participação do oxigênio no sistema, como observado nos experimentos supracitados, propõe-se que uma descrição rudimentar desse modelo seja similar ao esquema da **Fig. 3.16**, no qual a interação entre a MnP/GSH demonstra ser a parte mais sensível à presença do O₂.

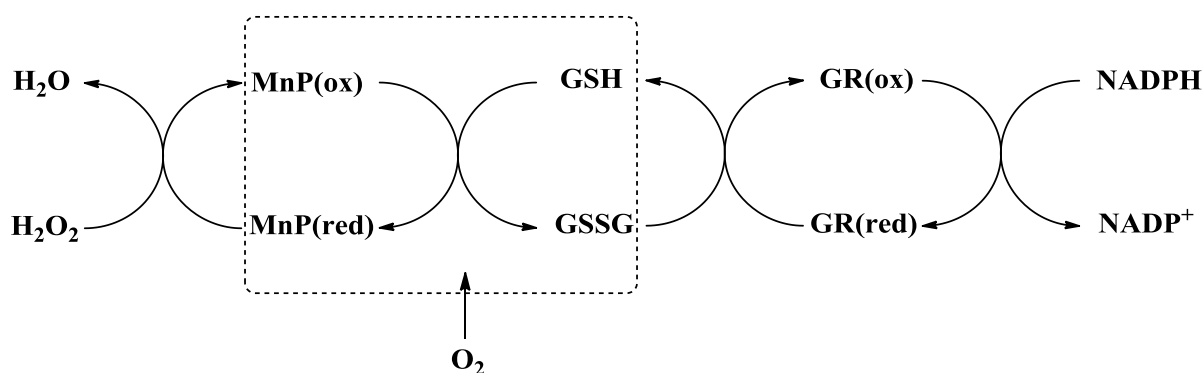


Figura 3.16 Esquema do ciclo proposto para as possíveis interações no modelo glutatona (per)oxidase, sendo MnP como mímico. Em destaque, os pares mais sensíveis à presença do oxigênio.

Como o sistema possui peróxido de hidrogênio e as MnPs apresentam diferentes estados de oxidação possíveis para o metal (+2, +3, +4, +5), e as reações podem ocorrer *via* processo de 1-elétron ou 2-elétrons, há uma gama de reações possíveis elencadas (Batinić-

Haberle; Tome, 2019). A interação da MnP com o H_2O_2 , num processo de dismutação do peróxido a oxigênio e água, geram espécies com Mn de alta valência como o $(\text{O})_2\text{Mn}^{\text{V}}\text{P}^{3+}$, porém devido à presença de redutores, como a GSH, a interação da MnP com o H_2O_2 pode envolver também as espécies $\text{Mn}^{\text{II}}\text{P}^{4+}/\text{O}=\text{Mn}^{\text{IV}}\text{P}^{4+}$. Além disso, a MnP reduzida, $\text{Mn}^{\text{II}}\text{P}^{4+}$, pode reagir com O_2 , gerando íon radical superóxido, sendo essa uma possível reação que represente o consumo de oxigênio observado nos experimentos eletroquímicos (Batinić-Haberle; Tome, 2019).

3.4.2 Oxidação da glutathione (GSH) catalisada por diferentes compostos redox ativos, utilizando H_2O_2 como oxidante

A atividade catalítica da oxidação da glutathione em modelo glutathione peroxidase (GPx) foi testada para 22 compostos redox-ativos de diferentes classes, que comumente são empregados como moduladores redox de estresse oxidativo. Dentre os compostos, sete são pertencentes às classes de Mn(III) salens, poliaminas cíclicas, Fe-porfirinas, nitronas e nitroxidas (**Fig. 3.4**), os demais são da classe de Mn-porfirinas (**Fig. 3.3**), das quais foram estudadas 14 porfirinas com diferentes características (tamanho, forma, lipofilia, carga, polaridade, estereoquímica, propriedades catalíticas e potencial de redução) (Batinić-Haberle *et al.*, 2010; Tovmasyan *et al.*, 2015a). A atividade catalítica dos compostos redox na oxidação da glutathione em estilo GPx foi avaliada indiretamente *via* medidas de velocidade inicial de oxidação de NADPH – $v_0(\text{NADPH})_{\text{ox}}$ – **Tab. 3.1** e **Fig. 3.17**.

Tabela 3.1. Atividade catalítica de compostos redox-ativos para a oxidação da glutathione em modelo Glutathione peroxidase (GPx) avaliada espectrofotometricamente indiretamente *via* determinação das velocidades iniciais da oxidação do NADPH, $v_0(\text{NADPH})_{\text{ox}}$.

Composto	$v_0(\text{NADPH})_{\text{ox}}$ ($\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$)	% da atividade enzimática da GPx
MnTE-2-PyP ⁵⁺	64,9	0,37
Ebselen	34,0	0,20
FeTE-2-PyP ⁵⁺	16,6	0,09
MnCl ₂	0	0
M40403	0	0
M40404	0	0
Tempol	0	0
NXY-059	0	0

Comparando-se as velocidades iniciais de oxidação do NADPH da MnTE-2-PyP⁵⁺ com os compostos redox-ativos de outras classes de compostos, observa-se que a MnP foi a mais eficiente na oxidação da glutathiona, apresentando maior valor de velocidade inicial de oxidação do NADPH, correspondente a 0,37% da atividade enzimática da glutathiona peroxidase, superando o ebselen, um composto organosselênio reconhecido como mímico GPx (Sies *et al.*, 1996).

Dentre a classe das MnPs, a atividade catalítica das MnPs na redução do H₂O₂ em um sistema GPx apresentou dependência com o potencial de redução ($E_{1/2}$) do centro metálico, apresentando valores ótimos em torno de +200 mV vs NHE (Fig. 3.17).

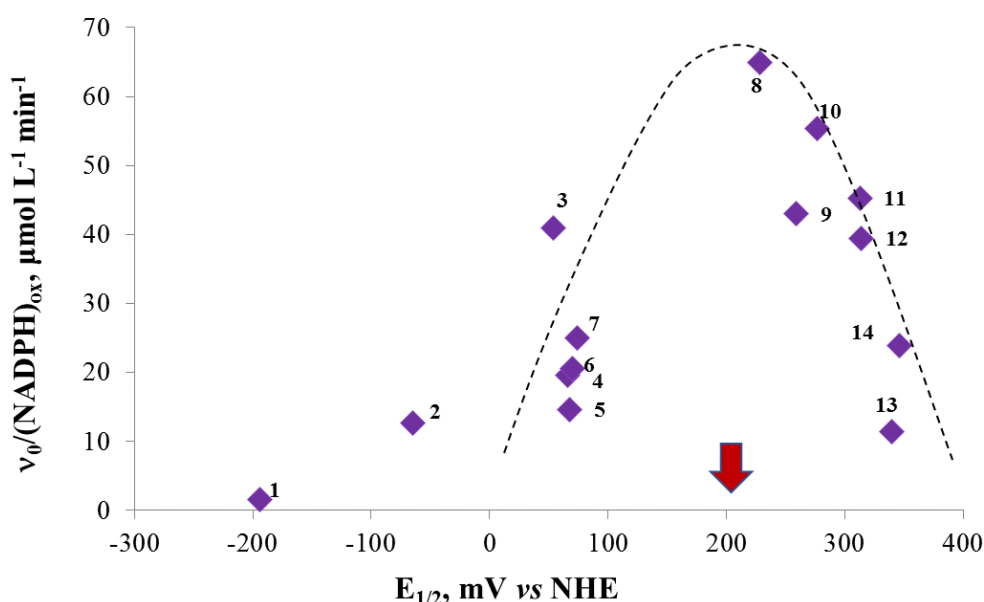


Figura 3.17 Atividade de glutathiona peroxidase em relação ao potencial de redução $\text{Mn}^{3+}/\text{Mn}^{2+}$ para as MnPs estudadas. 1: MnTBAP³⁻; 2: MnTE-2-PyPhP⁵⁺; 3: MnTE-3-PyP⁵⁺; 4: MnTnHex-3-PyP⁵⁺; 5: MnTnHex-4-PyP⁵⁺; 6: MnTE-4-PyP⁵⁺; 7: MnTnOct-3-PyP⁵⁺; 8: MnTE-2-PyP⁵⁺; 9: MnTPhE-2-PyP⁵⁺; 10: MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺; 11: MnTnHexOE-2-PyP⁵⁺; 12: MnTnHex-2-PyP⁵⁺; 13: MnTnOct-2-PyP⁵⁺; 14: MnTDE-2-ImP⁵⁺.

Esse comportamento na relação estrutura-atividade apresentou a mesma tendência observada em outras reações catalisadas pelas MnPs, como a dismutação do superóxido (Batinić-Haberle *et al.*, 2010), a redução de ONOO⁻ (Ferrer-Sueta *et al.*, 2003), a oxidação do ascorbato (Tovmasyan *et al.*, 2015b) e a atividade catalase (Tovmasyan *et al.*, 2015a). Atribui-se que a reatividade das MnPs catiônicas com as espécies reativas presentes no meio celular seja controlada por fatores termodinâmicos (o potencial de redução centrado no Mn possibilita a troca de elétrons com várias espécies reativas), e eletrostáticos, pois as cargas positivas do

anel porfirínico facilitam eletrostaticamente a aproximação de diversos ânions (Spasojević *et al.*, 2003; Rebouças *et al.*, 2008b; Batinić-Haberle *et al.*, 2010).

A MnTE-2-PyP⁵⁺ é um catalisador para oxidação da glutatona, porém os estudos do nível de oxigênio e as análises em diferentes meios (anaeróbio e aeróbio) descritos anteriormente apontam que o peróxido de hidrogênio não é o único oxidante do sistema (como seria esperado num modelo GPx genuíno), mas também há participação do oxigênio molecular, sugerindo uma mistura de atividades peroxidase e oxidase. No intuito de investigar a participação de oxigênio para MnPs de diferentes características foram realizadas análises eletroquímicas de consumo (**Fig. 3.18**) e evolução de oxigênio em pH 7,4 com 7 MnPs, a saber, MnTBAP³⁻, MnTE-2-PyPhP⁵⁺, MnTE-3-PyP⁵⁺, MnTE-2-PyP⁵⁺, MnTPhE-2-PyP⁵⁺, MnTnHexOE-2-PyP⁵⁺ e MnTnOct-2-PyP⁵⁺.

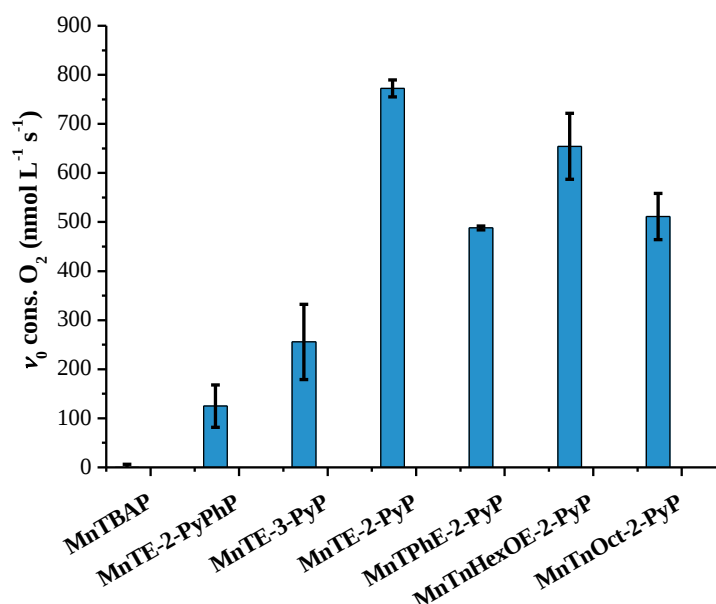


Figura 3.18. Consumo de oxigênio em sistema GSH/H₂O₂/MnP por MnPs com diferentes características. Experimentos realizados em pH 7,4 em tampão Tris. As cargas das porfirinas estão omitidas na figura, para a MnTBAP a carga é 3- e as demais MnPs apresentam carga 5+.

Dentre as MnPs selecionadas, todas as MnPs catiônicas apresentaram consumo de oxigênio, com destaque para a MnTE-2-PyP⁵⁺, que além de apresentar o maior valor na oxidação do NADPH (**Fig. 3.17**) apresentou também o maior valor de consumo de oxigênio (**Fig. 3.18**). Somente a MnP aniônica, MnTBAP³⁻, apresentou valores de consumo de oxigênio próximos a zero, resultado similar à baixa atividade catalítica desse composto na oxidação da glutatona (**Fig. 3.17**). Esses resultados permitem afirmar que o mecanismo pelo qual as MnPs catalisam a oxidação da glutatona, no modelo estudado, envolve também a presença de oxigênio, revelando que as medidas de oxidação da GSH referem-se a uma mistura de

atividades tiol peroxidase e oxidase.

3.4.3 Oxidação da glutatona (GSH) catalisada por compostos redox-ativos, utilizando o *t*-BuOOH como agente oxidante modelo para hidroperóxidos lipídicos

Em meio biológico, além do peróxido de hidrogênio, existem outros peróxidos, como os hidroperóxidos orgânicos primários, secundários e terciários e hidroperóxidos lipídicos (LOOH), que podem atuar como agentes oxidantes em modelo glutatona peroxidase (Flohé *et al.*, 2011). Araújo-Chaves e colaboradores (2011) demonstraram que a interação da MnTM-4-PyP⁵⁺ com hidroperóxidos lipídicos gera espécies Mn-oxo de alta valência que reagem com a GSH em modelo GPx. Neste contexto, a avaliação da reatividade da série de MnPs frente a hidroperóxidos orgânicos para oxidação da glutatona em um processo GPx semelhante àquele observado para os sistemas GSH/H₂O₂/MnP ganha relevância. Nesta tese foi utilizado o *t*-butil hidroperóxido (*t*-BuOOH) como um modelo simples de LOOH. Foi avaliada espectrofotometricamente a oxidação indireta da GSH por *t*-BuOOH *via* velocidades iniciais de oxidação do NADPH catalisada por 7 MnPs selecionadas (MnTBAP³⁻, MnTE-2-PyPhP⁵⁺, MnTE-3-PyP⁵⁺, MnTE-2-PyP⁵⁺, MnTPhE-2-PyP⁵⁺, MnTnHexOE-2-PyP⁵⁺ e MnTnOct-2-PyP⁵⁺), pelo ebselen e pela FeTE-2-PyP⁵⁺ (Fig. 3.19).

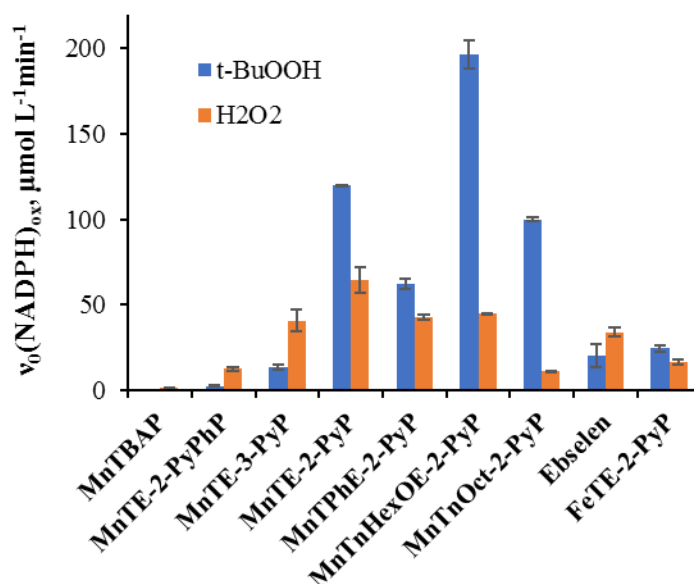


Figura 3.19 Atividade catalítica dos compostos redox-ativos na oxidação da glutatona com diferentes peróxidos avaliada espectrofotometricamente *via* determinação das velocidades iniciais da oxidação do NADPH. As cargas das porfirinas estão omitidas na figura, para a MnTBAP a carga é 3- e as demais apresentam carga 5+.

Comparando-se as velocidades iniciais de oxidação do NADPH para os peróxidos (H₂O₂ e *t*-BuOOH), foi observado que, para as MnPs estudadas, aquelas que possuem potencial

de redução $\text{Mn}^{\text{III}}/\text{Mn}^{\text{II}}$ mais baixos (menores que +100 mV vs NHE) apresentaram velocidades de oxidação inferiores quando o agente oxidante é o *t*-BuOOH; comportamento similar foi observado para o ebselen. Para as MnPs com potencial de redução $\text{Mn}^{\text{III}}/\text{Mn}^{\text{II}}$ superiores a +200 mV (vs NHE) e para a FeTE-2-PyP⁵⁺ os valores de velocidade de oxidação de NADPH foram superiores quando o peróxido utilizado foi o *t*-BuOOH. Nos sistemas utilizando o hidroperóxido orgânico, o composto que apresentou maior valor para velocidade de oxidação do NADPH foi a MnTnHexOE-2-PyP⁵⁺. Especula-se que, embora distante do centro metálico, a presença de átomos de oxigênio nas cadeias ligadas aos grupos piridilas, possibilita a formação de ligações de hidrogênio e, com isso, facilita a reatividade com os radicais derivados do *t*-BuOOH.

Com o intuito de testar se também havia a participação do oxigênio quando se utilizava o *t*-BuOOH como oxidante, foram realizados estudos eletroquímicos, em meio aeróbio, utilizando a MnTE-2-PyP⁵⁺ como catalisador, para verificar os níveis de oxigênio no sistema e calcular as velocidades de consumo de O_2 (Fig. 3.20).

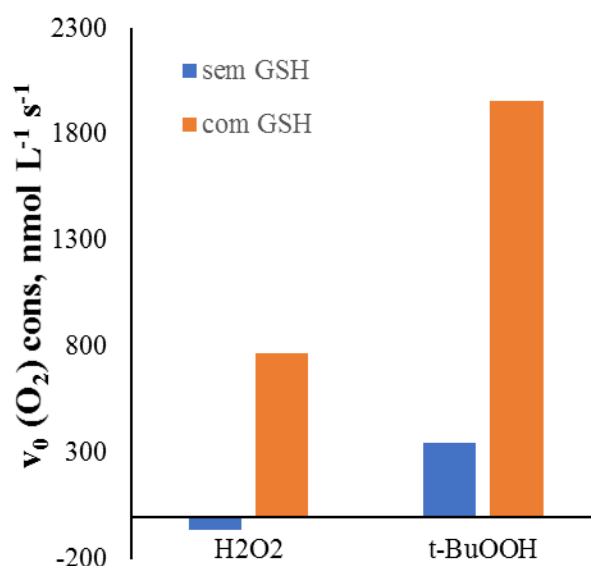


Figura 3.20 Velocidades de consumo de oxigênio ($v_0(\text{O}_2)_{\text{cons}}$) em sistema utilizando MnTE-2-PyP⁵⁺ para catalisar a oxidação da glutathione com H_2O_2 ou *t*-BuOOH, avaliado eletroquimicamente *via* análises do nível de oxigênio em meio aeróbio.

Quando foi adicionada MnTE-2-PyP⁵⁺ ao sistema contendo H_2O_2 , oxigênio foi produzido (modelo catalase). Contudo, quando foi adicionada MnP ao sistema contendo o peróxido orgânico, ao invés da produção de oxigênio o que se observou foi o consumo de O_2 , revelando que a reação entre o *t*-BuOOH e a MnP já envolve o consumo de O_2 . E para ambos os peróxidos, quando se adicionou GSH, oxigênio foi consumido de forma significativa,

indicando que o oxigênio também participa do mecanismo de ação no sistema contendo *t*-BuOOH.

Os experimentos realizados com *t*-BuOOH permitem afirmar que assim como quando se utilizou peróxido de hidrogênio como oxidante, o sistema GSH/*t*-BuOOH/MnP apresentou atividade glutational peroxidase e oxidase. Além disso, esses experimentos evidenciam que as MnPs em presença de GSH são hábeis para interagir com outros oxidantes, sendo assim, no sistema biológico, dada a presença de glutational e de diversos oxidantes (O_2 , H_2O_2 e peróxidos orgânicos, como os lipoperóxidos) inúmeras interações e reações competitivas podem ocorrer.

3.4.4 Reatividade das MnTE-2-PyP⁵⁺ com diferentes tióis

Com o intuito de investigar a reatividade das MnPs, em especial da MnTE-2-PyP⁵⁺, frente a diferentes tióis, uma vez que no meio biológico existem diversos compostos contendo o grupo mercapto, foram realizados estudos de consumo de oxigênio na oxidação dos tióis, a saber NAC, Cys, DTT ou pNBT (**Fig. 3.5**) por peróxido de hidrogênio utilizando a MnTE-2-PyP⁵⁺ como catalisador.

As análises eletroquímicas de consumo de oxigênio (**Fig. 3.21**) foram registradas em tampão Tris, pH 7,4, e demonstraram que todos os tióis em presença da MnP consomem O_2 , evidenciando que mesmo na ausência do peróxido de hidrogênio ocorre alguma reação entre a MnP e o tiol. Supõe-se que a MnP possa catalisar a oxidação do tiol utilizando o O_2 como acceptor de elétrons, em um modelo tiol oxidase, porém para alguns dos tióis essa atividade oxidase é praticamente residual.

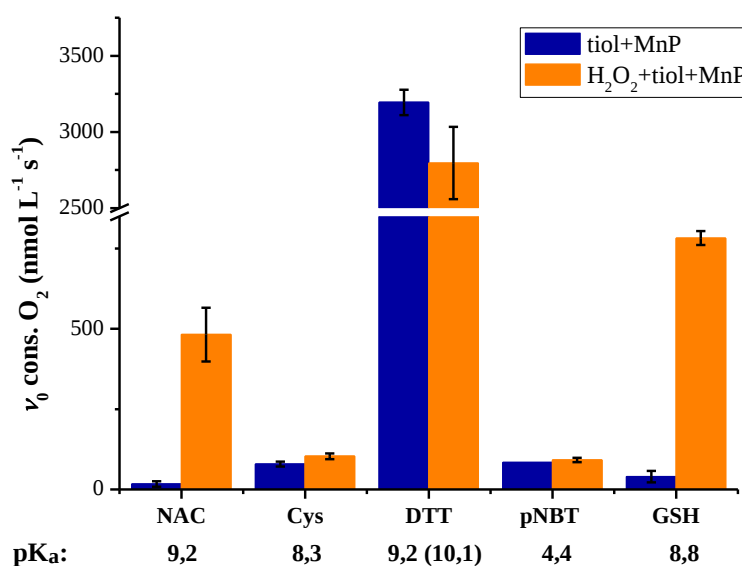


Figura 3.21 Análise das velocidades de consumo de oxigênio em sistema contendo MnTE-2-PyP⁵⁺ como catalisador e diferentes tióis como substrato, na ausência (barra azul) e presença de peróxido de hidrogênio (barra laranja).

Quando foi adicionado peróxido de hidrogênio aos sistemas observou-se um consumo considerável de oxigênio para alguns tióis, evidenciando a participação do O_2 também nas oxidações desses tióis. O ditiotreitól apresenta os maiores valores de consumo de oxigênio, tanto na presença quanto na ausência de H_2O_2 , provavelmente devido à ligação S–S formada ser intramolecular. A adição de peróxido de hidrogênio ao sistema, em comparação ao sistema contendo apenas MnP e tiol, não causou alteração significativa para os tióis Cys e pNBT, para o ditiotreitól a adição gerou diminuição no consumo de oxigênio, já para o NAC e GSH a adição de H_2O_2 ocasionou aumento expressivos na velocidade de consumo de oxigênio.

As reações do peróxido de hidrogênio com grupos cisteínas de proteínas e tióis de baixa massa molecular são muito lentas e ocorrem exclusivamente através dos ânions tiolatos, portanto, em pH fisiológico, quanto mais ionizado, mais reativo é o tiol com o H_2O_2 . Os pK_a s dos tióis estudados estão expressos na **Fig. 3.5**. No organismo, os grupos tióis das proteínas apresentam $pK_a \sim 8,8$ podendo ser inferiores e, portanto, mais reativo a depender das características das proteínas e peptídeos (Poole, 2015; Ulrich; Jakob, 2019; Mirzahosseini; Noszál, 2016). No modelo tiol peroxidase/oxidase estudado aqui, em termos de consumo de oxigênio, não se observa uma tendência relacionada ao pK_a .

Essas velocidades de consumo de oxigênio, isoladamente, podem não ser fidedignas à reatividade da MnTE-2-PyP⁵⁺ em modelos tiol (pero)oxidase com diferentes tióis, nem aos mecanismos pelos quais esses compostos interagem, outros estudos seriam necessários para tal conclusão (análises das velocidades de oxidação dos tióis, por exemplo). No entanto, as análises de consumo de oxigênio apresentam-se como bons indicadores de que no organismo deve haver interação entre as MnPs com os diferentes tióis presentes no meio biológico.

3.5 CONCLUSÕES

Os estudos espectrofotométricos e eletroquímicos descritos nesse capítulo permitem concluir que as MnPs catiônicas catalisam a oxidação da glutathione com participação de O_2 no sistema, em modelo (per)oxidase. E, assim como para a atividade SOD, catalase e a oxidação do ascorbato, observa-se uma relação entre o potencial de redução das MnPs e a atividade catalítica na oxidação da glutathione.

Dentre os 22 compostos redox-ativos investigados, a *meso*-tetraquis(N-etilpiridínio-2-il)porfirina de Mn(III) (MnTE-2-PyP⁵⁺) apresentou a maior atividade catalítica na oxidação da glutathione em presença de H_2O_2 , superando a atividade enzimática do ebselen, conhecido mimico GPx.

As análises com vários tióis também mostraram a alta reatividade da MnTE-2-PyP⁵⁺, inferindo que em meio biológico inúmeras interações com grupos tióis são possíveis, o que corrobora os dados de diferentes pesquisadores (Faulkner *et al.*, 1994; Ferrer–Sueta *et al.*, 1999; Tse *et al.* 2004; Jaramillo *et al.*, 2012; 2015; Tovmasyan *et al.*, 2012; Tong *et al.*, 2016; Batinić-Haberle *et al.*, 2018) sobre a oxidação/S-glutathionilação de proteínas de sinalização contendo grupos tióis em modelos experimentais celulares ou animais contendo Mn-porfirinas.

CAPÍTULO 4: efeito da associação entre Mn-porfirinas, ascorbato e radiação na inibição do crescimento de tumor em modelo animal de câncer de mama¹

4.1 INTRODUÇÃO

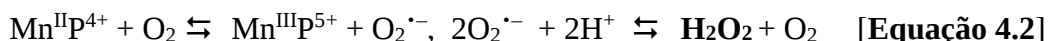
As Mn-porfirinas (MnPs) catiônicas se destacam entre os mais potentes miméticos das enzimas superóxido dismutases (SOD) e têm sido propostas como agentes terapêuticos redox ativos para diversas doenças associadas ao estresse oxidativo, incluindo o câncer. Em especial, as MnPs derivadas das Mn(III) *N*-piridilporfirinas catiônicas *N*-substituídas se apresentam como as mais eficazes *in vitro* e *in vivo* com efeito anticâncer e radioprotetor (Batinić-Haberle *et al.*, 2014, 2016a, 2019; Chatterjee *et al.*, 2018; Evans *et al.*, 2014; Mapuskar *et al.*, 2019; Rawal *et al.*, 2013; Shin *et al.*, 2017).

Além das MnPs, outro composto que vem sendo explorado quanto à sua eficácia terapêutica é o ascorbato (Asc), composto redutor, normalmente presente em concentrações da ordem de milimolar no organismo. Sua atividade anticâncer modesta é atribuída à produção de peróxido de hidrogênio proveniente da autooxidação do ascorbato catalisada por metaloproteínas presentes no meio celular do tumor (Welsh *et al.*, 2013; Tovmasyan *et al.*, 2015b, 2015c). Isso, aliado às baixas expressões de enzimas catalase e peroxidases, acarreta um aumento do estresse oxidativo nas células-alvo.

A administração conjunta de MnPs com ascorbato é apontada como um modo de aumentar a atividade anticâncer do ascorbato. O comportamento de algumas MnPs, com diferentes lipofilias e potenciais de redução, em administração conjunta com o ascorbato foi avaliado em linhagens de células de câncer distintas (Ye *et al.*, 2011). Em particular, foi analisada a viabilidade de células de câncer, tais como HTC116 (células humanas de câncer colorretal) e 4T1 (células de câncer de mama de camundongos), na presença de Mn-porfirinas com e sem a adição de ascorbato (Ye *et al.*, 2011). Apesar das diferenças metabólicas entre as células de câncer, ambas as linhagens celulares foram mais viáveis na presença de

¹ Os dados apresentados neste capítulo foram publicados: Artak Tovmasyan, Jacqueline C. Bueno-Janice, Melba C. Jaramillo, Romulo S. Sampaio, Julio S. Rebouças, Natalia Kyui, Ludmil Benov, Brian Deng, Ting-Ting Huang, Margaret E. Tome, Ivan Spasojević e Ines Batinić-Haberle. Radiation-mediated tumor growth inhibition is significantly enhanced with redox-active compounds that cycle with ascorbate. *Antioxidants and Redox Signaling*, 29(13):1196-1214, 2018. doi 10.1089/ars.2017.7218.

metaloporfirinas e inviáveis quando MnPs são administradas com ascorbato. Isso indicou que Mn-porfirinas na presença de agentes redutores exercem ação pró-oxidante para esses tipos de células, pois consomem oxigênio e produzem peróxido de hidrogênio (Eqs. 4.1 e 4.2), gerando o acúmulo dessa espécie reativa e assim a supressão da viabilidade celular (Ye *et al.*, 2011; Tovmasyan *et al.*, 2013, 2015b, 2015c; Rawal *et al.*, 2013).



A eficiência do uso conjunto das MnPs e ascorbato possui efeito mais pronunciado quando a MnP utilizada apresenta potenciais de redução $\text{Mn}^{\text{III}}/\text{Mn}^{\text{II}}$ em torno de +200 mV vs NHE, visto que essas MnPs são melhores catalisadoras de ascorbato e, conseqüentemente, da produção de H_2O_2 (Tovmasyan *et al.*, 2014, 2015b, 2015c).

O mecanismo de ação desses compostos está relacionado ao metabolismo das células de câncer que normalmente apresenta alta expressão das enzimas superóxido dismutase (que dentre os produtos gerados está o peróxido de hidrogênio), e baixa expressão de catalase e glutathione peroxidase (Hsieh *et al.*, 2010; Miar *et al.*, 2015; Batinić-Haberle *et al.*, 2015; Manda *et al.*, 2015), que são antioxidantes responsáveis pela remoção do H_2O_2 , fazendo com que os altos níveis inerentes do metabolismo dessas células contribuam na magnitude dos efeitos do excesso de peróxido gerado pela oxidação do ascorbato pela MnP, resultando na apoptose celular. A ação das Mn-porfirinas no tratamento de câncer é, portanto, pró-oxidante e mecanismo semelhante ocorre quando se utilizam esses mimicos SOD associados com quimioterápicos (Yulyana *et al.*, 2016; Jaramillo *et al.*, 2012, 2015; Kosmacek *et al.*, 2016) e radioterapia (Weitzel *et al.*, 2015, 2016; Chatterjee *et al.*, 2018). Nessas situações as Mn-porfirinas agem como quimio- e radiosensibilizadoras às células de câncer.

Além dos fatores termodinâmicos e eletrostáticos, que influenciam a capacidade catalítica das Mn-porfirinas, o efeito terapêutico dessas é influenciado também pela sua biodisponibilidade e toxicidade. A biodisponibilidade das metaloporfirinas, por sua vez, depende de fatores estruturais como tamanho, carga, estado de oxidação do íon central e forma (flexibilidade conformacional e geométrica), que afetam a lipofilia das mesmas (Batinić-Haberle *et al.*, 2010, 2016a; Kos *et al.*, 2009b; Spasojević *et al.*, 2011).

Nesse contexto, os estudos em modelos animais contribuem sobremaneira na investigação da eficiência terapêutica das MnPs. Esses estudos permitem a avaliação não só da

eficiência, mas também de aspectos mecânicos relacionados à eficácia dessas potenciais drogas. Adicionalmente, a quantificação das MnPs possibilita a compreensão da biodistribuição e farmacocinética, podendo auxiliar na melhoria das propostas do mecanismo da ação terapêutica desses compostos (Batinić-Haberle *et al.*, 2010, 2014, 2016a; Weitner *et al.*, 2013).

Os primeiros métodos desenvolvidos para quantificação de Mn-porfirinas em tecidos e órgãos animais utilizaram técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (HPLC/fluorescência) e eletroquímica (HPLC/ECD) (Kachadourian *et al.*, 2002; Spasojević *et al.*, 2007). Spasojević e colaboradores reportaram estudos de farmacocinética da MnTE-2-PyP⁵⁺ utilizando HPLC/fluorescência, e posteriormente desenvolveram métodos para quantificação de MnPs utilizando LC-MS/MS (Spasojević *et al.*, 2007, 2008). Este último método é mais sensível que o de fluorescência, sendo capaz de detectar baixos níveis de MnTnHex-2-PyP⁵⁺ (~20 nmol L⁻¹) em órgãos animais e que não foram possíveis de serem medidos por HPLC/fluorescência (Spasojević *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2020).

Com isso, o método de análise por LC-MS/MS, por sua maior sensibilidade e por demandar menor preparo de amostra que o método à base de fluorescência, tornou-se o principal método para bioanálise quantitativa de Mn-porfirinas, colaborando para estudos da ação dessas no organismo, bem como para a avaliação de parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos em modelos *in vitro* e modelos animais (Batinić-Haberle *et al.*, 2011; Miriyala *et al.*, 2012; Weitner *et al.*, 2013; Weitzel *et al.*, 2015; Sheng *et al.*, 2011).

4.2 OBJETIVOS

Investigar o efeito do uso combinado de metaloporfirinas de manganês (MnP) com outros tratamentos anti-tumorigênicos, como quimioterapia com ascorbato (Asc) e radioterapia (RT). Para tanto:

✓ Estudar os efeitos do uso combinado de Asc/RT/MnP em modelo de câncer de mama em camundongos Balb/C, utilizando três diferentes MnPs: MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺, MnTE-2-PyP⁵⁺ e MnTBAP³⁻ (**Fig. 4.1**).

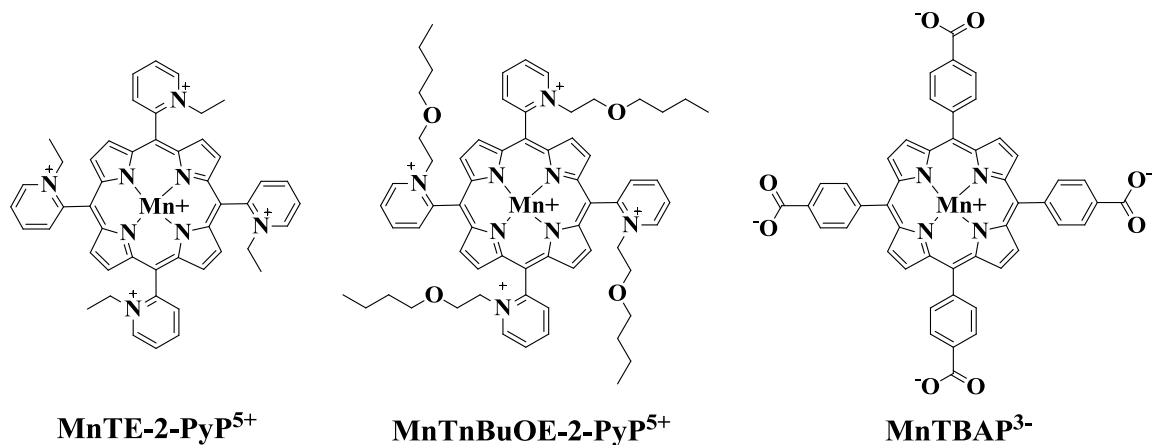


Figura 4.1 Estrutura das Mn porfirinas utilizadas nos estudos *in vivo*.

✓ Coletar os tecidos de mama, fígado e tumor dos camundongos tratados e quantificar as metaloporfirinas MnTE-2-PyP⁵⁺ e MnTBAP³⁻ nos tecidos *via* LC-MS/MS e comparar com os dados de quantificação da MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺ obtidos concomitantemente no grupo.

4.3 PARTE EXPERIMENTAL

4.3.1 Materiais

Mn-porfirinas foram preparadas segundo os procedimentos descritos na literatura (Batinić-Haberle *et al.*, 2002; Rajić *et al.*, 2012; Tovmasyan *et al.* 2013, 2014). O ascorbato foi adquirido da Sigma Aldrich.

4.3.2 Experimentos com modelo animal

Os experimentos foram realizados durante o período de doutorado sanduíche na Universidade de Duke (NC, USA), sob orientação da Dra. Ines Batinic-Haberle. Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Balb/C, com 6-8 semanas de vida e massa média de 20 g (adquiridos do *Jackson Laboratory*, EUA). As células 4T1 (câncer de mama de camundongos) foram implantadas por meio de injeção subcutânea (100 µL) na pata traseira direita do animal, em única dose de suspensão de 10^7 células/mL (total 10^6 células por camundongo). Os tratamentos com MnP e ascorbato foram iniciados 24 horas antes do tratamento com radiação (**dia-1**, design do experimento esquematizado na **Fig 4.2**). A MnP foi administrada pela *via* subcutânea (sc) em dose diária de 2 mg/kg (para os experimentos I e II) ou 0,2 mg/kg (experimento III) e o ascorbato foi injetado *via* intraperitoneal (ip) com dose diária de 4 g/kg nos primeiros 5 dias, e nos demais dias de experimento a dose diária foi de 1 g/kg. A radioterapia foi iniciada (**dia 0**) quando os tumores apresentaram volumes aproximados de 80 mm³, sendo a dose diária de 2,5 Gy (0,64 Gy/min; 3,9 min) aplicada por 3 dias consecutivos.

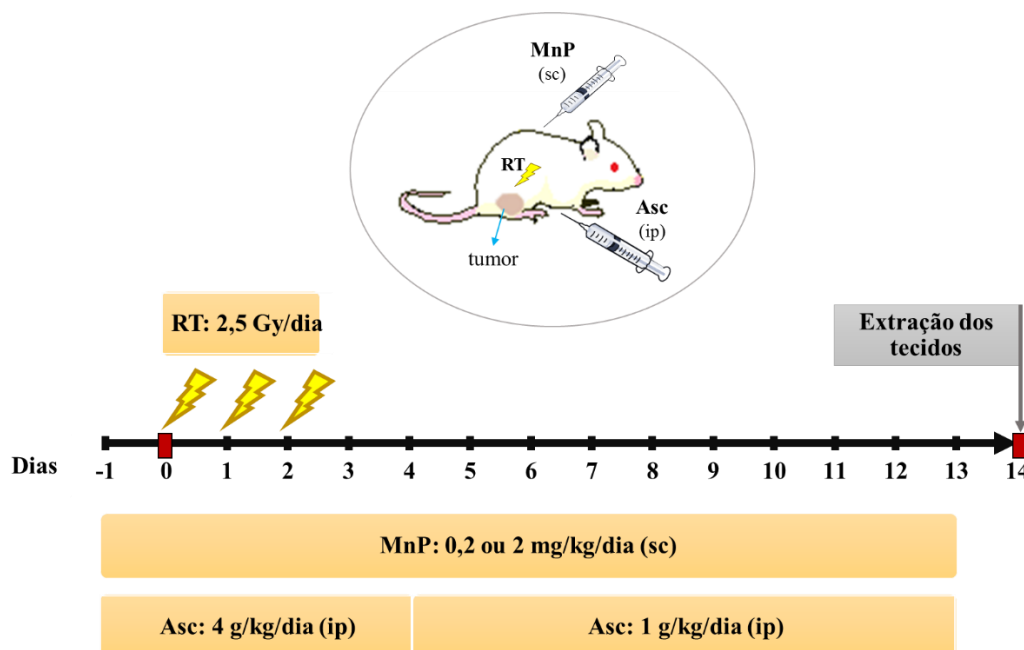


Figura 4.2. Design dos experimentos em modelo animal de câncer de mama em camundongos Balb/C. A administração de Mn-porfirina (MnP) foi pela via subcutânea (sc), com doses de 0,2 mg/kg/dia (**Experimento III**) ou 2 mg/kg/dia (**Experimento I e II**) e de ascorbato (Asc) foi via intraperitoneal (ip). RT: radiação (adaptado de Tovmasyan *et al.*, 2018).

Para realização dos experimentos **I**, **II** e **III** foram utilizados 100, 136 e 99 animais, respectivamente, distribuídos em diferentes grupos de tratamento: controle, tratamento isolado (MnP, Ascorbato ou Radiação), tratamento duplo (Ascorbato + Radiação, Radiação + MnP, Ascorbato + MnP) e tratamento triplo (Ascorbato + Radiação + MnP) (**Tabela 4.1**).

Tabela 4.1. Distribuição dos grupos de tratamento e doses diárias de MnP utilizados nos experimentos em modelo animal de câncer de mama.

Experimentos	I	II	III
Dose diária de MnP	2 mg/kg	2 mg/kg	0,2 mg/kg
Grupos de tratamento	1. Controle 2. Radiação (RT) 3. Ascorbato (Asc) 4. MnTnBuOE-2-PyP ⁵⁺ 5. RT + Asc 6. MnTnBuOE-2-PyP ⁵⁺ + RT 7. MnTnBuOE-2-PyP ⁵⁺ + Asc 8. MnTnBuOE-2-PyP ⁵⁺ + RT + Asc	1. Controle 2. Asc 3. RT 4. RT + Asc 5. MnTE-2-PyP ⁵⁺ 6. MnTE-2-PyP ⁵⁺ + Asc 7. MnTE-2-PyP ⁵⁺ + RT 8. MnTE-2-PyP ⁵⁺ + RT + Asc 9. MnTBAP ³⁻ 10. MnTBAP ³⁻ + Asc 11. MnTBAP ³⁻ + RT 12. MnTBAP ³⁻ + RT + Asc	1. Controle 2. RT 3. Asc 4. MnTnBuOE-2-PyP ⁵⁺ 5. RT + Asc 6. MnTnBuOE-2-PyP ⁵⁺ + RT 7. MnTnBuOE-2-PyP ⁵⁺ + Asc 8. MnTnBuOE-2-PyP ⁵⁺ + RT + Asc

Os tumores foram medidos manual e diariamente utilizando-se um paquímetro digital e os volumes (mm^3) foram calculados como: $\text{diâmetro maior} \times (\text{diâmetro menor})^2/2$ (Steel, 1977). O volume máximo para crescimento do tumor foi estabelecido como 1500 mm^3 . As massas dos camundongos foram registradas duas vezes na semana. Os procedimentos e cuidados com os animais foram aprovados pela *Duke University Institutional Animal Care and Use Committee*.

4.3.3 Coleta dos tecidos

Após 14 dias de experimento, foi realizada a eutanásia dos camundongos com injeção intraperitoneal de Euthasol (0,05 mL por camundongo) e os tecidos (fígado, músculo da pata esquerda e tumor) foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e estocados em freezer a -80°C . Todos os tecidos foram coletados dos animais em até 24 horas após o término do experimento.

4.3.4 Preparação dos tecidos coletados

Os tecidos dos camundongos de cada grupo de tratamento foram combinados em novos grupos contendo misturas de tecidos de 3 animais. O tecido muscular e do tumor foram criopulverizados com o auxílio de um pulverizador de tecidos Bessman (BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA) sob nitrogênio líquido. Já as amostras de fígado foram cortadas. Os tecidos foram pesados e então levados a um homogeneizador rotatório com solução aquosa (na proporção de 4 mL de solução por grama de tecido) contendo agente trapeador de GSH – 20 mmol L^{-1} de N-etilmaleimida (NEM; Sigma), 2% de ácido sulfossalicílico (SSA; Sigma) e 2 mmol L^{-1} de EDTA em 15% de metanol –, formando o **homogeneizado 1**. A seguir as amostras foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente e, então, estocadas a -80°C .

4.3.5 Extração da GSH e GSSG

No dia da análise de LC-MS/MS, foram adicionados $50 \mu\text{L}$ do **homogeneizado 1**, $200 \mu\text{L}$ de ácido fórmico em água e $500 \mu\text{L}$ de clorofórmio a um frasco de propileno (PP) de 2 mL. O sistema foi selado e agitado em um aparelho FastPrep (*Thermo-Savant*) por 1 ciclo a velocidade de 5 m s^{-1} por 40 s. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, o sistema foi centrifugado por 5 min a $14000 \times g$. O sobrenadante foi diluído 1:1 (para as análises de GSSG) ou 1:5000 (para as análises de GSH) com fase móvel A (veja em **Análise dos níveis de GSH e GSSG** no item 4.3.8) contendo a quantidade apropriada de padrão interno ($1,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de GSSG- d_6 ou $0,65 \mu\text{mol L}^{-1}$ de GSH-NEM- d_3). Em seguida, as amostras foram analisadas por LC-MS/MS, com alíquotas injetadas de $20 \mu\text{L}$ (GSSG) ou $5 \mu\text{L}$ (GSH) (**item 4.3.8a**).

4.3.6 Extração da MnTE-2-PyP⁵⁺ dos tecidos

a) Músculo e tumor

A um frasco de propileno (PP) de 500 μL , adicionaram-se 50 μL do **homogeneizado 1** de músculo ou tumor e 200 μL de solução de MnTM-2-PyP⁵⁺ a 200 nmol L⁻¹ (padrão interno) preparada em solução de 1% HCl em metanol e o sistema foi vigorosamente agitado em um aparelho FastPrep (*Thermo-Savant*) por 1 ciclo a velocidade de 6,5 m s⁻¹ por 40 segundos. Em seguida, o sistema foi centrifugado por 10 min a 13200 rpm. A seguir, 50 μL do sobrenadante e 150 μL de solução aquosa de ácido heptafluorobutírico (HFBA) a 0,1% foram transferidos para um frasco de polipropileno para HPLC equipado com septo de silicone/PTFE. Após outro ciclo de centrifugação por 5 minutos a 5000 $\times g$ (4 °C), a amostra foi imediatamente analisada por LC-MS/MS. Os **homogeneizados 1** de tecido muscular do grupo controle (sem tratamento) foram utilizados para preparar a curva analítica no intervalo de 0-160 nmol L⁻¹. Já para a curva analítica das amostras de tumor, os **homogeneizados 1** do grupo controle (sem tratamento) foram utilizados para preparar a curva no intervalo de 0-800 nmol L⁻¹.

b) Fígado

A um frasco de propileno (PP) de 2 mL, foram adicionados 50 μL do **homogeneizado 1** de fígado e 450 μL de água (correspondendo a uma diluição de 10 vezes). Misturou-se o sistema em agitador “vórtex” por 30 segundos. Posteriormente, 50 μL do homogeneizado diluído foram transferidos para um frasco de propileno (PP) de 500 μL e o restante da preparação da amostra foi realizada como descrito no item anterior para os tecidos muscular e de tumor. Os **homogeneizados 1** do grupo controle (sem tratamento) da amostra do fígado foram utilizados para preparar a curva analítica no intervalo de 0-10 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

4.3.7 Extração da MnTBAP³⁻ dos tecidos

a) Músculo, fígado e tumor

A um frasco de propileno (PP) de 2 mL, com duas esferas de Zr de 2,5 mm, foram adicionados 50 μL do **homogeneizado 1** e 450 μL de água (correspondendo a uma diluição de 10 vezes). Então, misturou-se o sistema em agitador “vórtex” por 30 segundos. Posteriormente, foram transferidos 50 μL do homogeneizado diluído, 150 μL de solução aquosa de ácido fórmico a 1%, 100 μL de uma solução metanólica de H₂TBAP (padrão interno) a 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 100 μL de clorofórmio/isopropanol (4/1, v:v) para um frasco de propileno (PP) de 500 μL . Em seguida, agitou-se vigorosamente o sistema em um aparelho FastPrep (*Thermo-Savant*) por 1

ciclo a velocidade de 5 m s^{-1} por 40 segundos. A seguir, o sistema foi centrifugado por 5 min a 13200 rpm. A fase aquosa (superior) foi descartada e 100 μL da fase orgânica foram transferidos para um tubo de propileno e purgado, sob atmosfera de N_2 , por 40 minutos até completa evaporação do solvente. O material seco foi solubilizado em solução composta de fase móvel A (1% de ácido fórmico em H_2O , 5% de acetonitrila) + 50% acetonitrila, dissolvida em ultrassom (5 minutos). Posteriormente, 40 μL desta solução foram transferidos para um frasco de polipropileno para HPLC equipado com septo de silicone/PTFE. Após outro ciclo de centrifugação por 5 minutos a $5.000 \times g$ (4°C), a amostra foi imediatamente analisada por LC-MS/MS. Os **homogeneizados 1** de cada tipo de amostras tecidual do grupo controle (sem tratamento) foram utilizados para preparar suas respectivas curvas analíticas, nos seguintes intervalos: 0-200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (fígado), 0-10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (músculo) e 0-30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (tumor).

As amostras do **experimento III** foram coletadas e estocadas, porém a preparação e análise via LC-MS/MS ainda não foram realizadas. A preparação de amostras e análise de LC-MS/MS do **experimento I** foram realizadas em colaboração com o então aluno de doutorado do nosso grupo de pesquisa, Rômulo S. Sampaio, durante seu doutorado sanduíche na Universidade de Duke.

4.3.8 Metodologia de análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS/MS)

a) Análise dos níveis de GSH e GSSG

As análises dos níveis de GSH e GSSG foram realizadas seguindo a metodologia reportada na literatura para os níveis desses compostos em sangue (Moore *et al.*, 2013). As medidas de GSH (na forma do composto GSH-NEM) e GSSG foram realizadas em um HPLC Shimadzu 20A acoplado a um espectrômetro AB Sciex Q Trap API5500 LC-MS/MS nos Laboratórios da *Duke Comprehensive Cancer Center, Shared Resource PK Labs*. Como colunas foram utilizadas a pré-coluna Phenomenex, C18 ($4 \times 3 \text{ mm}$) e a Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 ($4,6 \times 50 \text{ mm}$) a 45°C . Todos os solventes empregados foram de grau MS: **Fase móvel A**, 0,1% de ácido fórmico em H_2O , 2% de acetonitrila; **fase móvel B**, acetonitrila. As transições de fragmentação de massas específicas (m/z) acompanhadas foram: GSH-NEM (analito) em m/z 433/304 e GSH-NEM- d_3 (padrão interno) em m/z 436,2/307,1; GSSG (analito) em m/z 613,1/355 e GSSG- d_6 (padrão interno) em m/z 619,1/361. As amostras para construção da curva analítica foram preparadas em **fase móvel A** nos intervalos de 0,375-6,00 mmol L^{-1}

para GSH e 1,88-30 $\mu\text{ml L}^{-1}$ para GSSG. As respostas das análises foram calculadas no software Analyst 1.6.2.

b) Análise dos níveis de MnP

As análises foram realizadas em um HPLC Shimadzu 20A acoplado a um espectrômetro AB MDS Sciex Q Trap 4000 LC-MS/MS nos Laboratórios de *Duke Comprehensive Cancer Center, Shared Resource PK Labs*. Os solventes empregados para estudos com MnTE-2-PyP⁵⁺ foram: **fase móvel A**, 0,05% de HFBA, 5% de acetonitrila em H₂O; **fase móvel B**, 0,05% de HFBA em acetonitrila. Para análises com MnTBAP³⁻ foram utilizadas: **fase móvel A**, 1% de ácido fórmico em H₂O, 5% de acetonitrila; **fase móvel B**, acetonitrila. Todos os solventes utilizados nas fases móveis foram grau HPLC. A MnTM-2-PyP⁵⁺ foi usada como padrão interno para determinação de MnTE-2-PyP⁵⁺ e a base-livre H₂TBAP foi usada como padrão interno para MnTBAP³⁻. As análises foram realizadas usando apenas pré-coluna Phenomenex C18 (3 × 4 mm) e foram acompanhadas as seguintes transições de fragmentação de massas específicas m/z : MnTE-2-PyP⁵⁺ (analito) em m/z 713,3/363,6 e MnTM-2-PyP⁵⁺ (padrão interno) em m/z 685,3/356,6; MnTBAP³⁻ (analito) em m/z 843,0/677,1 e H₂TBAP (padrão interno) em m/z 791,2/670,1. As curvas analíticas foram preparadas pela adição de quantidades conhecidas de padrões dos analitos diluídos (juntamente a uma quantidade fixa dos padrões internos) nos homogeneizados dos respectivos tecidos dos grupos controle. As análises foram realizadas juntamente com as amostras dos respectivos estudos. As respostas das análises foram calculadas pela razão entre a área do pico do analito e a área do pico do padrão interno no próprio software do equipamento, Analyst 1.6.2.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os estudos da influência dos compostos redox ativos administrados concomitantemente com outros tratamentos (ascorbato e/ou radiação) sobre a inibição do crescimento de tumor, foram utilizadas três MnPs *meso*-substituídas (**Fig. 4.1**), MnTE-2-PyP⁵⁺, MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺ e MnTBAP³⁻, que apresentam diferentes características, como: cargas, potenciais de redução Mn^{III}/Mn^{II}, lipofilias e eficiência catalítica (**Tabela 4.2**).

Tabela 4.2 Propriedades físico-químicas das Mn(III)-porfirinas estudadas.

MnPs	MnTE-2-PyP ⁵⁺	MnTnBuOE-2-PyP ⁵⁺	MnTBAP ³⁻
log <i>P</i> _{OW} ^a	-7,67	-4,10	ND ^h
<i>E</i> _{1/2} , Mn ^{III} /Mn ^{II} ^b mV vs NHE	+220	+277	-194
log <i>k</i> _{cat} (O ₂) ^c	7,76	7,83	3,16
log <i>k</i> _{red} (ONOO ⁻) ^d	7,53	7,54	5,02
<i>v</i> ₀ (Asc) _{ox} ^e nmol L ⁻¹ s ⁻¹	286 (308)	160 (256)	4 (2)
<i>k</i> _{cat} (H ₂ O ₂) ^f mol ⁻¹ L s ⁻¹	63	88	6
Atividade GPx ^g % atividade enzimática (μmol L ⁻¹ min ⁻¹)	0,350 (62)	0,307 (54)	0,008 (1,5)

Os dados foram obtidos a 25 ± 1 °C, exceto para log *k*_{red}(ONOO⁻), que foi medido a 37 ± 1 °C.

a Lipofilia expressa como log da partição da MnP entre água e *n*-octanol (saturados) (Batinić-Haberle *et al.*, 2010);

b Potencial de redução centrado no metal (*E*_{1/2}) para o par Mn^{III}/Mn^{II} (Tovmasyan *et al.*, 2015a).

c O log *k*_{cat}(O₂) descreve a atividade catalítica do complexo de Mn como mímico da enzima SOD na dismutação do O₂ (Tovmasyan *et al.*, 2015a).

d O log *k*_{red}(ONOO⁻) representa a atividade catalítica da MnP na redução do ONOO⁻ a NO₂ via par O=Mn^{IV}P/Mn^{III} (Ferrer-Sueta *et al.*, 2003).

e *v*₀(Asc)_{ox} descreve as taxas iniciais de oxidação do ascorbato pelo par Mn^{III}P/Mn^{II}P em tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹. Em parênteses os valores em tampão TRIS (Tovmasyan *et al.*, 2015b).

f Atividade catalítica da MnP na dismutação do H₂O₂, utilizando o par O=Mn^VP = O/Mn^{II}P via processo com dois elétrons, expressos como taxas iniciais de evolução de oxigênio (Tovmasyan *et al.*, 2015a).

g Atividade catalítica da MnP como mímico GPx, os dados são expressos como porcentagem da atividade da enzima GPx e as velocidades iniciais de oxidação do NADPH (em parenteses) (Bueno-Janice *et al.*, 2015).

h Valor não disponível na literatura.

Os estudos dessas MnPs em modelo animal, camundongos Balb/C, de câncer de mama foram realizados em três experimentos (**Tabela 4.1**). No **Experimento I** foi estudado o efeito da MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺, com dose diária de 2 mg/kg, sobre a progressão do crescimento do tumor (**Fig. 4.3**). No **Experimento II** foram exploradas as MnPs MnTE-2-PyP⁵⁺ (**Fig. 4.5**) e MnTBAP³⁻ (**Fig. 4.7**), também com tratamentos de dose diária de 2 mg/kg. Já no **Experimento III** foi utilizada a mesma porfirina do primeiro experimento, MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺, porém com dose diária de porfirina 10 vezes inferior, 0,2 mg/kg (**Fig. 4.8**). As doses diárias de ascorbato, em todos os experimentos, foram inicialmente de 4 g/kg e, a partir do 4º dia, a dose foi reduzida para 1 g/kg (dose utilizada nos testes clínicos, fase II de glioblastoma, NCT02344355).

Em cada experimento os grupos foram separados em controle, 3 tratamentos isolados (MnP, Ascorbato ou Radiação), 3 tratamentos duplos (Ascorbato + Radiação, Radiação + MnP, Ascorbato + MnP) e tratamento triplo (Ascorbato + Radiação + MnP) (**Tabela 4.1**). No **Experimento I** (**Fig. 4.3**), o tratamento isolado utilizando apenas MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺ (MnBuOE) demonstrou ligeira eficácia na supressão do crescimento do tumor em relação à curva de crescimento do grupo controle, apresentando inibição tumoral de 29,3% ($\pm 12,4\%$) em relação ao grupo controle (**Fig. 4.4**).

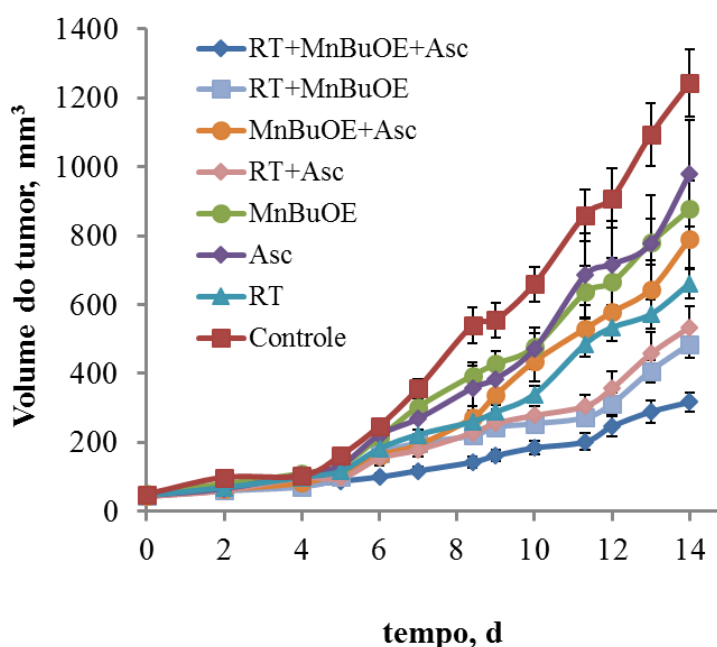


Figura 4.3 Curva de crescimento do tumor em relação aos dias de tratamento: **Experimento I** – Estudo dos efeitos combinados de MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺/Asc/RT, com doses de 2 mg/kg/dia de MnP. Sendo, RT: radiação; MnBuOE: MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺; Asc: ascorbato.

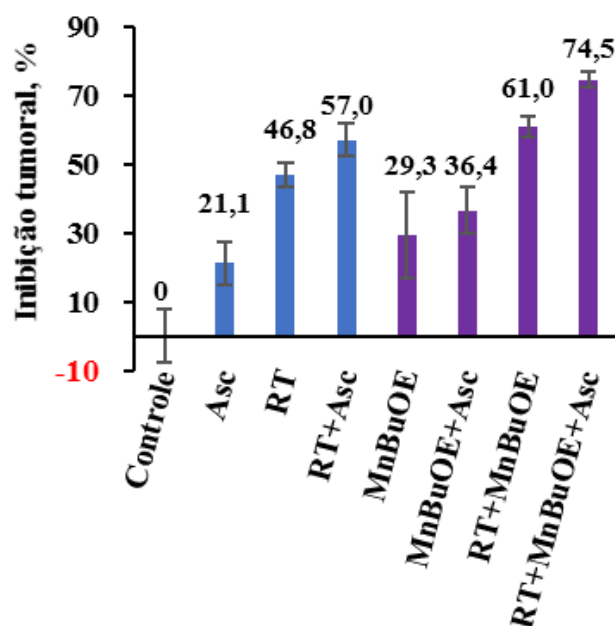


Figura 4.4 Inibição tumoral em relação ao tratamento controle, ao término do experimento (14º dia): **Experimento I** – Estudo dos efeitos combinados de MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺/Asc/RT, com doses de 2 mg/kg/dia de MnP. Sendo, RT: radiação; MnBuOE: MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺; Asc: ascorbato.

Os tratamentos combinados, duplos ou triplos, contendo a MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺ forma efetivos para diminuição do crescimento do tumor em relação ao controle. O tratamento da MnP em combinação com a radiação (RT+MnBuOE) apresentou efeito na diminuição do crescimento (61 ±3,1% de inibição tumoral) mais significativo em relação aos tratamentos isolados (tanto MnBuOE isolado, quanto para o RT isolado) que o tratamento de combinação dupla MnBuOE+Asc em relação aos seus tratamentos isolados (MnBuOE e Asc). O tratamento triplo (RT+MnBuOE+Asc) foi o tratamento combinado mais eficaz, apresentando efeito mais pronunciado na diminuição do crescimento do tumor, com inibição tumoral de 74,5% (±2,5%) no 14º dia de experimento.

No **Experimento II** não se observa diferença entre os tratamentos isolados de nenhuma das duas MnPs testadas (MnTE-2-PyP⁵⁺ - **Fig. 4.5**; MnTBAP³⁻ - **Fig. 4.7**; **Fig. 4.6**) em relação ao controle.

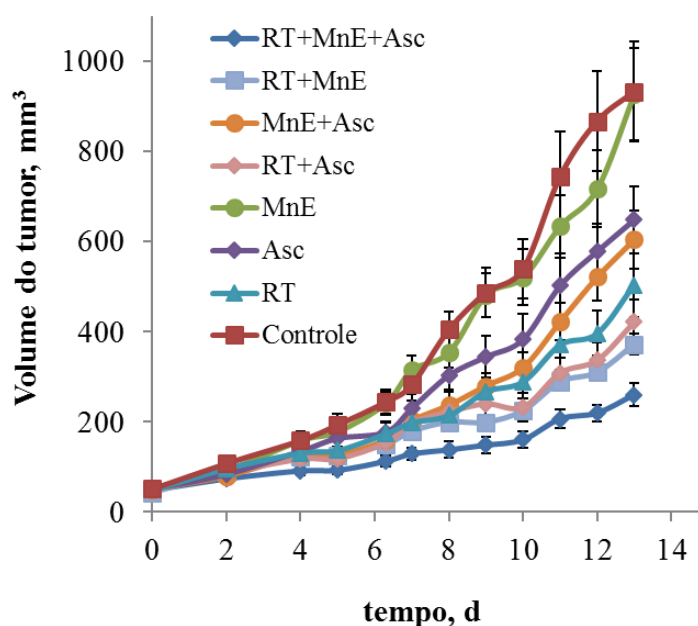


Figura 4.5 Curva de crescimento do tumor em relação aos dias de tratamento: **Experimento II** – Estudo dos efeitos combinados de MnP/Asc/RT, com doses de **2 mg/kg/dia** de MnTE-2-PyP⁵⁺. MnE: MnTE-2-PyP⁵⁺, Asc: ascorbato, RT: radiação.

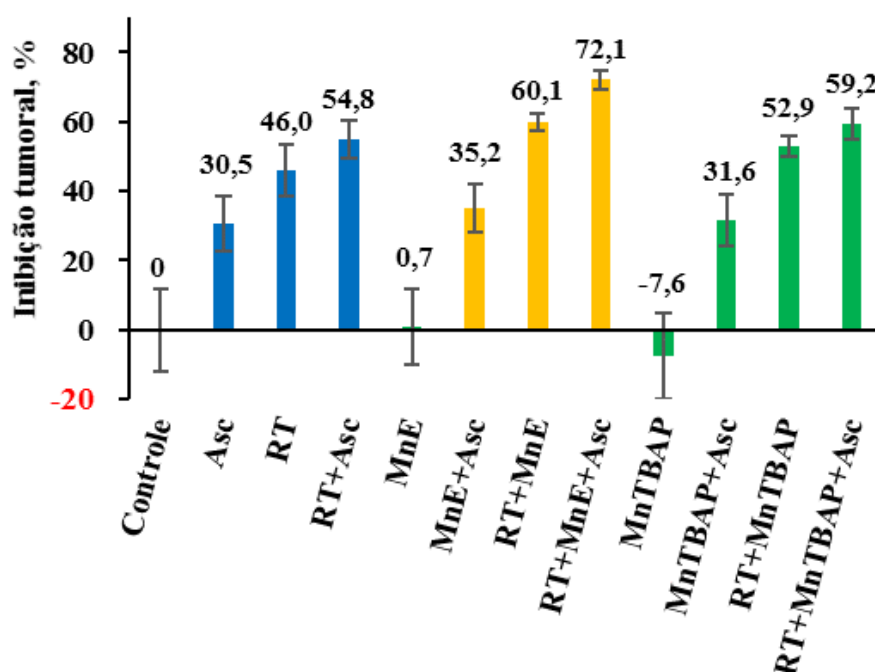


Figura 4.6 Inibição tumoral em relação ao tratamento controle, ao término do experimento (13º dia): **Experimento II** – Estudo dos efeitos combinados de MnP/Asc/RT, com doses de **2 mg/kg/dia** de MnP. Sendo, MnTBAP³⁻ ou MnTE-2-PyP⁵⁺ como MnP. MnTBAP: MnTBAP³⁻, MnE: MnTE-2-PyP⁵⁺, Asc: ascorbato, RT: radiação.

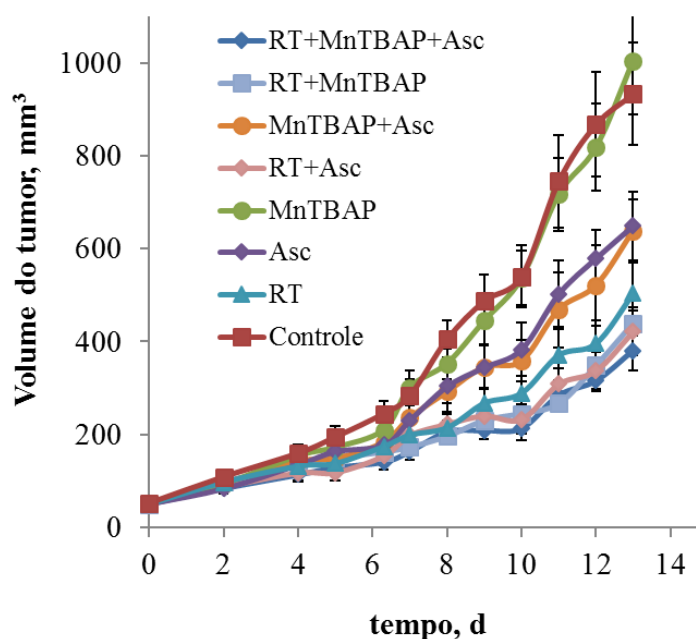


Figura 4.7 Curva de crescimento do tumor em relação aos dias de tratamento: **Experimento II** – Estudo dos efeitos combinados de MnP/Asc/RT, com doses de **2 mg/kg/dia** de MnP. MnTBAP³⁻ como MnP. MnTBAP: MnTBAP³⁻, Asc: ascorbato, RT: radiação.

Analisando os tratamentos de combinação dupla contendo MnTE-2-PyP⁵⁺ (RT+MnE e MnE+Asc) observou-se que, em comparação aos respectivos tratamentos isolados, apresentaram ligeira eficácia na supressão do crescimento do tumor, sendo o efeito na inibição tumoral do tratamento RT+MnE ($60,1 \pm 2,5\%$) mais pronunciado em relação aos seus respectivos tratamentos isolados, RT ($46,0 \pm 7,5\%$) e MnE ($0,7 \pm 10,9\%$). O tratamento triplo combinado (RT+MnE+Asc), assim como no **Experimento I**, foi o tratamento com efeito mais eficaz na diminuição do crescimento do tumor, com inibição tumoral de $72,1\% (\pm 2,7\%)$, apresentando valores de volume de tumor semelhantes ($\sim 200 \text{ mm}^3$) ao final de ambos os experimentos. Para os grupos tratados com MnTBAP³⁻ (**Fig. 4.7**), mesmo nos tratamentos combinados não se observou nenhuma contribuição do uso dessa porfirina, podendo-se associar os efeitos nos grupos aos quais essa porfirina está presente à ação do(s) outro(s) agente(s) terapêutico(s) administrado(s) concomitantemente.

O **Experimento III** (**Fig. 4.8 e 4.9**), com MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺ em dose diária de $0,2 \text{ mg/kg}$, apresenta comportamento similar ao dos outros experimentos contendo MnPs catiônicas.

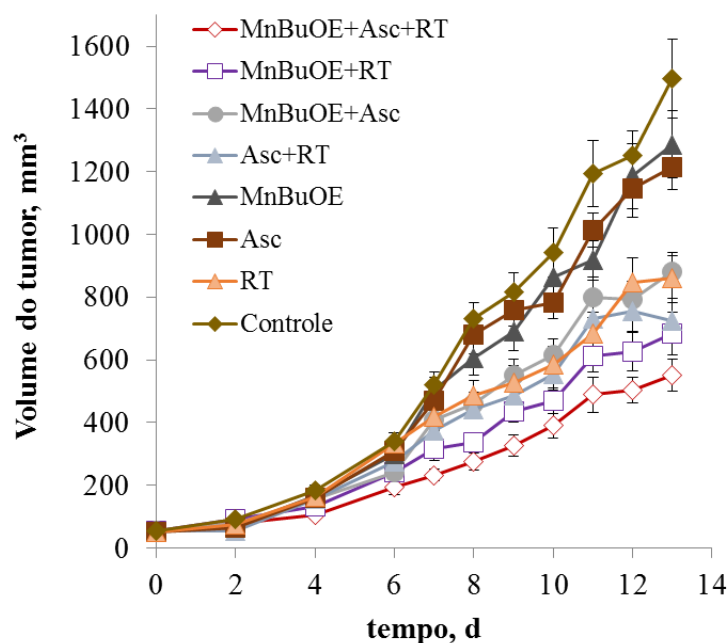


Figura 4.8 Curva de crescimento do tumor em relação aos dias de tratamento: **Experimento III** – Estudo dos efeitos combinados de MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺/Asc/RT, com doses de **0,2 mg/kg/dia** de MnP. MnBuOE: MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺, Asc: ascorbato, RT: radiação.

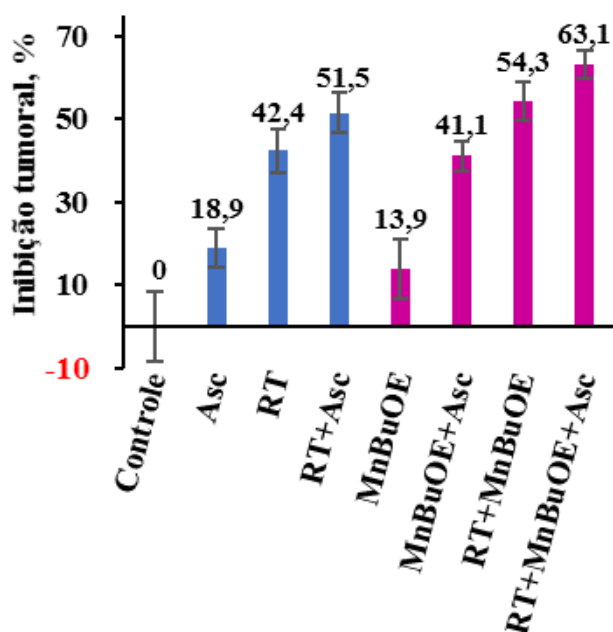


Figura 4.9 Inibição tumoral em relação ao tratamento controle, ao término do experimento (13º dia): **Experimento I** – Estudo dos efeitos combinados de MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺/Asc/RT, com doses de **0,2 mg/kg/dia** de MnP. Sendo, RT: radiação; MnBuOE: MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺; Asc: ascorbato.

O tratamento isolado utilizando somente MnP não apresentou inibição tumoral (13,9 ±7,2%) significativa em relação ao grupo controle. Já os tratamentos combinados, duplos ou

triplo, contendo MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺, demonstraram que a MnP contribuiu para aumentar o efeito dos tratamentos quando administrados em conjunto, com efeito mais pronunciado na diminuição do crescimento do tumor no tratamento triplo, com inibição tumoral de $63,1 \pm 3,4\%$ em relação ao controle.

Comparando os experimentos da MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺ em diferentes doses (**Experimentos I e III**), observa-se o efeito mais pronunciado para tratamento com MnP/Asc/RT em doses superiores (2 mg/kg/dia) – **Figs. 4.3-4 e 4.8-9**. Entretanto, mesmo no experimento com dose 10 vezes inferior (0,2 mg/kg/dia), é possível perceber o efeito significativo do tratamento triplo em relação aos outros tratamentos duplos combinados.

Sugere-se que os efeitos terapêuticos como anticâncer das MnPs estejam correlacionados a três fatores: a atividade catalítica na oxidação do ascorbato e, com isso, de aumentar a produção de H₂O₂ (Rawal *et al.*, 2013; Evans *et al.*, 2014; Tovmasyan *et al.*, 2015b, 2015c); a capacidade da MnP em modificar grupos tióis, como mímico GPx utilizando o H₂O₂ produzido, ocasionando a S-glutationilação de proteínas (Jaramillo *et al.*, 2012; 2015; Tong *et al.*, 2016; Batinić-Haberle; Tome, 2019); além da bioacumulação da MnP em tecidos e/ou células-alvo (Spasojević *et al.*, 2008; Miriyala, *et al.*, 2012; Weitner *et al.*, 2013).

Dentre as porfirinas empregadas, as duas MnPs catiônicas (MnTE-2-PyP⁵⁺ e MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺) destacam-se como potentes catalisadores da oxidação do ascorbato (**Tabela 4.2**), e como as mais citotóxicas quando administradas em conjunto com ascorbato em estudos *in vitro* (Tovmasyan *et al.*, 2014, 2015b; Evans *et al.*, 2014).

A porfirina aniônica, MnTBAP³⁻, apresenta as propriedades físico-químicas, elencadas na **Tabela 4.2**, bem distintas das outras duas porfirinas, e por isso foi utilizada com o intuito de explorar aspectos mecanísticos, tanto no que se refere à ação terapêutica quanto à bioacumulação nos tecidos. O efeito inexpressivo desta MnP aniônica na supressão do crescimento do tumor pode estar correlacionada ao fato da MnTBAP³⁻ apresentar potencial de redução do Mn muito negativo o que inviabiliza a oxidação do ascorbato; adicionalmente, essa porfirina não pode ser oxidada com H₂O₂ (em modelo catalase), o que é descrito como um pré-requisito para S-glutationilação (Batinić-Haberle, *et al.*, 2010, 2014; Tovmasyan *et al.*, 2015b, 2015c).

O nível de oxidação da glutathiona (GSH) foi analisado para os tecidos coletados do **Experimento II** (de todos os tratamentos, exceto para os que continham MnTBAP³⁻) para

verificar o estado redox do meio celular. A oxidação foi avaliada pela razão GSSG/GSH (**Fig. 4.10**), que é um marcador de estresse oxidativo.

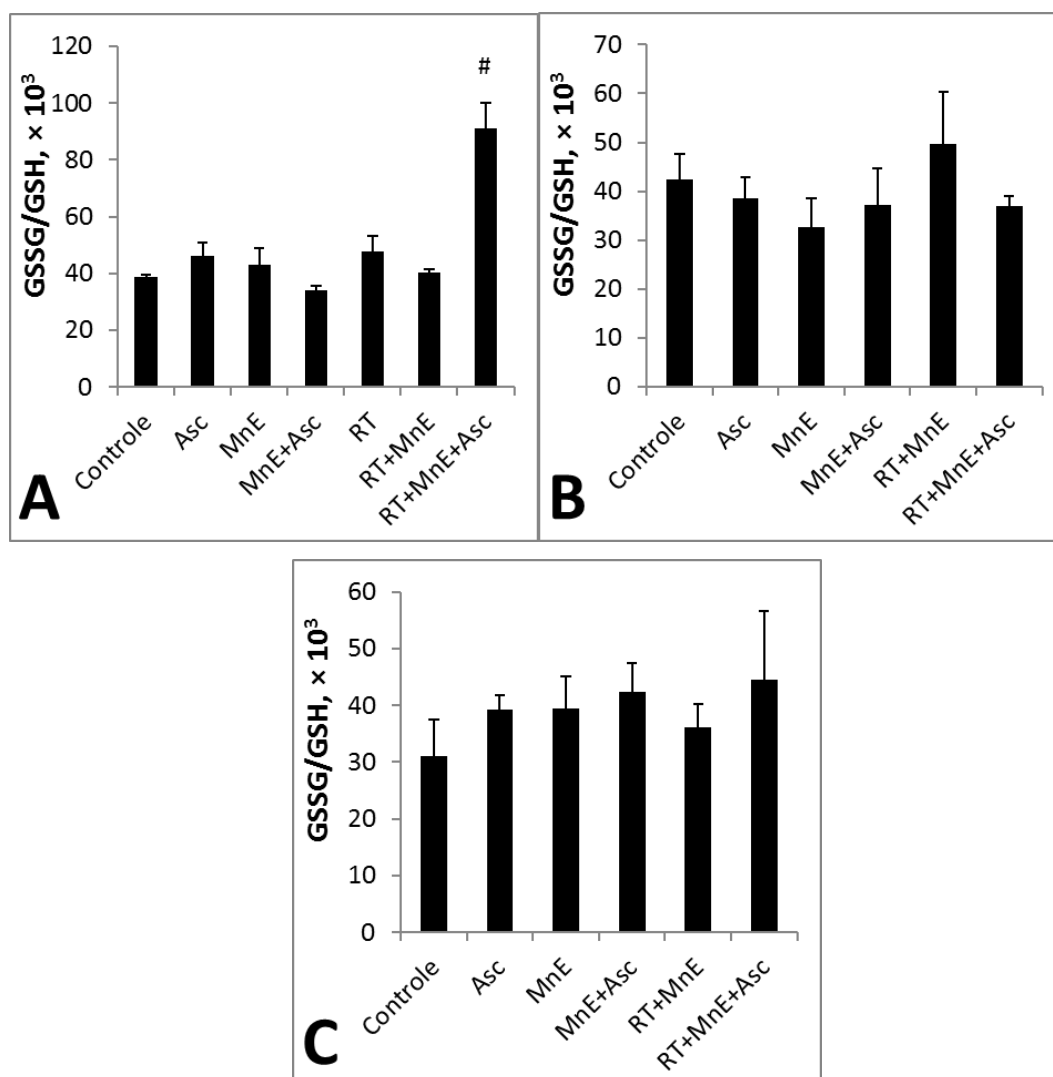


Figura 4.10 Efeito na razão GSSG/GSH nos tecidos coletados do **Experimento II**: **A)** tumor; **B)** fígado; **C)** músculo. MnE: MnTE-2-PyP⁵⁺, Asc: ascorbato, RT: radiação.

Observou-se que nos tecidos do tumor (**Fig. 4.10A**), somente o grupo tratado com a combinação tripla MnTE-2-PyP⁵⁺+Asc+RT apresentou variação significativa da razão GSSG/GSH. Esses dados corroboraram aqueles obtidos em análises de células 4T1 nos quais estudou-se, além da MnTE-2-PyP⁵⁺, a MnTBuOE-2-PyP⁵⁺, a MnTBAP³⁻ e a M40403 (amida policíclica); no estudo em modelo celular, apenas os grupos contendo a combinação tripla MnP+Asc+RT, com as porfirinas MnTE-2-PyP⁵⁺ e MnTBuOE-2-PyP⁵⁺, que ciclizam com ascorbato e agem como mímicos de GPx, apresentaram aumento significativo da razão GSSG/GSH (Tovmasyan *et al.*, 2018). Os tecidos de fígado e músculo do **Experimento II** (**Fig. 4.10B e C**), que não sofreram exposição direta à radiação, não apresentaram variações da razão GSSG/GSH em nenhum dos tratamentos analisados.

Com o intuito de avaliar a bioacumulação das MnPs em tecido normal (músculo) vs de tumor, os níveis de MnPs foram quantificados e analisados nos tecidos dos camundongos utilizados em diferentes tratamentos do estudo. Embora os métodos de análise para Mn-porfirinas catiônicas de modo geral já tenham sido estabelecidos, para obtenção dos dados de todos os grupos de tratamento contendo MnTE-2-PyP⁵⁺ e MnTnBuOE-2PyP⁵⁺, algumas modificações foram realizadas, visando-se aumentar a sensibilidade da análise, possibilitando a detecção de concentrações mais baixas. Os estudos de bioacumulação de MnTBAP³⁻ foram realizados somente para o grupo do tratamento isolado contendo apenas a MnP aniônica (isto é, os tratamentos duplos e triplo contendo essa porfirina não foram analisados), uma vez que não se observou contribuição do uso desta MnP no estudo de diminuição do crescimento do tumor. A bioacumulação de MnTBAP³⁻ foi realizada pela primeira vez e, portanto, foram desenvolvidos o método de preparo de amostra (extração da droga do tecido), bem como o método de análise.

Sendo a MnTBAP³⁻ uma porfirina aniônica, seu comportamento tanto na extração da droga, quanto a sua eluição na cromatografia líquida, apresentou características totalmente distintas das demais MnPs analisadas (MnTE-2-PyP⁵⁺ e MnTnBuOE-2PyP⁵⁺). Desse modo, testes prévios sem a matriz biológica, contendo somente a MnTBAP³⁻ e seu padrão interno, H₂TBAP⁴⁻ (base livre da MnTBAP³⁻), foram realizados com o intuito de verificar o melhor sistema para extração da porfirina. Para o pré-tratamento das amostras, escolheu-se para a extração da droga do tecido animal um sistema contendo solução aquosa ácida de ácido fórmico a 1%, metanol (proveniente da solução do padrão interno – vide procedimento metodológico) e clorofórmio/isopropanol (4:1, v/v), essa última mistura foi utilizada para proporcionar a precipitação das proteínas. O metanol também auxilia na ruptura das células, porém o principal intuito para seu emprego foi o de facilitar a solubilidade das porfirinas na fase aquosa.

Os dados do acúmulo das MnPs em tecidos tratados apenas com MnP (**Fig. 4.11**) mostram que todas porfirinas acumularam mais no tumor do que no músculo. Observa-se também o alto acúmulo da MnTBAP³⁻, com níveis de ~20 vezes superior aos das MnPs catiônicas. As proporções dos níveis das MnPs em tecido de tumor vs tecido muscular foi maior para MnTE-2-PyP⁵⁺ (12,2), seguido da MnTBAP³⁻ (5,4) e MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺ (3,1). Atribui-se como mecanismo de acumulação das MnPs catiônicas nos tecidos a presença de cargas positivas e as longas cadeias alquílicas que aumentam a lipofilia (Batinić-Haberle *et al.*, 2010, 2014, 2016a).

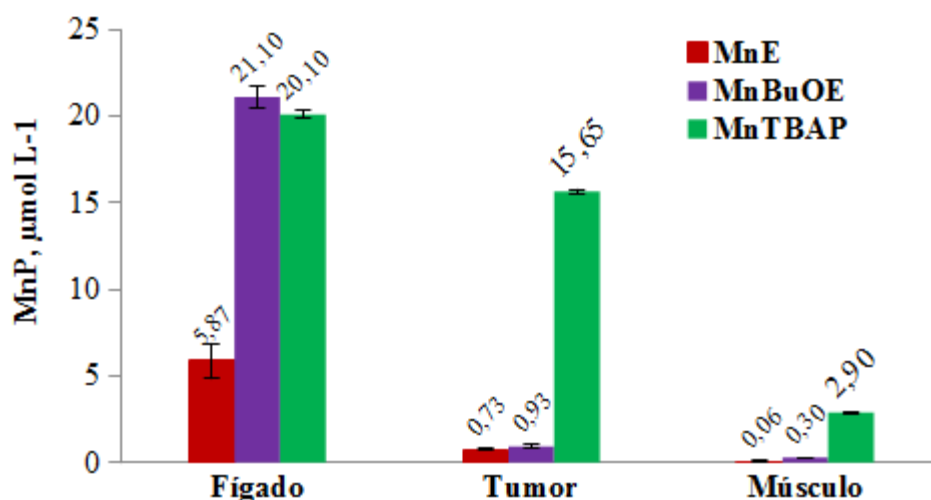


Figura 4.11 Acumulação de Mn-porfirinas nos tecidos de camundongos para os **Experimentos I e II**. Doses de MnP: 2 mg/kg/dia. Os dados de bioacumulação da MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺ estão expostas a título de comparação, os dados foram obtidos anteriormente pelo grupo (Tovmasyan *et al.*, 2018). Sendo MnE a MnTE-2-PyP⁵⁺, MnBuOE a MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺ e MnTBAP a MnTBAP³⁻.

Quando se comparou a acumulação dessas MnPs nos tecidos de tumor (*in vivo*, este trabalho) e em células 4T1 (*in vitro*) (Tovmasyan *et al.*, 2018) observaram-se resultados distintos. Enquanto nos tecidos de tumor (*in vivo*) o acúmulo de MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺ foi apenas ligeiramente superior ao da MnTE-2-PyP⁵⁺, nos modelos celulares 4T1 (*in vitro*) foi seis vezes superior. Já a MnTBAP³⁻ teve sua acumulação em células 4T1 *in vitro* em proporções muito similares ao da MnTE-2-PyP⁵⁺ (Tovmasyan *et al.*, 2018).

Os níveis de MnPs no fígado (**Fig. 4.12**) são os maiores entre os tecidos coletados (**Experimentos I e II**), e dados de farmacocinética mostram que isso também ocorre em relação aos outros órgãos já estudados (Leu *et al.*, 2017; Spasojević *et al.*, 2008; Weitner *et al.*, 2013), uma vez que o fígado serve como depósito para redistribuição das MnPs para outros tecidos. Nenhuma toxicidade a esse órgão foi reportada, embora o acúmulo de MnPs cause descoloração das células de Kuppfer (Batinić-Haberle *et al.*, 2014, 2016), e os resultados obtidos nesse capítulo corroboram bem os perfis de toxicidade/segurança dessas MnPs (Gad *et al.*, 2013, 2016).

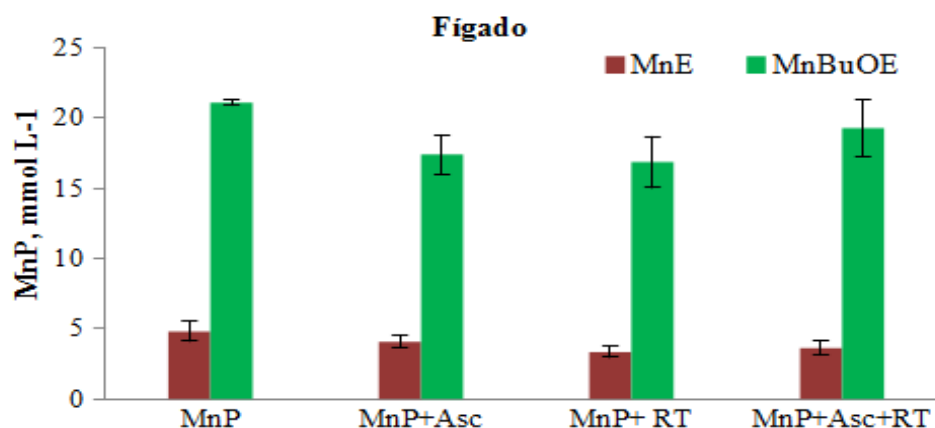


Figura 4.12 Acumulação de Mn-porfirinas em fígado de camundongos submetidos a diferentes tratamentos. Dose diária de MnP: 2 mg/kg/dia. Os dados da MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺ estão expostas a título de comparação, os dados foram obtidos anteriormente pelo grupo (Tovmasyan *et al.*, 2018).

Além disso, os resultados dos diferentes grupos de tratamento no mesmo tipo de tecido, principalmente entre os tratamentos combinados em relação ao tratamento isolado, permitem inferir que não deve haver degradação significativa da porfirina nem na presença de ascorbato, nem de radiação (**Figs. 4.12, 4.13 e 4.14**). Ainda que, quando cicliza com Asc, a MnP catiônica se reduz formando um composto mais lipofílico, tetracatiônico Mn^{II}P⁴⁺, este rapidamente se oxida aerobicamente ao composto original pentacatiônico Mn^{III}P⁵⁺. Na presença de H₂O₂ (ou peroxinitrito, ONOO⁻), tanto a espécie Mn^{II}P⁴⁺ quanto a espécie Mn^{III}P⁵⁺ pode ter o metal oxidado ao estado tetra ou pentavelente, formando espécies com mesma carga ou carga inferior o que gera diferentes lipofilias (tetracatiônica O=Mn^{IV}P⁴⁺ ou tricatiônica (O)₂Mn^VP³⁺). Embora essas espécies ativas de alta valência possuam diferentes lipofilias, por apresentarem um breve transiente de existência elas não interferem na bioacumulação, desse modo não há diferença na biodistribuição dessas MnPs, independente do tratamento utilizado, mesmo naqueles contendo Asc (Spasojević *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2011).

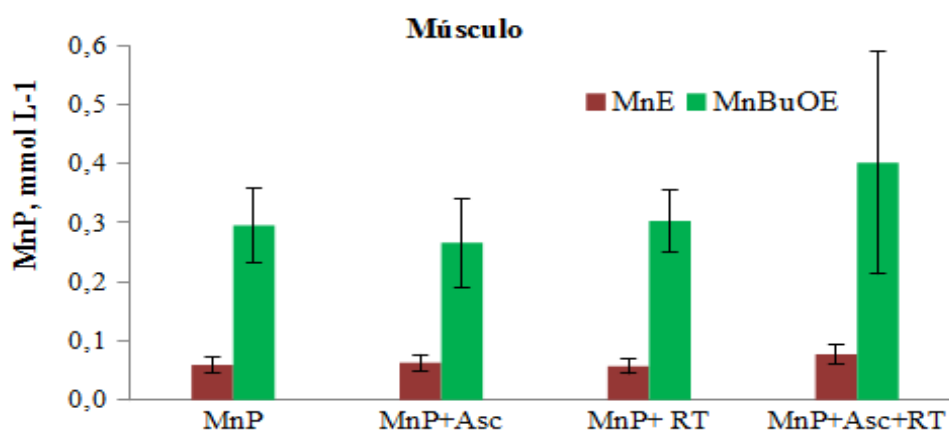


Figura 4.13 Acumulação de Mn-porfirinas em tecido muscular de camundongos submetidos a diferentes tratamentos. Dose diária de MnP: 2 mg/kg/dia. Os dados da MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺ estão expostas a título de comparação, os dados foram obtidos anteriormente pelo grupo (Tovmasyan *et al.*, 2018).

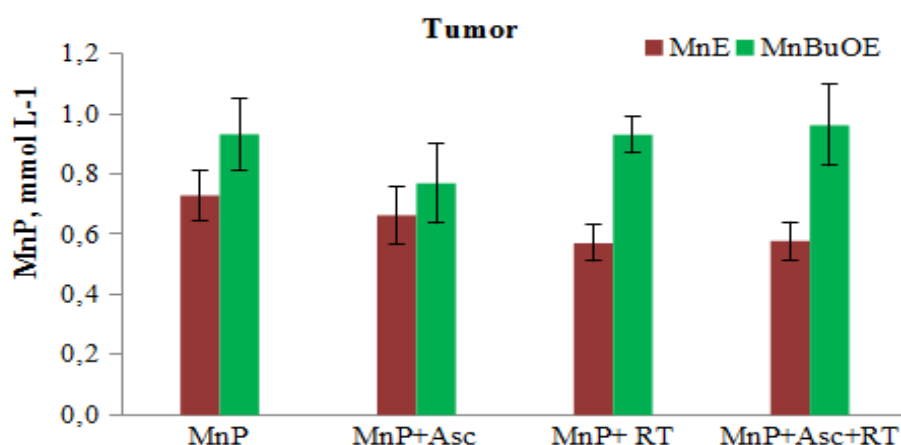


Figura 4.14 Acumulação de Mn-porfirinas em tumor de camundongos submetidos a diferentes tratamentos. Dose diária de MnP: 2 mg/kg/dia. Os dados da MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺ estão expostas a título de comparação, os dados foram obtidos anteriormente pelo grupo (Tovmasyan *et al.*, 2018).

As análises dos tecidos dos experimentos realizados com as MnPs catiônicas (**Experimentos I e II**), corroboraram os dados obtidos nas curvas de crescimento do tumor, que apontam resultados semelhantes entre a MnTE-2-PyP⁵⁺ e a MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺ no tratamento triplo (para os tratamentos com a mesma dose diária). Por apresentarem atividade catalíticas na oxidação do ascorbato, atividade GPx (**Tabela 4.2**) e bioacumulações no tecido do tumor semelhantes (**Figs. 4.12, 4.13 e 4.14**), a ação na redução do crescimento do tumor foi similar.

4.5 CONCLUSÕES

O estudo desenvolvido com modelos animais de câncer de mama e MnPs de características distintas evidenciaram que apenas as MnPs catiônicas MnTE-2-PyP⁵⁺ e a MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺, quando em combinação com ascorbato e radiação, alteram a razão GSSG/GSH e se tornam capazes de levar à sensibilização do tumor.

A técnica de LC-MS/MS, que já era utilizada para estudos de bioacumulação e farmacocinética das MnPs catiônicas, nesse estudo foi estendida para a detecção de outra MnP de interesse, a aniônica MnTBAP³⁻, que embora não tenha apresentado efeito terapêutico para o experimento realizado, apresentou dados de bioacumulação animadores que podem auxiliar a desvendar a eficácia dessa droga em outros modelos experimentais para tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (Tovmasyan *et al.*, 2014; Levrand *et al.*, 2006; Bottino *et al.*, 2002; Celić *et al.*, 2014; Vukelić *et al.*, 2015).

De modo geral, os resultados das curvas de crescimento do tumor acrescido aos dados de bioacumulação evidenciaram a relação entre a acumulação das MnPs e as propriedades químicas (reatividade com o ascorbato e GSH), nos efeitos terapêuticos desses compostos. Portanto, dado que a combinação das MnPs catiônicas (MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺ ou MnTE-2-PyP⁵⁺) com o ascorbato resultou no aumento da eficiência da radioterapia (nas cobaias), podemos concluir que MnP e ascorbato demonstra ser uma associação bastante promissora para tratamentos radioterápicos de câncer de mama.

CAPÍTULO 5: MnTE-2-PyPCl₅ como potencial promotor de crescimento e atenuador de estresse salino em plantas de sorgo sacarino [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] cultivado em meio hidropônico com perlita

5.1 INTRODUÇÃO

O processo de salinização dos solos se destaca como um dos principais problemas para a agricultura mundial e os efeitos mais danosos são nas áreas com racionamento hídrico, como as regiões áridas e semiáridas. A alta concentração de sais no solo é um fator de estresse para as plantas e compromete o desenvolvimento e produtividade das culturas agrícolas. Até mesmo plantas tolerantes à alta salinidade podem ter seu desenvolvimento limitado se comparado ao cultivo em região de salinidade controlada (Pitman; Lauchli, 2002; Hefny *et al.*, 2009; Pessarakli *et al.*, 2010; Sofo *et al.*, 2015).

O estresse salino do solo pode gerar efeitos primários (iônico e osmótico) e secundários (estresse oxidativo) no organismo vegetal (Pang; Wang, 2008; Sekmen *et al.*, 2013). A alta concentração de sais no solo causa toxicidade celular devido ao acúmulo de altos níveis de Na⁺ e Cl⁻, o que provoca um desequilíbrio iônico nas células, resultando em modificações na membrana plasmática e na composição de proteínas, podendo afetar o crescimento e desenvolvimento normal da planta (Fujii; Zhu, 2009; Osakabe *et al.*, 2013). O desequilíbrio osmótico gerado pela alta concentração de íons no solo faz com que diminua a água disponível para o vegetal (Munns, 2002). O equilíbrio osmótico comprometido das plantas submetidas ao estresse hídrico/salino, ocasiona o fechamento dos estômatos e, com isso, a diminuição de fixação de CO₂ e das taxas fotossintéticas, limitando o desenvolvimento da planta, uma vez que a assimilação de carbono é o principal processo associado à produção de biomassa (Parida; Das, 2005; Osakabe *et al.*, 2013).

As plantas respondem a fatores de estresse abióticos – alta salinidade, seca, altas temperaturas, baixas temperaturas, exposição excessiva à luz – por meio da geração de espécies reativas, tais como o radical superóxido (Meng *et al.*, 2012; Kocabay *et al.*, 2013; Sobhanian *et al.*, 2011; Osakabe *et al.*, 2013). Para que não ocorra o acúmulo de espécies reativas a níveis tóxicos, o organismo possui um sistema de defesa, com antioxidantes enzimáticos (como superóxido dismutase, catalase, peroxidases e ascorbato peroxidase) e não enzimáticos (glutathione, ascorbato, tocoferóis e outros). O desequilíbrio entre a formação e

remoção de espécies reativas, ocasionando o acúmulo dessas espécies leva ao estresse oxidativo na célula vegetal o que resulta na acentuação da peroxidação lipídica, da desnaturação de proteínas e dos danos em ácidos nucleicos, comprometendo o desenvolvimento do organismo, o que eventualmente também compromete a produção de biomassa (Espindola *et al.*, 2003; França *et al.*, 2007; Osakabe *et al.*, 2013).

Muitos modelos vegetais experimentais em laboratórios de pequeno porte fazem uso de hidroponia como método de cultivo. A hidroponia consiste numa forma de cultivo de vegetais sem solo, que pode ser realizado com ou sem substrato, sendo os nutrientes fornecidos às plantas unicamente pela solução nutritiva (Carrijo, Makishima, 2000; du Toit; Labuschagne, 2007). As plantas crescem em sistema hidropônico tendo suas raízes imersas na solução nutritiva. Entretanto, para o desenvolvimento de plantas terrestres nesse tipo de cultivo, é necessária a presença de um substrato, que é o suporte para a fixação das raízes (Sardare; Admane, 2013). Os substratos podem ser um meio inorgânico (pedra, areia, vermiculita,¹ perlita,² entre outros), orgânico (fibra de coco, bagaço de cana triturado, turfa, entre outros) ou misto (mistura de orgânico e inorgânico) (Hussain *et al.*, 2014; Makishima; Carrijo, 2000). Dentre as características desejáveis para um bom substrato destaca-se que esse deve ser inerte (ou seja, deve interagir minimamente com os nutrientes da solução nutritiva), apresentar alta capacidade de retenção de água, estar livre de contaminantes (agentes patogênicos e metais pesados), ser barato e reciclável (Makishima; Carrijo, 2000).

O sorgo é uma gramínea de grande interesse biotecnológico e um dos principais cereais produzidos no mundo, servindo de alimento para seres humanos e animais, além de ser uma opção para a produção de etanol (Ribas *et al.*, 2008). A espécie de sorgo sacarino *Sorghum bicolor* (L.) Moench é cultivada no semiárido do nordeste brasileiro e há um grande interesse econômico nas melhorias de seu cultivo. Apesar de o sorgo sacarino ser uma planta com moderada tolerância a altas salinidades, o cultivo no semiárido nordestino (região que apresenta

¹ A vermiculita é um argilomineral pertencente à classe dos filossilicatos com estrutura lamelar contendo camadas tetraédricas e octaédricas do tipo 2:1. A carga lamelar negativa é compensada por cátions hidratados interlamelares (geralmente Na⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺) que são livremente organizados e facilmente trocáveis. A fórmula química estrutural aproximada é (Mg,Ca)_{0,7}(Mg,Fe,Al)₆[(Al,Si)₈O₂₀](OH)₄.8H₂O. Essas moléculas de água são em grande parte responsáveis pela propriedade de expansão da vermiculita (Fonseca *et al.*, 2005; Pinto, 2013)

² A perlita é um mineral vulcânico, classificado como um aluminossilicato amorfo, constituído de ~74% de SiO₂ e ~15% de Al₂O₃ (Silva Filho *et al.*, 2017). Quando a perlita é submetida a rápido aquecimento, acima de ~700°C, tem seu volume expandido em até 20 vezes. A perlita bruta apresenta 2-6% de moléculas de água em sua estrutura e a evaporação dessas é associada à expansão desse mineral (Angelopoulos *et al.*, 2016).

racionamento hídrico e, com isso, alta concentração de sais no solo) pode comprometer o pleno desenvolvimento e a produtividade do vegetal.

Nesse contexto, é relevante investigar o potencial biotecnológico do uso de moduladores redox para a produção de biomassa vegetal sob condições de estresse salino. Levando-se em conta a relação entre estresse oxidativo endógeno e o estresse ambiental o uso de moduladores redox pode contribuir para amenizar os efeitos nocivos gerados pelas espécies reativas. Estudos na literatura sobre a atenuação do estresse oxidativo (gerado por estresse ambiental) pela administração de mímicos de superóxido dismutase (SOD) são escassos. O único trabalho encontrado na literatura foi o de Meng e colaboradores, no qual foi constatada a melhoria da cultura do arroz sob condições de seca, por meio do uso de três complexos de Cu(II), mímicos de SOD, reduzindo a produção de espécies reativas nas plântulas de arroz (10 dias) sob estresse hídrico (Meng *et al.*, 2012).

Vale salientar que não há, até o presente momento, estudos relatados na literatura sobre o uso de Mn-porfirinas como adjuvantes para o crescimento de plantas. Assim, o emprego de Mn-porfirinas sintéticas apresenta-se, portanto, como uma estratégia inédita para atenuar os efeitos do estresse dentro de um modelo de sorgo sacarino sob estresse salino e dessa forma aumentar a biomassa sob alta salinidade.

5.2 OBJETIVOS

Desenvolver um modelo vegetal para estudar a ação de Mn-porfirinas como atenuadoras de estresse salino. Para tanto:

- Estabelecer um modelo experimental de pequeno porte, em laboratório, para o estudo do sorgo sacarino [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], com e sem estresse salino, em meio hidropônico com diferentes substratos.
- Analisar a adsorção e dessorção da MnTE-2-PyPCL₅ nos substratos areia e perlita;
- Implementar o uso de MnTE-2-PyPCL₅ em modelo vegetal com sorgo sacarino em laboratório, como potencial adjuvante para a fase inicial de desenvolvimento do sorgo cultivado em meio hidropônico, sob estresse salino.

5.3 PARTE EXPERIMENTAL

Os experimentos apresentados nesse Capítulo foram realizados no Laboratório de Síntese Orgânica e Biocatálise (Departamento de Química) do Centro das Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e foram desenvolvidos com o auxílio da, então, aluna de iniciação científica Barbara de Mariz Silva.

5.3.1 Materiais

Os sais cloreto de sódio (NaCl), nitrato de amônio (NH₄NO₃) e nitrato de potássio (KNO₃) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. A MnTE-2-PyPCl₅ (BMX-010) é proveniente da BioMimetix Pharmaceuticals. A cultivar Wray (AR-SEA-USDA, Reg. N° 119) de sorgo sacarino [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] foi obtida do banco de germoplasma do Instituto Agronômico de Pernambuco – IPA (Recife, PE). A solução nutritiva utilizada nos experimentos foi preparada segundo Hoagland & Arnon (1950). A matriz de areia é de fonte local (padronização e higienização no **item 5.3.2**), enquanto a perlita (tipo PAC, 3 – 10 mm) foi adquirida da Schumacher insumos.

5.3.2 Padronização de substrato areia e perlita e capacidade de retenção de água

100 g da amostra de areia pré-tratada³, utilizadas nos **Experimentos I-IV**, foram peneiradas (9, 16, 32, 60, 115, 250 e 500 Mesh) e as porções retidas nas respectivas peneiras foram coletadas e pesadas. Posteriormente, a perlita, utilizada no **Experimento V**, foi macerada e peneirada (16, 32, 60 e 115 Mesh), na sequência esse substrato foi padronizado conforme as porções retidas nas peneiras de 16, 32 e 115 Mesh na seguinte proporção 20:40:40, respectivamente.

Uma porção de 3,72 g de perlita padronizada foi adicionada a um pote de PVC, com tampa rosqueada, perfurado no fundo. Na sequência, água destilada (~20 mL) foi adicionada até o saturar os espaços porosos da perlita, então o sistema foi fechado, a tampa foi envolta com parafilme e a massa do sistema foi aferida gravimetricamente. Após 24 h de repouso, o sistema foi novamente pesado e com base na quantidade de água retida determinou-se o coeficiente de retenção de água (CRA) de 70% (3,42 g H₂O/ g perlita).

³ Areia pré-tratada com ácido clorídrico, NaOH, hipoclorito de sódio, detergente e autoclavada.

5.3.3 Testes de adsorção e dessorção da MnTE-2-PyPCL₅ nos substratos areia e perlita

Em um tubo Falcon 15 mL foi colocado 0,12 g de perlita padronizada, em seguida foram adicionados 1000 µL de solução aquosa de MnTE-2-PyPCL₅ a 100,0 µmol L⁻¹. Após 48 h, o sobrenadante foi filtrado e a quantidade de MnP foi determinada espectrofotometricamente. Em seguida, foram realizadas sucessivas lavagens (1x 1,0 mL de água destilada; 4x 1,0 mL de solução aquosa de HCl 1 mol L⁻¹; 1x 2,0 mL de solução aquosa de HCl 1 mol L⁻¹) e a quantidade de MnP dos filtrados (filtrados ou lixiviados de lavagem) também foram determinadas espectrofotometricamente. O mesmo procedimento foi realizado para a areia, exceto que a massa de substrato utilizada foi de 1,44 g e a concentração da solução aquosa de MnTE-2-PyPCL₅ foi 200,0 µmol L⁻¹.

5.3.4 Esterilização da solução aquosa de MnTE-2-PyPCL₅

A solução aquosa de MnTE-2-PyPCL₅ de 5 mmol L⁻¹ foi esterilizada por filtração utilizando milipore (22 µm) na câmara de fluxo laminar com o auxílio de seringa e coletados em tubos de rosca de externa de 5 mL estéreis. Em seguida, a concentração foi determinada espectrofotometricamente, utilizando o coeficiente de absorvidade molar do MnTE-2-PyPCL₅ ($\epsilon_{454} = 138038$). Na sequência, as soluções foram diluídas para que o mesmo volume (700 µL) fosse adicionado em todos os tratamentos.

5.3.5 Experimento de cultivo

5.3.5.1 Testes dos níveis de nitrogênio (NO₃⁻ e NH₄⁺): Experimento I

Potes de PVC (diâmetro 3,8 cm e altura 5,5 cm) com tampas rosqueadas (com três furos de ~5 mm/cada), foram preenchidos com 75 g de substrato areia padronizada (**item 5.3.2**), seca e esterilizada (autoclave 121 °C, 3 vezes) e revestidos externamente com folhas de alumínio. Foi adicionada solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) até 70% da CRA (13,0 mL) – **Fig. 5.1**.

Plantio:

- 75 g de areia
- 13 mL de solução nutritiva de Hoagland & Arnon
- 2 sementes/ cova

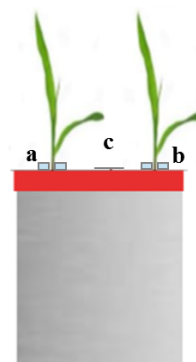
Após desbaste:

Figura 5.1 Esquema dos potes de cultivo utilizados nos **Experimentos I-IV**. As letras **a** e **b** se referem aos furos nas tampas sobre as covas nos quais as sementes foram plantadas e pelos quais as plântulas emergiram. A letra **c** se refere ao furo na tampa no qual foi realizada a reposição de água evapotranspirada.

Em seguida, 2 covas de ~2 cm de profundidade foram feitas no substrato logo abaixo de dois furos da tampa e sementes (selecionadas quanto ao tamanho) superficialmente esterilizadas (etanol 70% por 1 min, hipoclorito de sódio a 1% por 2 min duas vezes, lavagem água destilada estéril cinco vezes) foram adicionadas (2 por cova) e o sistema foi incubado em câmara de crescimento (fotoperíodo de 12 h/ 28 ± 1 °C). Cinco dias após a emergência das plântulas se realizou a seleção/desbaste (1 plântula/furo) e os furos foram fechados com tufos de espuma (também esterilizada em autoclave).

O experimento foi realizado envolvendo um planejamento fatorial 2x2, com 4 repetições, seguindo um delineamento inteiramente casualizado. Os fatores estudados foram: a) salinidade ($0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ e 75 mmol L^{-1}) e b) nível de nitrogênio (4 mmol L^{-1} e 16 mmol L^{-1}).

Diariamente, durante o cultivo, foram medidas as alturas das plântulas e a reposição da água evapotranspirada. O mesmo procedimento acima realizado, porém, sem plantas, foi incluído como controle gravimétrico da água evaporada. Após o desbaste, a reposição de nitrogênio [$\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$ (2:1)] foi feito a cada 72 h. Completados 12 dias de cultivo processou-se a coleta das plântulas, separando a parte aérea e as raízes. As medidas da biomassa da parte aérea (BPA) e da raiz (BR) foram aferidas.

5.3.5.2 Testes dos níveis de Salinidade (Experimento II, III e IV)

Foram realizados três experimentos simples seguindo um delineamento inteiramente casualizado. O fator estudado em todos os três experimentos foi a salinidade, para os **Experimentos II e III** os níveis de salinidade foram de 8, 80, 120, 160, 200 e 240 mmol L⁻¹ de NaCl, com 4 e 5 repetições/tratamento para o **Exp. II e III**, respectivamente. Para o **Experimento IV**, os níveis de salinidade foram 8, 80 e 120 mmol L⁻¹ de NaCl, com 5 repetições. Todos estes experimentos foram realizados com o nível de nitrogênio de 16 mmol L⁻¹ e conforme procedimento descrito no **item 5.3.5.1**.

5.3.5.3 Testes dos níveis de MnTE-2-PyPCL₅ (Experimento V)

Potes de PVC foram preenchidos com 7,8 g de substrato perlita padronizada e esterilizada (autoclave 121°C, 3 vezes) conforme **item 5.3.2**. Foram adicionados na sequência para atingir 70% CRA solução nutritiva de Hoagland & Arnon (26,0 mL) com concentração de nitrogênio (NO³⁻:NH₄⁺ (2:1)) de 16 mmol L⁻¹ e solução de MnTE-2-PyPCL₅ (0,7 mL) para concentração na faixa de 0 – 100 mmol.L⁻¹. Em seguida, as sementes foram adicionadas às covas como no **item 5.3.5.1**. Na germinação, após a emergência das plântulas se realizou a seleção/desbaste (1 plântula/furo) e os furos foram fechados com tufo de espuma estéril. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2X4, com dois níveis de salinidade (S0= 8 mmol; S1= 100 mmol L⁻¹ de NaCl) e 4 níveis de MnP (E0= 0; E1= 1 µmol L⁻¹; E2= 10 µmol L⁻¹; E3= 100 µmol L⁻¹), com 4 repetições/tratamento (**Fig. 5.2**).

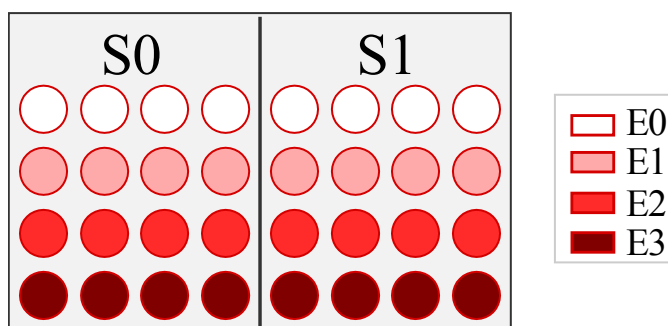


Figura 5.2 Desenho do **experimento V** realizado em esquema fatorial 2x4, com dois níveis de salinidade (S0= 8 mmol L⁻¹; S1= 100 mmol L⁻¹ de NaCl) e quatro níveis de MnTE-2-PyPCL₅ (E0= 0 µmol L⁻¹; E1= 1 µmol L⁻¹; E2= 10 µmol L⁻¹; E3= 100 µmol L⁻¹), em quadruplicata.

A reposição da água evapotranspirada foi feita por controle gravimétrico. Diariamente, após o desbaste, foram medidas as alturas das plântulas. Completados 14 dias de experimento processou-se a coleta das plântulas, separando a parte aérea e as raízes. Foram realizadas as

medidas de teor de clorofila foliar (CT), massas verde e seca da parte aérea (BPA e MSPA) e da raiz (BR e MSR).

5.3.6 Equipamentos

Os espectros eletrônicos de absorção na região do UV-VIS (300-800 nm) para análise da clorofila foram registrados em espectrofotômetro da marca Agilent (modelo Cary 60 UV-VIS) ou da marca Shimadzu (modelo UV-1800), com resolução 1 nm, utilizando-se cubetas de quartzo com caminho óptico de 10 mm.

Uma autoclave Vertical Phoenix/Luferco foi utilizada para as esterilizações. A manipulação estéril foi realizada em uma Capela de Fluxo Laminar Vertical Pachane (modelo PCR2).

5.3.7 Análise estatística

As análises de variância (ANOVA) foram realizadas com o software Rstudio 1.2.5033 (RStudio, Inc.), com o pacote Easyanova, os efeitos dos tratamentos foram avaliados pela estatística F para o nível de significância de 5% de probabilidade e as médias desses efeitos foram comparadas pelo teste de Duncan ou Tukey.

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos envolvendo modelo vegetal de estresse salino e o uso de biomiméticos de SOD como atenuador dos efeitos desse estresse são escassos. Não foi encontrado registro na literatura de estudo envolvendo modelo vegetal de estresse salino e o uso de MnPs. No intuito de iniciar os estudos dessa nova área, diferentes condições foram estudadas para montagem de modelo de cultivo vegetal sob estresse salino.

Inicialmente, para desenvolvimento do modelo vegetal escolheu-se o sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), devido a seu potencial regional, uma vez que é uma planta cultivada na região do semiárido nordestino. No grupo de pesquisa coordenado pelo professor Cosme Martinez (Departamento de Química, UFPB) há um modelo de cultivo já bem estabelecido para essa gramínea, no qual a planta é cultivada por 30 dias, em vasos de 550 mL com 780 g de areia (Nascimento *et al.*, 2012). Como o volume utilizado de areia é muito grande (impraticável para a escala atual de síntese das MnPs nos nossos laboratórios) optamos por tentar desenvolver outro modelo miniaturizado de cultivo de modo a viabilizar os testes iniciais do uso das MnPs.

5.4.1 Experimentos para desenvolvimento de modelo vegetal de cultivo do sorgo sacarino - substrato areia: efeito de nitrogênio e salinidade

Dos parâmetros avaliados (altura, BPA, BR e BT), no **Experimento I**, o único que apresentou diferença significativa quanto aos tratamentos foi a biomassa da parte aérea (BPA), **Fig. 5.3**, especificamente para os tratamentos com diferentes níveis de nitrogênio ($p = 0,0026$). Os tratamentos com menores concentrações de nitrogênio apresentaram as menores médias de BPA, desse modo, observa-se que os tratamentos contendo 16 mmol L^{-1} de nitrogênio (N1) foram os que possibilitaram melhores condições para o desenvolvimento da biomassa da parte aérea do sorgo sacarino nas condições estudadas. Com isso foi definida a concentração de 16 mmol L^{-1} de nitrogênio como ideal para o desenvolvimento adequado do sorgo em condições normais (sem estresse salino).

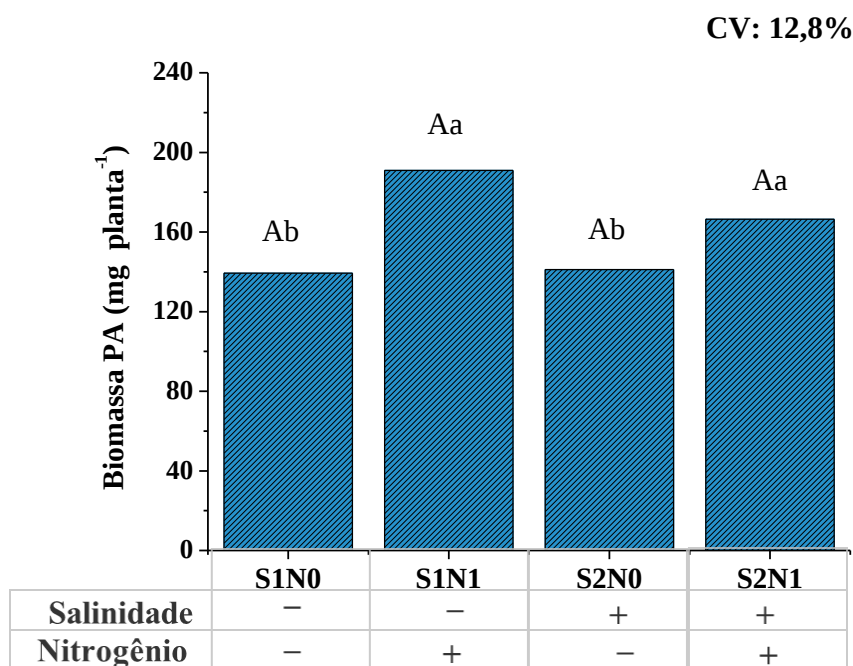


Figura 5.3 Biomassa das plantas de sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), cultivado 14 dias, sob sistema hidropônico, substrato areia, com variados níveis de nitrogênio e salinidade: Efeitos do nitrogênio e salinidade. Níveis de salinidade: S1= 0,8 mmol L⁻¹ e S2= 75 mmol L⁻¹ de NaCl. Níveis de nitrogênio: N0= 4 mmol L⁻¹; N1= 16 mmol L⁻¹. As médias (n=4) com letras maiúsculas distintas diferem quanto aos níveis de NaCl e as letras minúsculas distintas diferem quanto aos níveis de nitrogênio pelo teste de Tukey (p<0,05).

A partir do **Experimento II**, o nível de nitrogênio utilizado para todos os experimentos foi de 16 mmol L⁻¹. E para esse experimento foram realizados seis tratamentos com NaCl (8, 80, 120, 160, 200 e 240 mmol L⁻¹) e 4 repetições. Dos parâmetros avaliados no **Exp. II** apenas os dados de altura e massa seca da parte aérea (MSPA) atenderam aos critérios de normalidade dos dados e apresentaram variações significativas (**Tabela 5.1**).

Tabela 5.1 Altura e massa seca da parte aérea das plantas de sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), variedade Wray, cultivado 14 dias, sob sistema hidropônico com areia, com variados níveis de salinidade.

[NaCl]	Altura		MSPA	
mmol L ⁻¹	cm planta ⁻¹		mg planta ⁻¹	
8	18,4	a	20,3	a
80	18,7	a	17,2	b
120	17,5	a	14,5	b
160	11,9	b	8,5	c
200	6,6	c	5,1	d
%CV	14,23		13,2	

Médias (n=5) com letras distintas na coluna diferem pelo teste de Duncan ($p<0,05$). CV: coeficiente de variação. Massa seca da parte aérea (MSPA).

O crescimento das plantas de sorgo sacarino foi negativamente afetado pela salinidade, as alturas dos três tratamentos de menores concentrações de NaCl (8, 80 e 120 mmol L⁻¹) não diferiram entre si. No entanto, é possível observar reduções significativas na altura entre 8 e 160 mmol L⁻¹ de 35,3%, o tratamento de 200 mmol L⁻¹ se diferenciou de 160 mmol L⁻¹ com redução adicional de 44,5%. A massa seca da parte aérea foi mais sensível aos níveis de salinidade apresentando redução significativa já no tratamento de 80 mmol L⁻¹, com redução de 15,3% e reduções adicionais de 42,9% para 160 mmol L⁻¹ de NaCl e 16,7% em 200 mmol L⁻¹ de NaCl, comparando-se com o tratamento de 8 mmol L⁻¹.

O **Experimento III**, foi réplica do **II**, com uma repetição adicional por tratamento (totalizando 5 repetições/tratamento). Os valores dos parâmetros analisados (**Tabela 5.2**) que apresentaram efeitos significativos quanto a ANOVA e atenderam aos critérios de normalidade dos dados e homogeneidade dos tratamentos foram a altura, a razão entre a biomassa da parte aérea e biomassa da raiz (BPA/BR) e massa seca da parte aérea (MSPA).

Tabela 5.2 Desempenho das plantas de sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), variedade Wray, cultivado 11 dias, sob sistema hidropônico com areia, na dependência do nível de NaCl.

NaCl	Altura		BPA/BR		MSPA	
mmol L ⁻¹	cm planta ⁻¹		mg planta ⁻¹ / mg planta ⁻¹		mg planta ⁻¹	
8	21,2	a	1,97	a	24,70	a
80	17,0	b	2,18	a	14,10	b
120	15,3	c	2,15	a	12,30	b
160	11,3	d	1,84	ab	7,40	c
200	6,7	e	1,33	b	2,15	d
%CV	8,2		20,7		19,0	

Médias (n=5) com letras distintas na coluna diferem pelo teste de Duncan ($P<0,05$). CV: coeficiente de variação. Relação da biomassa da parte aérea com a da raiz (BPA/BR), massa seca da parte aérea (MSPA).

Houve uma diminuição na altura da planta com o aumento da salinidade, com diferenças significativas entre todos os tratamentos. A altura da planta em 80 mmol L⁻¹ já apresentou redução significativa da altura (19,7%) em relação ao tratamento de menor nível salino (8 mmol L⁻¹), 120 mmol L⁻¹ se diferenciou de 80 mmol L⁻¹ com redução adicional de 9,9%. As reduções adicionais entre os tratamentos de 160 e 120 mmol L⁻¹ e entre 200 e 160 mmol L⁻¹ foram 26,6 e 40,3%, respectivamente (**Fig. 5.4**). A relação biomassa da parte aérea e

biomassa da raiz no tratamento de 200 mmol L⁻¹ foi a única que teve variação significativa, com redução de 32,6% em relação ao tratamento controle (8 mmol L⁻¹). O impacto na MSPA foi ainda mais pronunciado com o aumento da salinidade, o nível de 80 mmol L⁻¹ apresentou redução de 42,9% em relação a 8 mmol L⁻¹, os tratamentos de 80 e 120 mmol L⁻¹ não apresentaram diferenças significativas entre si. Outro nível crítico que apresentou diferença significativa de MSPA foi o de 160 mmol L⁻¹ com redução de 47,5% em relação ao tratamento de 80 mmol L⁻¹, e o nível de 200 mmol L⁻¹ teve redução adicional de 71,0% em relação ao de 160 mmol L⁻¹.

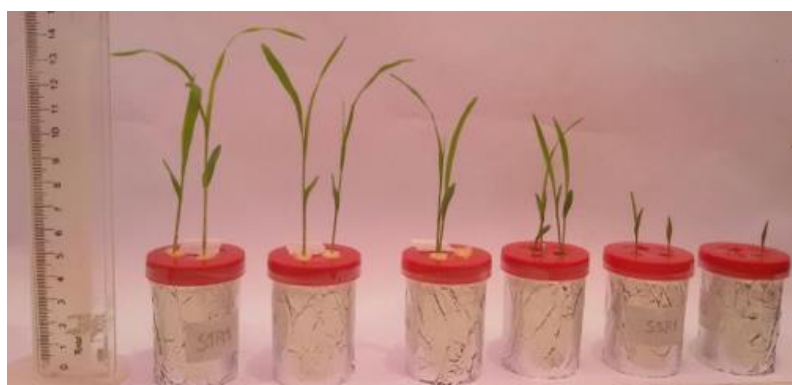


Figura 5.4 Teste de salinidade – Desenvolvimento do *Sorghum bicolor* (L.) Moench, variedade Wray, uma semana após a germinação em diferentes níveis de NaCl: 8, 80, 120, 160, 200 e 240 mmol L⁻¹ (da esquerda para direita), cultivado sob sistema hidropônico com areia em câmara de crescimento.

Assim como no **Experimento II**, no **Exp. III** o aumento do nível de salinidade aplicado ao sorgo sacarino afetou significativamente o desenvolvimento do vegetal, que para todos os parâmetros analisados apresentou valores que decresceram à medida que a concentração salina foi aumentada.

O **Experimento IV** foi realizado utilizando-se três menores níveis de NaCl (8, 80, 120 mmol L⁻¹) dos experimentos anteriores, foram retiradas as concentrações mais altas que limitavam o desenvolvimento de MSPA do sorgo sacarino em mais de 70%. Dos parâmetros avaliados no **Exp. IV** (**Tabela 5.3**), apenas as medidas de teor de clorofila não apresentaram efeitos significativos quanto à análise de variâncias. Os dados de biomassa da raiz não atenderam ao critério de homogeneidade das variâncias ($p > 0,05$ no teste de Barlett). A altura média das plantas apresentou diferenças significativas em todos os tratamentos, com redução de 16,5% para o tratamento de 80 em relação ao de 8, e redução adicional de 16,5% no tratamento de 120 em comparação ao de 80 mmol L⁻¹ de NaCl.

Tabela 5.3 Desempenho das plantas de sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), variedade Wray, cultivado 15 dias, sob sistema hidropônico com areia, na dependência do nível de NaCl.

[NaCl]	Altura	BPA	BR	MSPA
mmol L ⁻¹	cm planta ⁻¹	mg planta ⁻¹	mg planta ⁻¹	mg planta ⁻¹
8	23,03 a	138,53 a	34,58 a	8,80 a
80	19,23 b	97,33 b	36,65 a	4,89 b
120	16,06 c	70,66 b	15,27 b	3,58 b
CV (%)	10,85	19,87	44,36	16,52

Médias (n=5) com letras distintas na coluna diferem pelo teste de Duncan (p<0,05). CV: coeficiente de variação. Biomassa da parte aérea (BPA), biomassa da raiz (BR), massa seca da parte aérea (MSPA).

A biomassa da parte aérea teve redução significativa no tratamento de 80 mmol L⁻¹ com redução de 29,7% em relação ao controle e o nível de 120 mmol L⁻¹ não apresentou diferença significativa quanto ao tratamento de 80 mmol L⁻¹. A biomassa da raiz apresentou diferença significativa em comparação ao controle apenas no tratamento de 120 mmol L⁻¹ com redução de 55,8% em relação ao tratamento de 8 mmol L⁻¹. A MSPA seguiu a mesma tendência da BPA com diferença significativa em 80 mmol L⁻¹, redução de 44,4% em relação ao controle, e não apresentou diferença significativa (estatisticamente) entre os tratamentos de 80 e 120 mmol L⁻¹ de NaCl.

No geral, os resultados dos **Experimentos II, III e IV** foram consistentes entre si apresentando reduções nas alturas médias, biomassa e massa seca à medida que os níveis de salinidade aumentaram, com impacto significativo a partir do nível de NaCl de 80 mmol L⁻¹. Baseando-se nas variações observadas no **experimento IV**, no qual houve redução de 83% na altura e 70% na BPA para o tratamento de 80 mmol L⁻¹ de NaCl quando comparado ao tratamento controle (8 mmol L⁻¹ de NaCl), e reduções de 70% na altura e 51% na BPA quando comparados os tratamentos de 120 mmol L⁻¹ de NaCl em relação ao controle. Desse modo, definiu-se a concentração de 100 mmol L⁻¹ de NaCl, intermediária entre 80 e 120 mmol L⁻¹, para induzir estresse salino na cultivar de sorgo Wray.

5.4.2 Mudança de substrato: testes de adsorção/dessorção e padronização da perlita

Os experimentos realizados para montagem do modelo de cultivo do sorgo sob estresse salino foram realizados utilizando areia como substrato, no entanto, sabendo-se da alta adsorvidade das MnPs em silicatos (Pinto *et al.*, 2020), foram realizados testes de adsorção e lixiviação da MnTE-2-PyPCL₅ na areia utilizada nos experimentos e em um substrato alternativo, a perlita.

Dos testes de adsorção foi constatado que ambos os substratos a MnTE-2-PyPCL₅ apresentaram alta adsorção, a concentração do sobrenadante no sistema MnP/areia diminuiu de 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para 1,06 $\mu\text{mol L}^{-1}$, o correspondente à adsorção de 99,5% (0,035 μmol de MnP/g de areia). Já no sistema MnP/perlita a concentração do substrato diminuiu de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para 2,95 $\mu\text{mol L}^{-1}$, equivalente a adsorção de 97,1% da MnP na perlita (0,34 μmol de MnP/g de perlita). A adsorção da Mn-porfirina aos substratos é de natureza eletrostática, associada a presença de grupos hidroxilas na superfície dos materiais. No entanto, dos testes de lixiviação, após as lavagens com H₂O e solução aquosa de HCl 1 mol L⁻¹, a areia se mostrou relativamente estável à dessorção, com 90,0% de MnTE-2-PyPCL₅ ainda retida (0,035 μmol de MnP/g de areia). Já a perlita apresentou alta dessorção, apenas 3,7% da MnP permaneceu retida no material após as lavagens (0,013 μmol de MnP/g de perlita). As diferenças na dessorção (e na quantidade retida) da Mn-porfirina na areia e na perlita, evidenciaram que a interação do composto catiônico com a areia é mais forte do que com a perlita (Para conclusões mais assertivas quanto às diferenças de dessorção e retenção de MnP nos sistemas estudados são necessárias caracterizações adicionais quanto à carga e área superficial dos substratos empregados). Desse modo, para cultivo do sorgo para testes de efeito da MnP a perlita foi o substrato mais indicado, uma vez que a MnP estaria mais disponível para adsorção pela raiz da planta.

Para substituição do substrato, sem comprometimento das características físicas (textura ou proporções de tamanho de partículas) do suporte (suporte para fixação da raiz), primeiramente, a areia utilizada nos experimentos anteriores (**Exps. I-IV**) foi caracterizada por meio de seu peneiramento. A amostra de areia utilizada apresentou granulometria entre 0,031 a 2 milímetros, com predominância de areia fina (1,0 a 0,5 mm), média (0,5 a 0,25 mm) e grossa (0,25 a 0,125 mm), com 40, 40 e 17% (relação de massa) da amostra, respectivamente. Portanto, a padronização da perlita foi realizada utilizando-se a composição granulométrica de: 1,0 a 0,5 mm (40%), 0,5 a 0,25 mm (40%) e 0,25 a 0,125 mm (20%). Para tanto, a perlita comercial foi triturada manualmente, peneirada e as porções retidas nas peneiras com Mesh adequados foram misturadas na proporção supracitada.

5.4.3 Experimento de cultivo do sorgo sacarino: efeito da MnTE-2-PyPCL₅ no desenvolvimento do sorgo sacarino em condições normais e sob estresse salino

Com base nos resultados desses 4 experimentos, foi montado o modelo para cultivo do *Sorghum bicolor* (L.) Moench para avaliar os efeitos da MnTE-2-PyPCL₅ no

desenvolvimento do sorgo. Ficaram estabelecidos para concentração de nitrogênio ($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ (2:1)) o uso de 16 mmol L^{-1} e 8 mmol L^{-1} de NaCl como controle salino, para desenvolvimento do sorgo sacarino sob condições normais, e 100 mmol L^{-1} de NaCl, intermediária entre 80 e 120, como a concentração utilizada para o cultivo do sorgo sob estresse salino.

Dos parâmetros avaliados no **Exp. V**, apenas a altura, massa seca da raiz (MSR) e massa seca total (MST) (**Figs 5.5-5.6**) apresentaram efeitos significativos quanto a análise de variâncias (ANOVA).

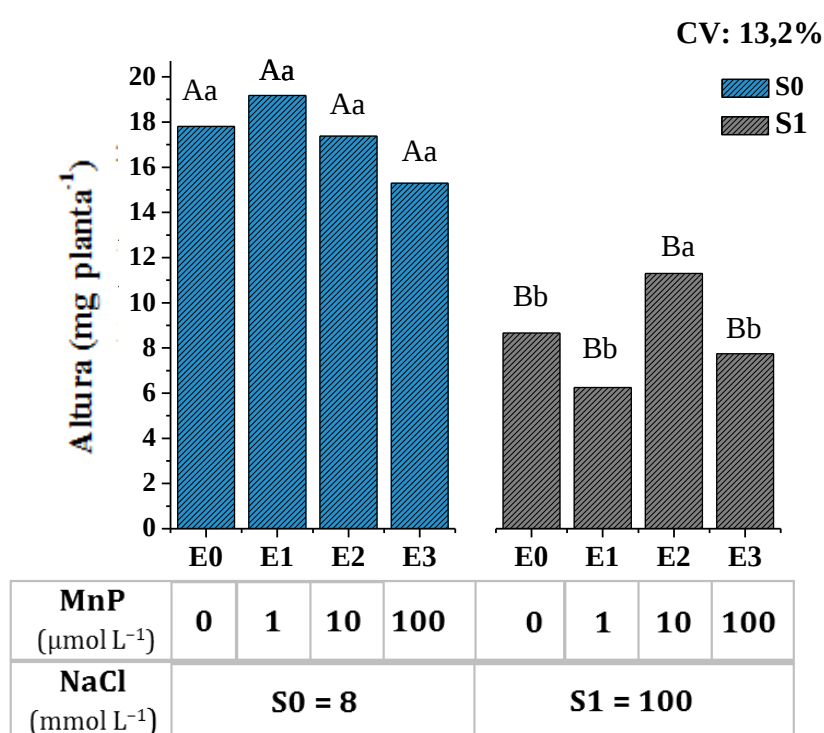


Figura 5.5 Altura das plantas de sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), cultivadas 16 dias, sob sistema hidropônico, substrato perlita, na dependência do nível de NaCl e MnTE-2-PyPCL₅: S0= 8 mmol L^{-1} e S1= 100 mmol L^{-1} de NaCl. Níveis de MnTE-2-PyPCL₅: E0= $0 \mu\text{mol L}^{-1}$; E1= $1 \mu\text{mol L}^{-1}$; E2= $10 \mu\text{mol L}^{-1}$; E3= $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. As médias (n=4) com letras maiúsculas distintas diferem quanto aos níveis de NaCl e as letras minúsculas distintas diferem quanto aos níveis de MnTE-2-PyPCL₅ pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

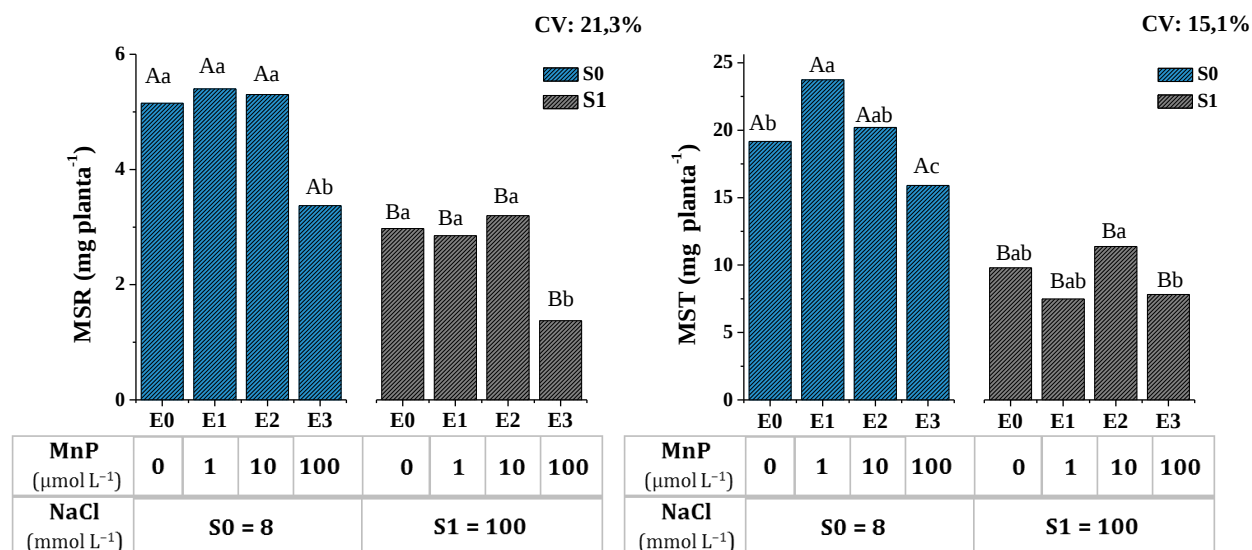


Figura 5.6 Produção de matéria seca das plantas de sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), cultivadas 16 dias, sob sistema hidropônico, substrato perlita, na dependência do nível de NaCl e MnTE-2-PyPCL₅: S0= 8 mmol L⁻¹ e S1= 100 mmol L⁻¹ de NaCl. Níveis de MnTE-2-PyPCL₅: E0= 0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; E1= 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$; E2= 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$; E3= 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. **A)** Massa seca da raiz (MSR); **B)** Massa Seca Total (MST). As médias (n=4) com letras maiúsculas distintas diferem quanto aos níveis de NaCl e as letras minúsculas distintas diferem quanto aos níveis de MnTE-2-PyPCL₅ pelo teste de Duncan (p<0,05).

As letras maiúsculas acima das colunas se referem as concentrações de NaCl, evidenciando as diferenças entre os dois tratamentos salinos e a imposição de estresse sob os tratamentos de maior salinidade (100 mmol L⁻¹), com reduções nas alturas (**Fig. 5.5**) e nas massas secas (**Fig. 5.6**). Comparando ambos tratamentos sem MnTE-2-PyPCL₅ observou-se que o tratamento com 100 mmol L⁻¹ de NaCl apresentou redução significativa de altura (-51,4%) em relação ao tratamento de menor salinidade 8 mmol L⁻¹, evidenciando a ocorrência de estresse salino mesmo com a mudança de substrato. Ainda comparando os tratamentos sem MnP, os impactos também foram significativos quanto a MSR e MST com redução de 42,2% e 50,2% do tratamento de maior concentração de sal, comparado ao de menor salinidade. Esses resultados evidenciaram o estresse salino gerado por essa concentração de NaCl nesse sistema.

Analisando as alturas das plantas dentro do grupo de menor salinidade não se observaram diferenças significativas entre os tratamentos. Quanto a massa seca da raiz dentro do grupo de controle de salinidade (8 mmol L⁻¹ de NaCl), o tratamento de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ MnP teve redução significativa de 34,5% em relação ao tratamento controle de MnP (0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MnTE-2-PyPCL₅). Ainda no grupo de baixa salinidade, o tratamento de 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MnP apresentou aumento significativo (+ 23,8%) quanto a MST em relação ao tratamento de sem MnTE-2-PyPCL₅, o tratamento de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ não se diferenciou do controle, nem do

tratamento de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MnTE-2-PyPCl₅. Já o tratamento de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MnTE-2-PyPCl₅ apresentou redução significativa quanto a MST do tratamento controle, com redução de 17,0%. Os resultados de massa seca evidenciaram que o nível de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MnTE-2-PyPCl₅ limitaram o desenvolvimento do sorgo sacarino, apontando para uma ligeira toxicidade dessa concentração de MnP nesse cultivar sob condições normais.

Quanto às plantas sob estresse salino (100 mmol L^{-1} de NaCl), a altura do tratamento com $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MnTE-2-PyPCl₅ apresentou diferença significativa pelo teste de Duncan (nível de confiança de 95%) dos demais tratamentos, com aumento de 30,3% da altura em relação ao tratamento controle, sem MnP. A massa seca da raiz apresentou comportamento similar ao observado em condições normais de salinidade, o único tratamento que teve diferença significativa em relação ao controle foi o de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MnTE-2-PyPCl₅ com redução de 53,8% na MSR. Para o parâmetro de massa seca total (MST), nenhum dos tratamentos se diferenciou do tratamento controle, porém o tratamento de 10 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MnTE-2-PyPCl₅ apresentaram diferenças significativas com redução de 31,3% do tratamento de mais alta [MnTE-2-PyPCl₅] em relação ao de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MnP. Esses resultados evidenciaram os efeitos positivos dose-dependente da porfirina sobre o crescimento de plantas de sorgo sacarino: **1)** $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MnTE-2-PyPCl₅ - efeito atenuador de estresse salino (altura e produção MST) e; **2)** 1 a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MnTE-2-PyPCl₅ - efeito promotor crescimento (MST) na condições sem estresses salino.

5.5 CONCLUSÕES

O sistema hidropônico com perlita para o cultivo de sorgo mostrou-se eficiente para o estudo do efeito da MnTE-2-PyPCL₅ em plantas de sorgo sacarino [(*Sorghum bicolor* (L.) Moench], variedade Wray. A MnP, nas concentrações de 1 a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, promoveu a produção de massa seca total (MST) das plantas do sorgo sacarino na ausência de estresse salino. A MnTE-2-PyPCL₅ a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ atenuou o efeito de estresse salino na altura e produção MST dessas plantas.

O efeito benéfico de diminuição do estresse salino nas plantas do sorgo sacarino, dá indícios de que a MnTE-2-PyPCL₅ está sendo absorvida pelas raízes e transportada para os caules e folhas das plantas onde pode exercer seu papel protetor. O potencial biotecnológico da MnTE-2-PyPCL₅ como atenuador do estresse salino foi observado no sorgo sacarino, o que justifica fortemente investimentos adicionais nesta linha de pesquisas aplicada ao setor agrícola.

CAPÍTULO 6: PERSPECTIVAS

Como perspectivas de continuidade do trabalho, sugerem-se os seguintes estudos:

- Consolidar a otimização quimiométrica da síntese da MnT-2-PyP⁺ por meio da realização dos experimentos IV e IX do planejamento de Doehlert (que não foram realizados na presente tese), bem como um novo modelo de regressão e identificação (ou confirmação) das condições sugeridas no presente estudo.
- Desenvolver, por meio de estudo quimiométricos, a síntese em meio aquoso para as *N*-piridilporfirinas isoméricas da MnT-2-PyP⁺: MnT-3-PyP⁺ e MnT-4-PyP⁺, além de se comparar as condições ótimas para obtenção entre os isômeros.
- Investigar a estabilidade das MnTalquil-2-PyP⁵⁺, preparadas pelo método clássico e pelo alternativo, frente à degradação em solução aquosa sob longo tempo de armazenamento. Em particular, observar se há correlação com alguma propriedade dessa série de porfirinas (tamanho da cadeia alquila ou potencial de redução, por exemplo).
- Estudar a reatividade das MnPs catiônicas em modelo glutathiona peroxidase/oxidase com temperatura controlada a 37°C (temperatura corporal humana normal).
- Investigar o mecanismo da oxidação de tióis catalisada pela MnTE-2-PyP⁵⁺ em modelo glutathiona peroxidase e glutathiona oxidase.
- Ampliar os estudos da MnTE-2-PyP⁵⁺ como tratamento coadjuvante a quimioterápicos (ascorbato ou outros) e radioterapia em outras linhagens de câncer.
- Ampliar os experimentos no modelo vegetal de sorgo sacarino sob estresse salino, avaliando, por exemplo: (i) outros níveis de MnTE-2-PyP⁵⁺ (0, 10, 50 e 100 µmol L⁻¹); (ii) os níveis celulares de enzimas antioxidantes importantes (superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase, por exemplo) e a acumulação MnTE-PyP⁵⁺ no sorgo sacarino, cultivado em condições de estresse salino, com 10 mmol L⁻¹ de MnP; (iii) o escalonamento do modelo, como maior tamanho do vaso de crescimento e tempo de cultivo mais longo (~45 dias, por exemplo); (iv) o comportamento de metaloporfirinas com diferentes características (pentacatiônicas de cadeia alquílica maior, aniônicas, com outros centros metálicos, etc.), na atenuação do estresse salino no modelo vegetal apresentado nessa tese.

- Testar os efeitos da MnTE-2-PyP⁵⁺ em outras plantas que apresentem ciclo de desenvolvimento mais curtos, como o intuito de verificar a influência da MnP em todos os estádios de desenvolvimento da planta.

REFÊRENCIAS

- Angelopoulos, P. M.; Maliachova, C.; Papakonstantinou, K.; Taxiarchou, M.; Diplas, S. Structural and physical characteristics of fine perlite expanded with a novel method in a vertical electric furnace, *Min. Proc. Ext. Met. (Trans. Inst. Min. Metall. C)*, 125(2):71-80, **2016**.
- Araújo-Chaves, J. C.; Yokomizo, C. H.; Kawai, C.; Mugnol, K. C. U.; Prieto, T.; Nascimento, O. R.; Nantes, I. L. Towards the mechanisms involved in the antioxidant action of Mn(III) [meso-tetrakis(4-N-methyl pyridinium)porphyrin] in mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.*, 43(6):663-671, **2011**.
- Ashcraft, K. A.; Boss, M.-K.; Tovmasyan, A.; Choudhury, K. R.; Fontanella, A. N.; Young, K. H.; Palmer, G. M.; Birer, S. R.; Landon, C. D.; Park, W.; Das, S. K.; Weitner, T.; Sheng, H.; Warner, D. S.; Brizel, D. M.; Spasojevic, I.; Batinić-Haberle, I.; Dewhirst, M. W. Novel manganese-porphyrin superoxide dismutase-mimetic widens the therapeutic margin in a preclinical head and neck cancer model. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 93(4):892-900, **2015**.
- Aston, K.; Rath, N.; Naik, A.; Slomczynska, U.; Schall, O. F.; Riley, D. P. Computer-aided design (CAD) of Mn(II) complexes: superoxide dismutase mimetics with catalytic activity exceeding the native enzyme. *Inorg. Chem.*, 40:1779-1789; **2001**.
- Barros Neto, B. Scarminio, I. S.; Bruns, R. E. Andando na superfície de resposta. Em: *Como fazer experimentos - pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*, Campinas, SP: Editora da Unicamp, **2001**. p. 251-300.
- Batinić-Harbele, I.; Benov, L.; Spasojević, I.; Fridovich, I. The ortho effect makes manganese (III) meso-tetrakis(N-methylpyridinium-2-yl)porphyrin (MnTM-2-PyP⁵⁺) a powerful and potentially useful superoxide dismutase mimic. *J. Biol. Chem.*, 273:24521-24528, **1998**.
- Batinić-Harbele, I.; Spasojević, I.; Hambright, P.; Benov, L.; Crumbliss, A.L.; Fridovich, I. The relationship between redox potentials, proton dissociation constants of pyrrolic nitrogen and in vivo and in vitro superoxide dismutase activities of manganese(III) and iron(III) cationic and anionic porphyrins. *Inorg. Chem.*, 38:4011-4022, **1999**.
- Batinić-Harbele, I.; Spasojević, I.; Stevens, R. D.; Hambright, P.; Fridovich, I. Manganese(III) meso-tetrakis(ortho-N-alkylpyridyl)porphyrins. Synthesis, characterization, and catalysis of O^{•-} dismutation. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 13:2689-2696, **2002**.
- Batinić-Haberle, I.; Spasojević, I.; Stevens, R. D.; Hambright, P.; Neta, P.; Okado- Matsumoto, A.; Fridovich, I. New class of potent catalysts of O₂^{•-} dismutation. Mn(III) ortho-methoxyethylpyridyl and di-ortho- methoxyethylimidazolylporphyrins. *Dalton Trans.*, 11:1696-1702, **2004**.
- Batinić-Haberle, I.; Rebouças, J. S.; Spasojević, I.; Superoxide Dismutase Mimics: Chemistry, Pharmacology and Therapeutic Potential. *Antioxid. Redox. Signal*, 13: 877-918, **2010**.
- Batinić-Haberle, I.; Rajic, Z.; Tovmasyan, A.; Rebouças, J. S.; Ye, X.; Leong, K. W.; Dewhirst, M. W.; Vujaskovic, Z.; Benov, L.; Spasojevic, I.; Diverse functions of cationic Mn(III) substituted. *Free Radic. Biol. Med.*, 51:1035-1053, **2011a**.
- Batinić-Haberle, I.; Rebouças, J. S.; Benov, L.; Spasójevic, I. Chemistry, biology and medical effects of water soluble metalloporphyrins. Em: *Handbook of Porphyrin Science* (eds Kadish, K. M.; Smith, K. M.; Guillard, R.), Singapore, World Scientific, vol. 11, **2011b**, p. 291-393.

- Batinić-Haberle, I.; Spasojević, I.; Tse, H. M.; Tovmasyan, A.; Rajic, Z.; St Clair, D. K.; Vujaskovic, Z.; Dewhirst, M. W.; Piganelli, J. D. Design of Mn porphyrins for treating oxidative stress injuries and their redox-based regulation of cellular transcriptional activities. *Amino Acids*, 42:95-113, **2012**.
- Batinić-Haberle, I.; Tovmasyan, A.; Roberts, E. R.; Vujasković, Z.; Leong, K. W.; Spasojević, I. SOD therapeutics: latest insights into their structure-activity relationships and impact on the cellular redox-based signaling pathways. *Antioxid. Redox. Signal.*, 20: 2372-2415, **2014**.
- Batinić-Haberle, I.; Tovmasyan, A.; Spasojević, I., An educational overview of the chemistry, biochemistry and therapeutic aspects of Mn porphyrins - from superoxide dismutation to H₂O₂-driven pathways. *Redox Biology*, 5:43-65, **2015**.
- Batinić-Haberle, I.; Tovmasyan, A.; Spasojević, I. Mn porphyrin-based redox-active therapeutics. Em: *Redox-Active Therapeutics, Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice* (eds Batinić-Haberle, I.; Rebouças, J. S.; Spasojević, I.), Springer International Publishing, **2016a**, p. 165-212.
- Batinić-Haberle, I.; Tovmasyan, A., Superoxide dismutase mimics and other redox-active therapeutics. Em: *Oxidative Stress and Antioxidant Protection: The Science of Free Radical Biology and Disease* (eds D. Armstrong e R. D. Stratton), Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, **2016b**, p. 415-469.
- Batinić-Haberle, I.; Tovmasyan, A.; Spasojević, I. Mn porphyrin-based redox-active drugs: differential effects as cancer therapeutics and protectors of normal tissue against oxidative injury. *Antioxid. Redox Signal.*, 29:1691-1724, **2018**.
- Batinić-Haberle, I.; Tome, M. E. Thiol regulation by Mn porphyrins, commonly known as SOD mimics, *Redox Biology* 25: 101139, **2019**.
- Bensalah, W.; Feki, M.; Wery, M.; Ayedi, H.F. Thick and dense anodic oxide layers formed on aluminum in sulphuric acid bath. *J. Mater. Sci. Technol.*, 26(2):113-118, **2010**.
- 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.*, 25:662-671, **1980**.
- Bezerra, M. A.; Santelli, R. E.; Oliveira, E. P.; Villar, L. S. Escaleira, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76:965-977, **2008**.
- Borgstahl, G. E. O.; Oberley-Deegan, R. E. Superoxide Dismutases (SODs) and SOD Mimetics. *Antioxidants*, 7(11):156, **2018**.
- Bottino, R.; Balamurugan, A. N.; Bertera, S.; Pietropaolo, M.; Trucco, M.; Piganelli, J. D. Preservation of human islet cell functional mass by anti-oxidative action of a novel SOD mimic compound. *Diabetes*, 51(8):2561-2567, **2002**.
- Boucher, L. I. Manganese Porphyrin Complexes. *Coord. Chem. Rev.*, 7:289-329, **1972**.
- Brown, S. D.; Blank, B. B.; Sum, S. T.; Weyer, L. G. Chemometrics, *Anal. Chem.*, 66:315R-359R, **1994**.
- Buchler, J. W. Synthesis and Properties of Metalloporphyrins. Em: *The Porphyrins: Structure and Synthesis* (Ed. DOLPHIN, D.), Vol. 1, New York: Academic Press, **1978**, p. 390-483.
- Buckberry, L. D.; Teesdale-Spittle, P. H. Sulfur-hydrogen compounds. Em: *Biological*

- Interactions of Sulfur Compounds* (ed. Mitchell, S.), London: Taylor & Francis Ltd, **1996**, p. 113-144.
- Bueno-Janice, J. C.; Tovmasyan, A.; Batinić-Haberle, I. Comprehensive study of GPx activity of different classes of redox-active therapeutics—implications for their therapeutic actions. *Free Radic. Biol. Med.*, 87: S86-S87, **2015**.
- Carlberg, I., Mannervik, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 250:5475-5480, **1975**
- Carrijo, O. A.; Makishima, N. *Princípios de Hidroponia* (Eds Carrijo, O. A.; Makishima, N.), Brasília: Embrapa-Hortaliças, **2000**, 27p (circular técnica 22).
- Celic, T.; Španjol, J.; Bobinac, M.; Tovmasyan, A.; Vukelic, I.; Rebouças, J. S.; Batinić-Haberle, I.; Bobinac, D. Mn porphyrin-based SOD mimic, MnTnHex-2-PyP5+, and non-SOD mimic, MnTBAP³⁻, suppressed rat spinal cord ischemia/reperfusion injury via NF-κB pathways, *Free Radic. Res.*, 48(12):1426-1442, **2014**.
- Chatterjee, A.; Zhu, Y.; Tong, Q.; Kosmacek, E. A.; Lichter, E. Z.; Oberley-Deegan, R. E. The Addition of Manganese Porphyrins during Radiation Inhibits Prostate Cancer Growth and Simultaneously Protects Normal Prostate Tissue from Radiation Damage. *Antioxidants*, 7(1): 21, **2018**.
- Choi, E. I.; Fleischer, E. B. Kinetics of the reaction of some divalent transition metal ions with α, β, γ, δ-Tetra-(4-pyridyl)-porphine *Inorg. Chem.* 2(1):94-97, **1963**.
- Corkan, L. A.; Plouvier, J.-C.; Lindsey, J. S. Application of an automated chemistry workstation to problems in synthetic chemistry. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 17(1):95-105, **1992**.
- Doctrow, S. R.; Fish, B.; Huffman, K. D.; Lazarova, Z.; Medhora, M.; Williams, J. P.; Moulder, J. E. Salen manganese complexes mitigate radiation injury in normal tissues through modulation of tissue environment, including through redox mechanisms. Em: *Redox-Active Therapeutics, Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice* (eds Batinić-Haberle, I.; Rebouças, J. S.; Spasojević, I.) Springer International Publishing, **2016**, p. 266-285.
- du Toit A. G. A.; Labuschagne, M. T. A comparison between hydroponics systems and pots for growing wheat in the greenhouse, *S. Afr. J. Plant Soil*, 24(2):120-123, **2007**.
- Evans, M. K.; Tovmasyan, A.; Batinić-Haberle, I.; Devi, G. R. Mn porphyrin in combination with ascorbate acts as a pro-oxidant and mediates caspase-independent cancer cell death. *Free Radic. Biol. Med.*, 68:302-314, **2014**.
- Falcão, N. K. S. M. **Catálise biomimética à base de Mn(III)-porfirinas: hidroxilação de alceno por sistemas suportados em sílica e estudos exploratórios da oxidação do contaminante emergente triclosan**. 146f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (PB), **2016**.
- Faulkner, K. M.; Liochev, S. I.; Fridovich, I. Stable Mn(III) porphyrins mimic superoxide dismutase in vitro and substitute for it in vivo. *J. Biol. Chem.*, 269(38): 23471-23476, **1994**.
- Ferreira, S. L. C.; dos Santos, W. N. L.; Quintella, C. M.; Neto, B. B.; Bosque-Sendra, J. M. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry-review. *Talanta*, 63:1061-1067, **2004**.

- Ferreira, S.L.C.; Bruns, R.E.; Ferreira, H.S.; Matos, G.D.; David, J.M.; Brandão, G.C.; Silva, E.G.P.; Portugal, L.A.; Reis, P.S.; Souza, A.S.; Santos, W.N.L. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods, *Anal. Chim. Acta*, 597(2):179-186, **2007**.
- Ferrer-Sueta, G.; Batinić-Haberle, I.; Spasojević, I.; Fridovich, I.; Radi, R. Catalytic scavenging of peroxynitrite by isomeric Mn(III) *N*-methylpyridylporphyrins in the presence of reductants. *Chem. Res. Toxicol.*, 12:442-449, **1999**.
- Ferrer-Sueta, G.; Vitturi, D.; Batinić-Haberle, I.; Fridovich, I.; Goldstein, S.; Czapski, G.; Radi, R. Reactions of manganese porphyrins with peroxynitrite and carbonate radical anion. *J. Biol. Chem.*, 278: 27432-27438, **2003**.
- Fleischer, E. B.; Choi, E. I.; Hambright, P.; Stone, A. Porphyrin studies: kinetics of metalloporphyrin formation. *Inorg. Chem.*, 3(9): 1284-1287, **1964**.
- Flohé, L.; Toppo, S.; Cozza, G.; Ursini, F. A comparison of thiol peroxidase mechanisms. *Antioxid Redox Signal.*, 15(3):763-780, **2011**.
- Flohé, L. The impact of thiol peroxidases on redox regulation. *Free Radic. Res.*, 50(2): 126-142, **2015**.
- Fonseca, M. G. D.; Oliveira, M. M.; Arakaki, L. N. H.; Espinola, J. G. P.; Airoidi, C. Natural vermiculite as an exchanger support for heavy cations in aqueous solution. *J. Colloid Interface Sci.*, 285:50-55, **2005**.
- França, M. B.; Panek, A. D.; Eleutherio, E. C. A. Oxidative stress and its effects during dehydration *Comp. Biochem. Physiol. A, Mol Integrative Physiol.* 146, 621; **2007**.
- Gad, S. C.; Sullivan, D. W. Jr.; Crapo, J. D.; Spainhour, C. B. A nonclinical safety assessment of MnTE-2-PyP, a manganese porphyrin. *Int. J. Toxicol.*, 32:274-287, **2013**.
- Gad, S. C.; Sullivan, D. W. Jr.; Spasojević, I.; Mujer, C. V.; Spainhour, C.B.; Crapo, J. D. Nonclinical Safety and Toxicokinetics of MnTnBuOE-2-PyP5+ (BMX-001). *Int J Toxicol* 35: 438-453, **2016**.
- Gemperline, P. Introduction to chemometrics. Em: *Practical guide to chemometrics* (ed. Gemperline, P.), 2 ed., Boca Raton, FL, USA: Taylor and Francis. **2006**, p. 1-6.
- Guina, T.; Biasi, F.; Calfapietra, S.; Nano, M.; Poli, G. Inflammatory and redox reactions in colorectal carcinogenesis. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1340:95-103, **2015**.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C.; *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4 ed., Clarendon Press, Oxford, **2007**.
- Hambright, P. Acid assisted dechelation of Manganese(II)-Tetra(3-N-methylpyridyl)porphine, *Inorg. Nucl. Chem. Letters*, 13:403-405, **1977**.
- Hartmann, M.; Robert, A.; Duarte, V.; Keppler, K. B.; Meunier, B. Synthesis of water-soluble ruthenium porphyrins as DNA cleavers and potential cytotoxic agents. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2, 427-432, **1997**.
- Hefny, M.; Abdel-Kader, D. Z.; Antioxidant-Enzyme System as Selection Criteria for Salt Tolerance in Forage Sorghum Genotypes (*Sorghum bicolor* L. Moench). In: *Salinity and Water Stress. Tasks for Vegetation Sciences* (eds Ashraf, M.; Ozturk, M.; Athar, H.), Springer, **2009**. p. 25-36.

- Hsieh, T. C.; Elangovan, S.; Wu, J. M. Differential suppression of proliferation in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells exposed to alpha-, gamma- and delta-tocotrienols is accompanied by altered expression of oxidative stress modulatory enzymes. *Anticancer Res.* 30:4169-4176; **2010**.
- Hussain, A.; Iqbal, K.; Aziem, S.; Mahato, P.; Negi, A. K. A review on the science of growing crops without soil (soilless culture) - a novel alternative for growing crops, *Intl J Agri Crop Sci.*, 7(11):833-842, **2014**.
- Jaramillo, M. C.; Briehl, M. M.; Crapo, J. D.; Batinić-Haberle, I.; Tome, M. E. Manganese porphyrin, MnTE-2-PyP5+, Acts as a pro-oxidant to potentiate glucocorticoid-induced apoptosis in lymphoma cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 52:1272-1284, **2012**.
- Jaramillo, M. C.; Briehl, M. M.; Batinić-Haberle, I.; Tome, M. E. Manganese (III) meso-tetrakis N-ethylpyridinium-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.*, 83:89-100, **2015**.
- Johnstone, R. A. W.; Nunes, M. L. P. G.; Pereira, M. M.; Rocha Gonsalves, A. M. D. R.; Serra, A. Improved syntheses of 5,10,15,20-Tetrakisaryl- and Tetrakisalkylporphyrins. *Heterocycles*, 43(7):1423-1437, **1996**.
- Kachadourian, R.; Menzeleev, R.; Agha, B.; Bocckino, S. B.; Day, B. J. High-performance liquid chromatography with spectrophotometric and electrochemical detection of a series of manganese(III) cationic porphyrins. *J. Chromatography B*, 767: 61-67, **2002**.
- Kocabay, O; Emregul, E.; Aydin, S. S.; Aras, S. Detection of superoxide radicals in tomato plants exposed to salinity, drought, cold and heavy metal stress using CMC-G-SOD biosensor. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, 41:352-358, **2013**.
- Kohen, R.; Abraham, N. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.*, 30(6):620-650. **2002**.
- Kos, I.; Rebouças, J. S.; DeFreitas-Silva, G.; Salvemini, D.; Vujasković, Z.; Dewhirst, M. W.; Spasojević, I.; Batinić-Haberle, I. Lipophilicity of potent porphyrin-based antioxidants: Comparison of *ortho* and *meta* isomers of Mn(III) N-alkylpyridylporphyrins. *Free Radic. Biol. Med.*, 47:72-78, **2009a**.
- Kos, I.; Benov, L.; Spasojević, I.; Rebouças, J.S.; Batinić-Harbele I. High lipophilicity of meta Mn(III) N-alkylpyridylporphyrin-based superoxide dismutase (SOD) mimics compensates for their lower antioxidant potency and makes them equally effective as *ortho* analogues in protecting SOD-deficient *E. coli*. *J. Med. Chem.*, 52:7868-7872, **2009b**.
- Kosmacek, E. A.; Chatterjee, A.; Tong, Q.; Lin, C.; Oberley-Deegan, R. E. MnTnBuOE-2-PyP protects normal colorectal fibroblasts from radiation damage and simultaneously enhances radio/chemotherapeutic killing of colorectal cancer cells. *Oncotarget.*, 7(23):34532-34545, **2016**.
- Leu, D.; Spasojević, I.; Nguyen, H.; Deng, B.; Tovmasyan, A.; Weitner, T.; Sampaio, R. S.; Batinić-Haberle, I.; Huang, T. T. CNS bioavailability and radiation protection of normal hippocampal neurogenesis by a lipophilic Mn porphyrinbased superoxide dismutase mimic, MnTnBuOE-2-PyP5. *Redox Biol.*, 12:864-871, **2017**.

- Levrard, S.; Vannay-Bouchiche, C.; Pesse, B.; Pacher, P.; Feihl, F.; Waeber, B.; Liaudet, L. Peroxynitrite is a major trigger of cardiomyocyte apoptosis in vitro and in vivo. *Free Radic. Biol. Med.*, 41(6):886-895, **2006**.
- Li, L.; Tovmasyan, A.; Sheng, H.; Xu, B.; Sampaio, R.S.; Reboucas, J.S.; Warner, D.S.; Batinic-Haberle, I.; Spasojevic, I. Fe Porphyrin-based SOD mimic and redox-active compound, (OH)FeTnHex-2-PyP⁴⁺, in a rodent ischemic stroke (MCAO) model: efficacy and pharmacokinetics as compared to its Mn analogue, (H₂O)MnTnHex-2-PyP⁵⁺. *Antioxidants*, 9, 467, **2020**.
- Maia, C. G. C. **Otimização da síntese da meso-tetraquis(2-piridil)porfirina e estudos de Mn e Fe-porfirinas como modelos biomiméticos da enzima catalase**. 123f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (PB), **2015**.
- Makishima, N.; Carrijo, O. A. Conjunto Hidropônico. Em: *Princípios de Hidroponia* (Eds Carrijo, O. A.; Makishima, N.), Brasília: Embrapa-Hortaliças, **2000**, 27p (circular técnica 22).
- Manda, G.; Isvoranu, G.; Comanescu, M. V.; Manea, A.; Debele Butuner, B.; Korkmaz, K. S. The redox biology network in cancer pathophysiology and therapeutics. *Redox Biol.*, 5:347-357, **2015**.
- Mapuskar, K. A.; Anderson, C. M.; Spitz, D. R.; Batinic-Haberle, I.; Allen, B. G.; Oberley-Deegan, R. E. Utilizing superoxide dismutase mimetics to enhance radiation therapy response while protecting normal tissues. *Semin. Radiat. Oncol.*, (29):72-80, **2019**.
- Meister, A.; Anderson, M. E. Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.*, 52:711-760, **1983**.
- Meng, X.; Wang, M.; Jiang, N.; Zhang, D.; Wang, L.; Liu, C. regulation of both the reactive oxygen species level and antioxidant enzyme activity in drought-stressed rice organs by benzimidazole-based SOD1 mimics. *J. Agric. Food Chem.*, 60(45):11211-11221, **2012**.
- Meunier, B. Metalloporphyrins as versatile catalysts for oxidation reactions and oxidative DNA cleavage. *Chem. Rev.*, 92:1411-1456, **1992**.
- Miar, A.; Hevia, D.; Munoz-Cimadevilla, H.; Astudillo, A.; Velasco, J.; Sainz, R. M.; Mayo, J. C. Manganese superoxide dismutase (SOD2/MnSOD)/catalase and SOD2/GPx1 ratios as biomarkers for tumor progression and metastasis in prostate, colon, and lung cancer. *Free Radic. Biol. Med.*, 85:45-55, **2015**.
- Milgrom, L. R. *The Colours of Life: Na introduction to the chemistry of porphyrins and related compounds*. Oxford: Oxford University Press, 249, **1997**.
- Miriyala, S.; Spasojević, I.; Tovmasyan, A.; Salvemini, D.; Vujaskovic, Z.; St Clair, D.; Batinić-Haberle, I.; Manganese superoxide dismutase, MnSOD and its mimics. *Biochim. Biophys. Acta* 1822:794-814, **2012**.
- Mirzahosseini, A.; Noszál, B. Species-Specific Standard Redox Potential of Thiol-Disulfide Systems: A Key Parameter to Develop Agents against Oxidative Stress. *Sci. Rep.* 6:37596, **2016**.
- Montgomery, D. C. *Design and analysis of experiments*, 5 ed., John Wiley & Sons, Inc., **2001**.
- Moore, T.; Le, A.; Niemi, A. K.; Kwan, T.; Cusmano-Ozog, K.; Enns, G. M.; Cowan, T. M. A new LC-MS/MS method for the clinical determination of reduced and oxidized glutathione from whole blood. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 929: 51-55, **2013**.
- Mugesh, G.; du Mont, W.-W., Sies, H., Chemistry of biologically important synthetic

- organoselenium compounds. *Chem. Rev.*, 101:2125-2179, **2001**.
- Munns, R. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.*, 25:239-250, **2002**.
- Nascimento, E.; Silva, G. D. F.; Caetano, F. A.; Fernandes, M. A.; da Silva, D. C.; de Carvalho, M. E. M.; Pernaut, J. M.; Rebouças, J. S.; Idemori, Y. M. Partially and fully β -brominated Mn-porphyrins in P450 biomimetic systems: effects of the degree of bromination on electrochemical and catalytic properties. *J. Inorg. Biochem.*, 99(5):1193-1204; **2005**.
- Nascimento, M. M. A.; Nascimento, C. V. C.; Figueiredo, M. V. B.; Tabosa, J. N.; Martínez, C. R. Seleção de variedades sacarinas de sorgum bicolor tolerantes à salinidade. *XXIX Congresso nacional de milho e sorgo*, resumo expandido: 218-225, **2012**.
- Pang, C. H.; Wang, B. S. Oxidative stress and salt tolerance in plants. Em: *Progress in Botany* (Eds Lüttge, U.; Beyschlag, W.; Murata, J.), vol 69. Berlin: Springer, **2008**.
- Osakabe, Y.; Osakabe, K.; Shinozaki, K. Plant environmental stress responses for survival and biomass enhancement. Em: *Climate Change and Plant Abiotic Stress Tolerance* (eds Tuteja, N.; Gill, S. S.), Wiley-VCH, **2013**, p. 81-108.
- Parida, A. K.; Das, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotox. Environ. Safe.*, 60:324-349, **2005**.
- Peixoto, I. N. **Otimização experimental e estudos da distorção não-planar de N-piridilporfirinas precursoras de moduladores redox de estresse oxidativo**. 125f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (PB), **2012**.
- Pessarakli, M.; Szabolcs, I. Soil salinity and sodicity as particular plant/crop stress factors. Em: *Handbook of Plant and Crop Stress*, (ed Mohammad Pessarakli), 3ª ed., New yorker, USA: CRC Press, **2010**.
- Pinto, V. H. A. **Mn(III)-porfirinas como catalisadores biomiméticos: Estabilidade térmica e imobilização em vermiculita e sílica gel funcionalizada para hidroxilação de alcanos**. 196f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (PB), **2013**.
- Pinto, V. H. A.; Falcão, N. K. S. M.; Bueno-Janice, J. C.; Spasojević, I.; Batinić-Haberle, I.; Rebouças, J. S. Cytochrome P450-Like Biomimetic Oxidation Catalysts Based. Em: *Redox-Active Therapeutics, Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice* (eds Batinić-Haberle, I.; Rebouças, J. S.; Spasojević, I.) Springer International Publishing, **2016**, p. 213-243.
- Pinto, V. H. A.; Falcão, N. K. S. M.; Mariz-Silva, B.; Fonseca, M. G.; Rebouças, J. S. Robust Mn(III) N-pyridylporphyrin-based biomimetic catalysts for hydrocarbon oxidations: heterogenization on non-functionalized silica gel versus chloropropyl-functionalized silica gel. *Dalton Trans.*, **2020**, doi:10.1039/D0DT01383H
- Pitman, M.G. and Lauchli, A. Global impact of salinity and agricultural ecosystems. Em: *Salinity: Environment-Plants Molecules* (Eds Lauchli, A.; Luttge, V.), Dordrecht: Springer, **2002**, p. 3-20.

- Poole, L. B. The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. *Free Rad. Biol. Med.*, 80:148-157, **2015**.
- Rajić, Z.; Tovmasyan, A.; Spasojevic, I.; Sheng, H.; Lu, M.; Li, A.M.; Gralla, E.B.; Warner, D.S.; Benov, L.; Batinić-Harbele, I. A new SOD mimic, Mn(III) ortho *N*-butoxyethylpyridylporphyrin, combines superb potency and lipophilicity with low toxicity. *Free Radic. Biol. Med.*, 52:1828-1834, **2012**.
- Rajić, Z.; Tovmasyan, A.; Santana, O. L.; Peixoto, I. N.; Spasojevic, I.; Monte, S. A.; Ventura, E.; Rebouças, J. S.; Batinić-Harbele, I. Challenges encountered during development of Mn porphyrin-based, potent redox-active drug and superoxide dismutase mimic, MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺, and its alkoxyalkyl analogues. *J. Inorg. Biochem.*, 169:50-60, **2017**.
- Rawal, M.; Schroeder, S. R.; Wagner, B. A.; Cushing, C. M.; Welsh, J. L.; Button, A. M.; Du, J.; Sibenaller, Z. A.; Buettner, G. R.; Cullen, J. J. Manganoporphyrins increase ascorbate-induced cytotoxicity by enhancing H₂O₂ generation. *Cancer Res.*, 73(16):5232-5241, **2013**.
- Rebouças, J. S. **Porfirinas de Zn e Mn de Primeira, Segunda e Terceira Gerações: I. Síntese; II. Equilíbrios de Coordenação Axial e Agregação Edge-over-Edge**. 114f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG), **1999**.
- Rebouças, J. S.; Carvalho, M. E. M. D.; Idemori, Y. M. Perhalogenated 2-pyridylporphyrin complexes: synthesis, self-coordinating aggregation properties, and catalytic studies. *J. Porphyr. Phthalocya.*, 6:50-57, **2002**.
- Rebouças, J. S.; DeFreitas-Silva, G.; Idemori, Y. M.; Spasojević, I.; Benov, L.; Batinić-Haberle, I. The impact of electrostatics in redox modulation of oxidative stress by Mn porphyrins: Protection of SOD-deficient *Escherichia coli* via alternative mechanism where Mn porphyrin acts as a Mn-carrier. *Free Rad. Biol. Med.*, 45:201-210, **2008a**.
- Rebouças, J. S.; Spasojević, I.; Tjahjono, D. H.; Richaud, A.; Mendez, F.; Benov, L.; Batinić-Haberle, I. Redox modulation of oxidative stress by Mn porphyrin-based therapeutics: The effect of charge distribution. *Dalton Trans.*, 7(9):1233-1242, **2008b**.
- Rebouças, J. S.; Cheu, E. L. S.; Ware, C. J.; James, B. R.; & Skov, K. A. Synthetic and mechanistic aspects of a new method for ruthenium-metalation of porphyrins and Schiff-Bases. *Inorg. Chem.*, 47(17):7894-7907, **2008c**.
- Ribas, P.M. Importância econômica Em: *Embrapa Milho e Sorgo - Sistemas de Produção*, 2 Versão Eletrônica - 4^a ed. **2008**.
- Rover Júnior, L.; Höehr, N. F.; Vellasco, A. P.; Kubota, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quím. Nova*, 24(1):112-119, **2001**.
- Sardare, M. D.; Admane, S. V. Review on plant without soil - hydroponics. *Int. J. Res. Eng. Technol.*, 2(3):299-304, **2013**.
- Sekmen, A.H.; Bor, M.; Ozdemir, F.; Turkan, I. Current concepts about salinity and salinity tolerance in plants. Em: *Climate Change and Plant Abiotic Stress Tolerance* (eds Tuteja, N.; Gill, S. S.), Wiley-VCH, **2013**, p. 163-188.
- Sheng, H.; Spasojević, I.; Tse, H. M.; Jung, J. Y.; Hong, J.; Zhang, Z.; Piganelli, J. D.; Batinić-Haberle, I.; Warner, D. S. Neuroprotective efficacy from a lipophilic redox-modulating Mn(III)

- N-Hexylpyridylporphyrin, MnTnHex-2-PyP: Rodent models of ischemic stroke and subarachnoid hemorrhage. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 338:906-916, **2011**.
- Sheng, Y.; Abreu, I. A.; Cabelli, D. E.; Maroney, M. J.; Miller, A.-F.; Teixeira, M.; Valentine, J. S. Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases. *Chem. Rev.*, 114:3854-3918, **2014**.
- Shin S. W.; Choi, C.; Lee, G.-H.; Son, A.; Kim, S.-H.; Park, H. C.; Batinić-Haberle, I.; Park, W. Mechanism of the antitumor and radiosensitizing effects of a manganese porphyrin, MnHex-2-PyP. *Antioxid. Redox Signal.*, 27:1067-1082, **2017**.
- Sies, H.; Masumoto, H. Ebselen as a glutathione peroxidase mimic and as a scavenger of peroxynitrite. *Adv. in Pharmacol.*, 38:229-246, **1996**.
- Silva Filho, S. H.; Vinaches, P.; Pergher, S. B. C, Caracterização estrutural da perlita expandida. *Perspectiva*, 41(155):81-87, **2017**.
- Sobhanian, H.; Aghaei, K.; Komatsu, S. Changes in the plant proteome resulting from salt stress: Toward the creation of salt-tolerant crops? *J. Proteomics*, 74:1323-1337, **2011**.
- Sofo, A.; Scopa, A.; Nuzzaci, M.; Vitti, A. Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. *Int. J. Mol. Sci.*, (16):13561-13578, **2015**.
- Spasojević, I.; Batinić-Haberle, I.; Fridovich, I. Nitrosylation of manganese(II) tetrakis(*N*-ethylpyridinium-2-yl)porphyrin: a simple and sensitive spectrophotometric assay for nitric oxide. *Nitric Oxide*, 4(5):526-533, **2000**.
- Spasojević, I.; Batinić-Haberle, I.; Stevens, R. D.; Hambright, P.; Thorpe, A. N.; Grodkowski, J.; Neta, P.; Fridovich, I. Manganese(III) biliverdin IX dimethylester: a powerful catalytic scavenger of superoxide employing the Mn(III)/Mn(IV) redox couple. *Inorg. Chem.*, 40:726-739, **2001**.
- Spasojević, I.; Batinić-Haberle, I.; Rebouças, J. S.; Idemori, Y. M.; Fridovich, I. Electrostatic contribution in the catalysis of $O_2^{\cdot -}$ dismutation by superoxide dismutase mimics. Mn^{III}TE-2-PyP⁵⁺ versus Mn^{III}Br₈T-2-PyP⁺. *J. Biol. Chem.*, 278(9):6831-6837, **2003**.
- Spasojević, I.; Chen, Y.; Noel, T. J.; Yu, Y.; Cole, M. P.; Zhang, L.; Zhao, Y.; St Clair, D. K.; Batinić-Haberle, I. Mn porphyrin-based superoxide dismutase (SOD) mimic, MnIIITE-2-PyP⁵⁺, targets mouse heart mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.*, 42:1193-200, **2007**.
- Spasojević, I.; Chen, Y.; Noel, T. J.; Fan, P.; Zhang, L.; Rebouças, J. S.; St. Clair, D. K.; Batinić-Haberle, I. Pharmacokinetics of the potent redox-modulating manganese porphyrin, MnTE-2-PyP(5+), in plasma and major organs of B6C3F1 mice. *Free Radic. Biol. Med.*, 45:943-949, **2008**.
- Spasojević, I.; Kos, I.; Benov, L. T.; Rajic, Z.; Fels, D.; Dedeugd, C.; Ye, X.; Vujaskovic, Z.; Rebouças, J. S.; Leong, K. W.; Dewhirst, M. W.; Batinić-Haberle, I. Bioavailability of metalloporphyrin-based SOD mimics is greatly influenced by a single charge residing on a Mn site. *Free Radic Res* 45:188-200, **2011**.
- Steel, G. G. Growth kinetics of tumors. Clarendon Press, Oxford, **1977**.
- Stoyanov, K. S.; Walmsley, A. D. Response surface modelling and experimental designs. Em: *Practical guide to chemometrics* (ed. Gemperline, P.), 2 ed., Boca Raton, FL, USA: Taylor and Francis. **2006**, p. 263-338.

- Tse, H. M.; Milton, M. J.; Piganelli, J. D. Mechanistic analysis of the immunomodulatory effects of a catalytic antioxidant on antigen-presenting cells: implication for their use in targeting oxidation-reduction reactions in innate immunity. *Free Radic. Biol. Med.* 36:233-247, **2004**.
- Tong, Q.; Zhu, Y.; Galaske, J.W.; Kosmacek, E. A.; Chatterjee, A.; Dickinson, B. C.; Oberley-Deegan, R. E. MnTE-2-PyP modulates thiol oxidation in a hydrogen peroxidemediated manner in a human prostate cancer cell. *Free Radic. Biol. Med.*, 101:32-43, **2016**.
- Tovmasyan, A.; Weitner, T.; Roberts, E.; Jaramillo, M.; Spasojević, I.; Leong, K.; Tome, M.; Benov, L.; Batinić-Haberle, I. Understanding differences in mechanisms of action of Fe vs Mn Porphyrins: Comparison of their reactivities towards cellular reductants and reactive species. *Free Radic. Biol. Med.*, 53:S120, **2012**.
- Tovmasyan, A.; Weitner, T.; Sheng, H.; Lu, M.; Rajić, Z.; Warner, D. S.; Spasojević, I.; Rebouças, J. S.; Benov, L.; Batinić-Haberle, I. Differential coordination demands in Fe versus Mn water-soluble cationic metalloporphyrins translate in to remarkably different aqueous redox chemistry and biology. *Inorg. Chem.*, 52:5677-5691; **2013a**.
- Tovmasyan, A.; Sheng, H.; Weitner, T.; Arulpragasam, A.; Lu, M.; Warner, D. S.; Vujaskovic, Z.; Spasojević, I.; Batinić-Haberle, I. Design, mechanism of action, bioavailability and therapeutic effects of Mn porphyrin-based redox modulators. *Med Princ. Pract.*, 22:103-130, **2013b**.
- Tovmasyan, A.; Carballal, S.; Ghazaryan, R.; Melikyan, L.; Weitner, T.; Maia, C. G.; Rebouças, J. S.; Radi, R.; Spasojević, I.; Benov, L.; Batinić-Haberle, I. 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.*, 53:11467-11483, **2014a**.
- Tovmasyan, A.; Rebouças, J. S.; Benov, L. Simple biological systems for assessing the activity of superoxide dismutase mimics. *Antioxid. Redox Signal.*, 20:2416-2436, **2014b**.
- Tovmasyan, A.; Maia, C. G.; Weitner, T.; Carballal, S.; Sampaio, R. S.; Lieb, D.; Ghazaryan, R.; Ivanovic-Burmazovic, I.; Ferrer-Sueta, G.; Radi, R.; Rebouças, J. S.; Spasojević, I.; Benov, L.; Batinić-Haberle, I. A comprehensive evaluation of catalase like activity of different classes of redox-active therapeutics. *Free Radic. Biol. Med.*, 86:308-321, **2015a**.
- Tovmasyan, A.; Sampaio, R. S.; Boss, M.-K.; Bueno-Janice, J. C.; Bader, B. H.; Thomas, M.; Rebouças, J. S.; Orr, M.; Chandler, J. D.; Go, Y. M.; Jones, D. P.; Venkatraman, T. N.; Haberle, S.; Kyui, N.; Lascola, C. D.; Dewhirst, M. W.; Spasojević, I.; Benov, L.; Batinić-Haberle, I. Anticancer therapeutic potential of Mn porphyrin/ascorbate system. *Free. Radic. Biol. Med.* 89:1231-1247, **2015b**.
- Tovmasyan, A.; Bueno-Janice, J.; Boss, M.-K.; Weitzel, D. H.; Sampaio, R. S.; Spasojević, I.; Dewhirst, M. W.; Batinić-Haberle, I. Mn porphyrin-based SOD mimic and vitamin C enhance radiation-induced tumor growth inhibition. *Free Radic. Biol. Med.*, 87:S97-S98, **2015c**.
- Tovmasyan, A.; Go, Y.-M.; Jones, D.; Spasojevic, I.; Batinić-Haberle, I. Redox proteomics of 4T1 breast cancer cell after treatment with MnTE-2-PyP⁵⁺/Ascorbate system. *Free. Radic. Biol. Med.*, 100:S112-113, **2016**.
- Tovmasyan, A.; Bueno-Janice, J. C.; Jaramillo, M. C.; Sampaio, R. S.; Rebouças, J. S.; Kyui, N.; Benov, L.; Deng, B.; Huang, T.-T.; Tome, M. E.; Spasojević, I.; Batinić-Haberle, I.

- Radiation-mediated tumor growth inhibition is significantly enhanced with redox-active compounds that cycle with ascorbate. *Antioxid. Redox Signal.*, 29(13):1196-1214 **2018**.
- Ulrich, K.; Jakob, U. The role of thiols in antioxidant systems. *Free Rad. Biol. Med.*, 140:14-27, **2019**.
- Viana, O.; Ribeiro, M. S.; Rodas, A. C. D.; Rebouças, J. S.; Fontes, A.; Santos, B. S. Comparative study on the efficiency of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* using CdTe Quantum Dots, Zn(II) Porphyrin and their conjugates as photosensitizers. *Molecules*, 20:8893-891, **2015**.
- Vukelic, I.; Celic, T.; Rubinic, N.; Spanjol, J.; Bobinac, M.; Tovmasyan, A.; Oberley-Deegan, R.; Batinic-Haberle, I.; Bobinac, D. Understanding redox biology behind the therapeutic effects of redox active Mn porphyrins in spinal cord ischemia/reperfusion injury. *Free Radic. Biol. Med.*, 87, S97-S98, **2015**.
- Weitner, T.; Kos, I.; Sheng, H.; Tovmasyan, A.; Rebouças, J. S.; Fan, P.; Warner, D. S.; Vujaskovic, Z.; Batinić-Haberle, I.; Spasojević, I. Comprehensive pharmacokinetic studies and oral bioavailability of two Mn porphyrin-based SOD mimics, MnTE-2-PyP⁵⁺ and MnTnHex-2-PyP⁵⁺. *Free Radic. Biol. Med.*, 58:73-80, **2013**.
- Weitzel, D. H.; Tovmasyan, A.; Ashcraft, K. A.; Rajic, Z.; Weitner, T.; Liu, C.; Li, W.; Buckley, A. F.; Prasad, M. r.; Young, K. H.; Rodriguiz, R. M.; Wetsel, W. C.; Peters, K. B.; Spasojević, I.; Herndon, 2nd J. E.; Batinić-Haberle, I.; Dewhirst, M. W. Radioprotection of the brain white matter by Mn(III) N-Butoxyethylpyridylporphyrin-Based Superoxide Dismutase Mimic MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺. *Mol. Cancer Ther.*, 14:70-79; **2015**.
- Weitzel, D. H.; Tovmasyan, A.; Ashcraft, K. A.; Boico, A.; Birer, S. R.; Roy Choudhury, K.; Herndon, J.; Rodriguiz, R. M.; Wetsel, W. C.; Peters, K. B.; Spasojević, I.; Batinić-Haberle, I.; Dewhirst, M. W. Neurobehavioral radiation mitigation to standard brain cancer therapy regimens by Mn(III) n-butoxyethylpyridylporphyrin-based redox modifier. *Environ. Mol. Mutagen.*, 57:372-381, **2016**.
- Welsh, J. L.; Wagner, B. A.; van't Erve, T. J.; Zehr, P. S.; Berg, D. J.; Halfdanarson, T. R.; Yee, N. S.; Bodeker, K. L.; Du, J.; Roberts, L. J., 2nd; Drisko, J.; Levine, M.; Buettner, G. R.; Cullen, J. J. Pharmacological ascorbate with gemcitabine for the control of metastatic and node-positive pancreatic cancer (PACMAN): results from a phase I clinical trial. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 71:765-775, **2013**.
- Wijesekera, T. P.; Dolphin, D. Synthetic aspects of porphyrin and metalloporphyrin chemistry. Em: *Metalloporphyrin in catalytic oxidations*. (Ed. SHELDON, R. A.), New York: Marcel Dekker, **1994**, p. 193-239.
- Winterbourn, C. C.; Metodiewa, D. Reactivity of biologically important thiol compounds with Superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.*, 27(3/4): 322-328, **1999**.
- Winterbourn, C. C.; Kettle, A. J. Radical-radical reactions of superoxide: a potential route to toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 6;305(3):729-736. **2003**.
- Ye, X.; Fels, D.; Tovmasyan, A.; Aird, K. M.; Dedeugd, C.; Allensworth, J. L.; Kos, I.; Park, W.; Spasojević, I.; Devi, G. R.; Dewhirst, M. W.; Leong, K. W.; Batinić-Haberle, I.; Cytotoxic effects of Mn(III) N-alkylpyridylporphyrins in the presence of cellular reductant, ascorbate. *Free Radic. Res.*, 45: 1289-1306, **2011**.

Yulyana, Y.; Tovmasyan, A.; Ho, I. A.; Sia, K. C.; Newman, J. P.; Ng, W. H.; Guo, C. M.; Hui, K. M.; Batinić-Haberle, I.; Lam, P. Y. Redox-Active Mn Porphyrin-based Potent SOD mimic, MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺, enhances carbenoxolone-mediated TRAIL-induced apoptosis in glioblastoma multiforme. *Stem Cell Rev. Rep.*, 12:140-155, **2016**.

APÊNDICE A

Curvas cinéticas e ajustes mono-exponenciais da formação da MnT-2-PyP⁺.

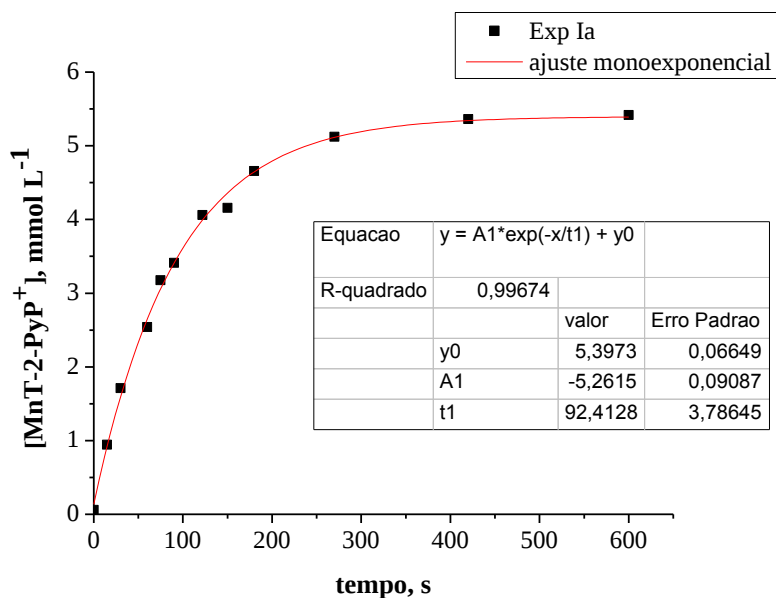


Figura A.1 Curva cinética da formação da MnT-2-PyP⁺ para o **Experimento Ia** do planejamento de Doehlert.

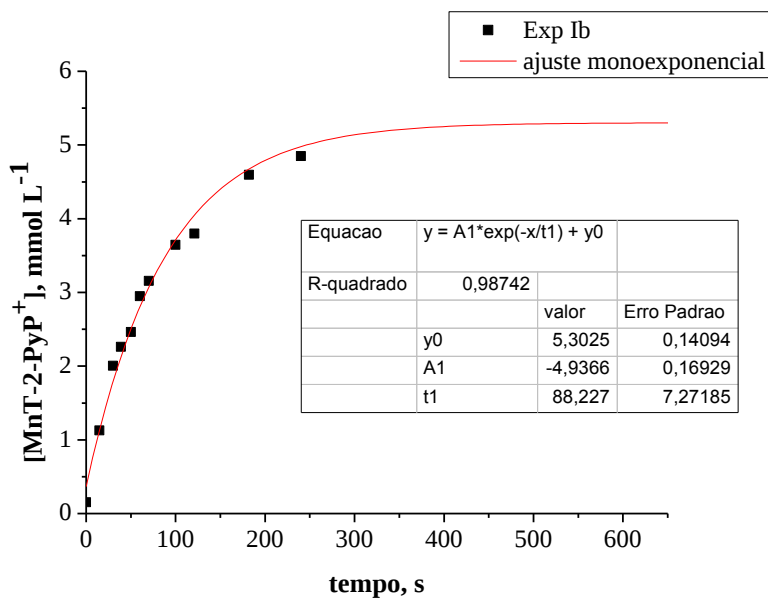


Figura A.2 Curva cinética da formação da MnT-2-PyP⁺ para o **Experimento Ib** do planejamento de Doehlert.

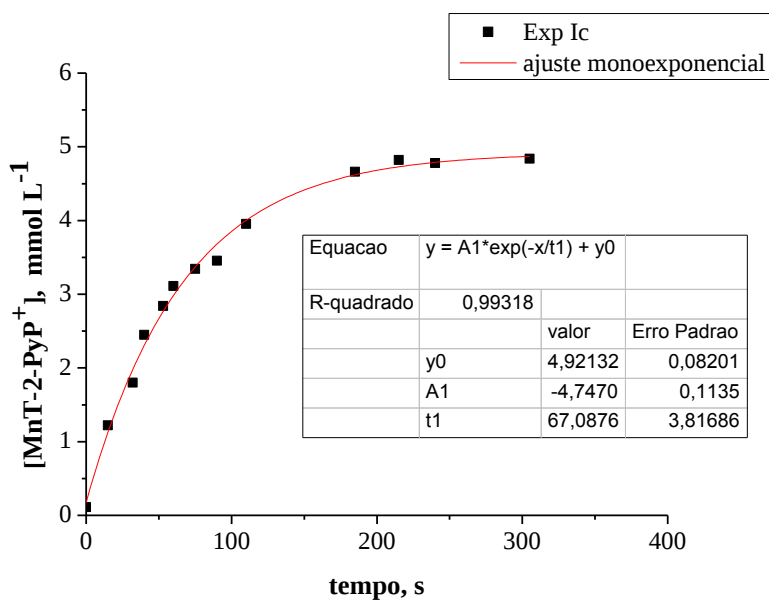


Figura A.3 Curva cinética da formação da MnT-2-PyP⁺ para o **Experimento Ic** do planejamento de Doehlert.

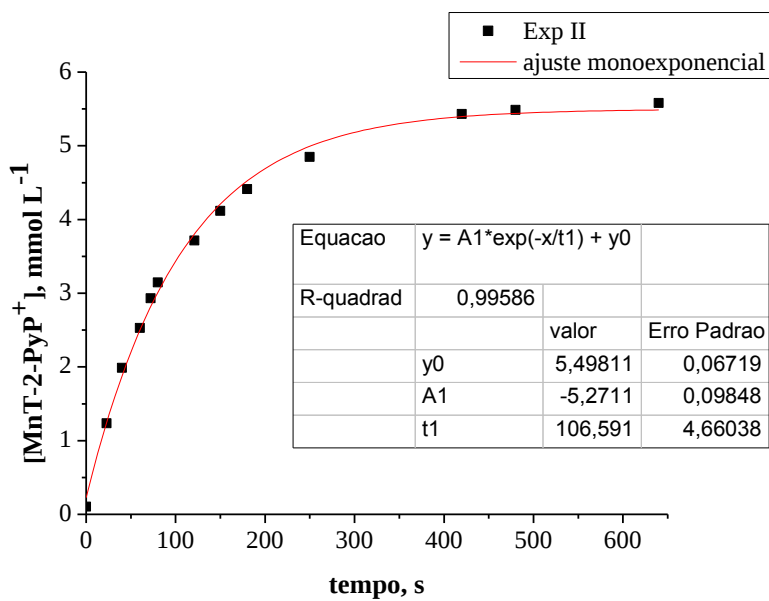


Figura A.4 Curva cinética da formação da MnT-2-PyP⁺ para o **Experimento II** do planejamento de Doehlert.

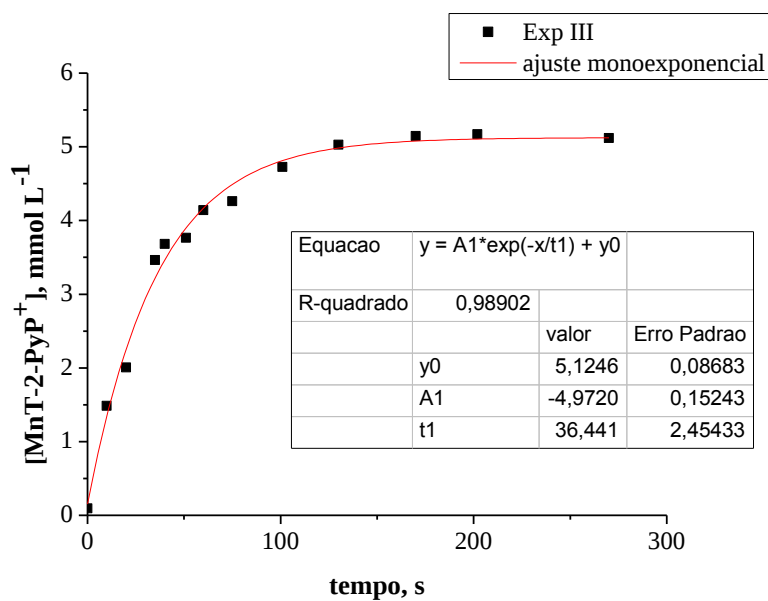


Figura A.5 Curva cinética da formação da MnT-2-PyP⁺ para o **Experimento III** do planejamento de Doehlert.

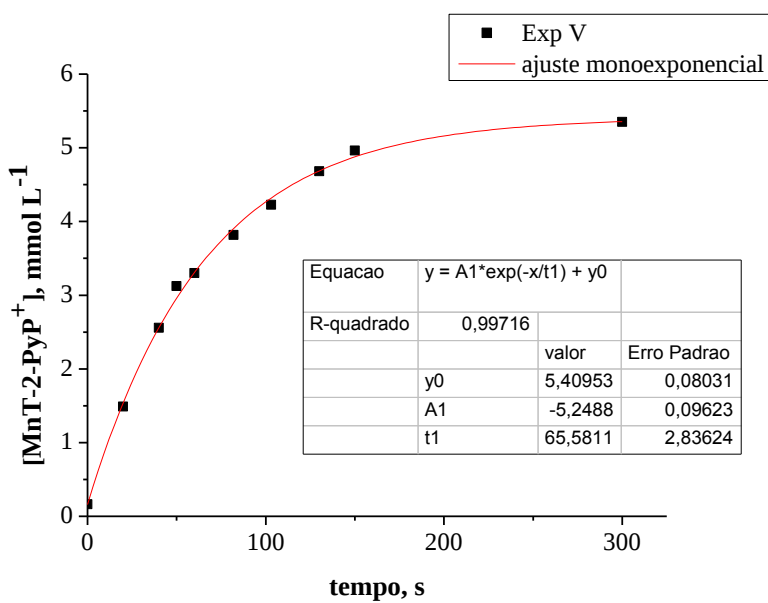


Figura A.6 Curva cinética da formação da MnT-2-PyP⁺ para o **Experimento V** do planejamento de Doehlert.

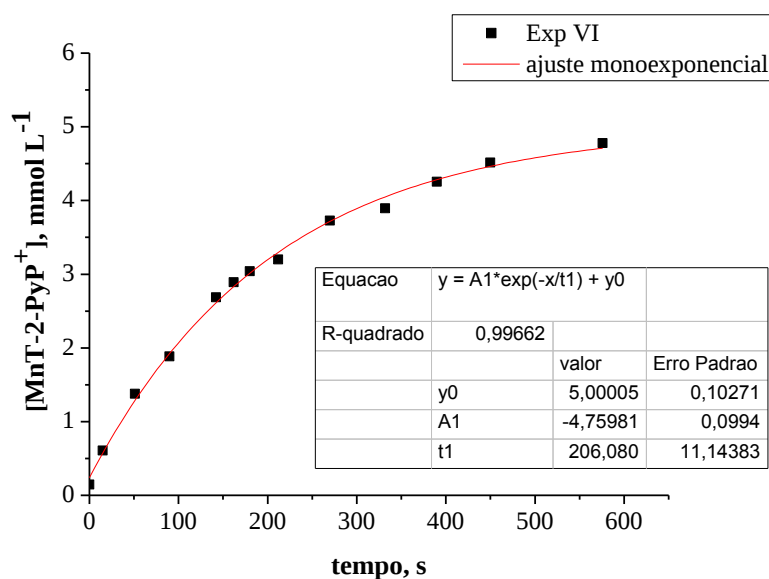


Figura A.7 Curva cinética da formação da MnT-2-PyP⁺ para o **Experimento VI** do planejamento de Doehlert.

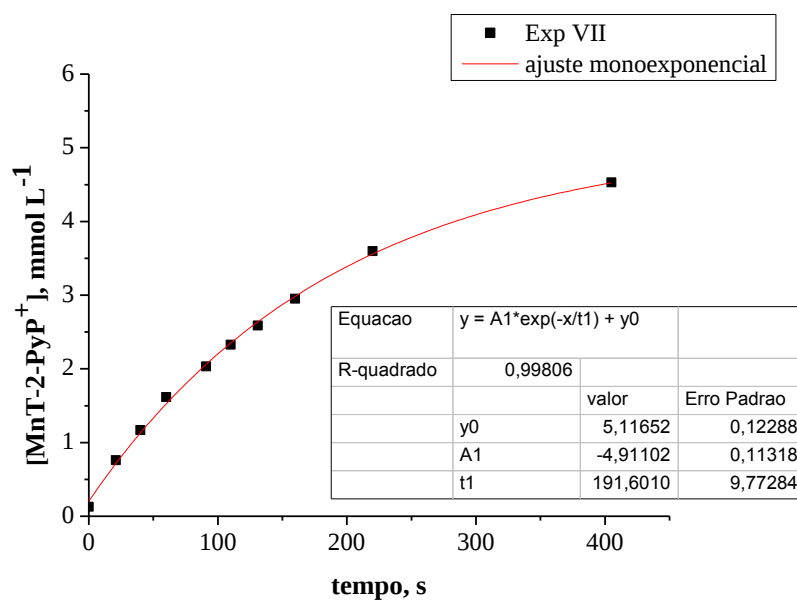


Figura A.8 Curva cinética da formação da MnT-2-PyP⁺ para o **Experimento VII** do planejamento de Doehlert.

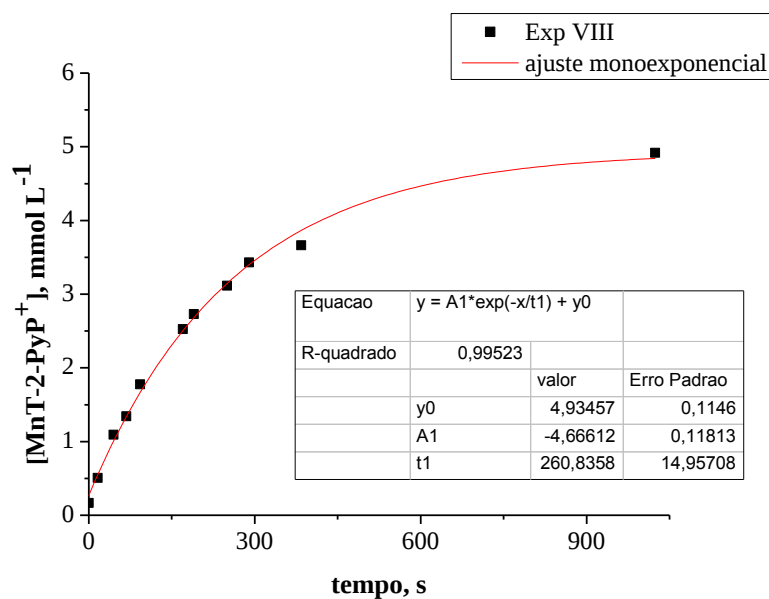


Figura A.9 Curva cinética da formação da $MnT-2-PyP^+$ para o **Experimento VIII** do planejamento de Doehlert.

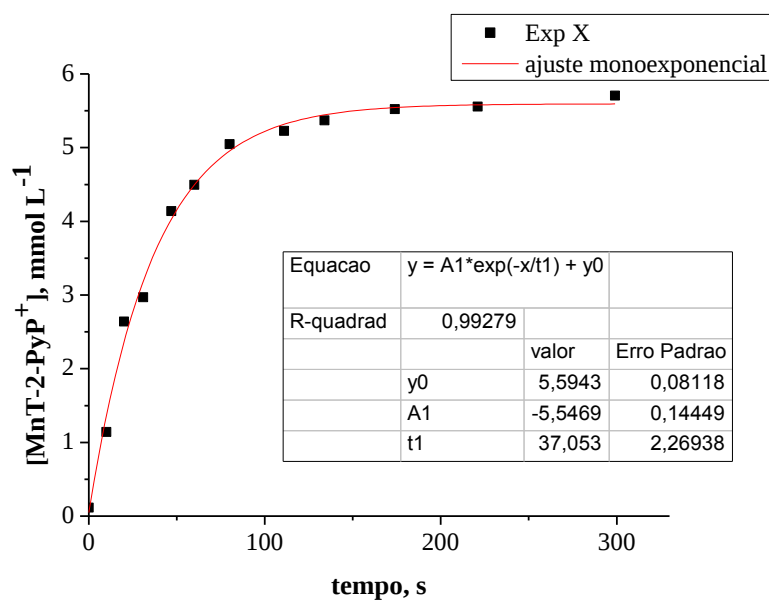


Figura A.10 Curva cinética da formação da $MnT-2-PyP^+$ para o **Experimento X** do planejamento de Doehlert.

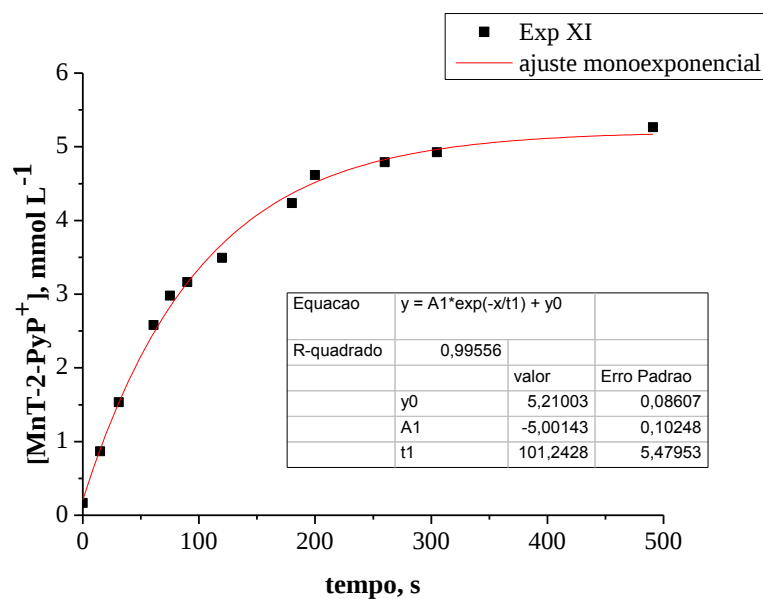


Figura A.11 Curva cinética da formação da MnT-2-PyP⁺ para o **Experimento XI** do planejamento de Doehlert.

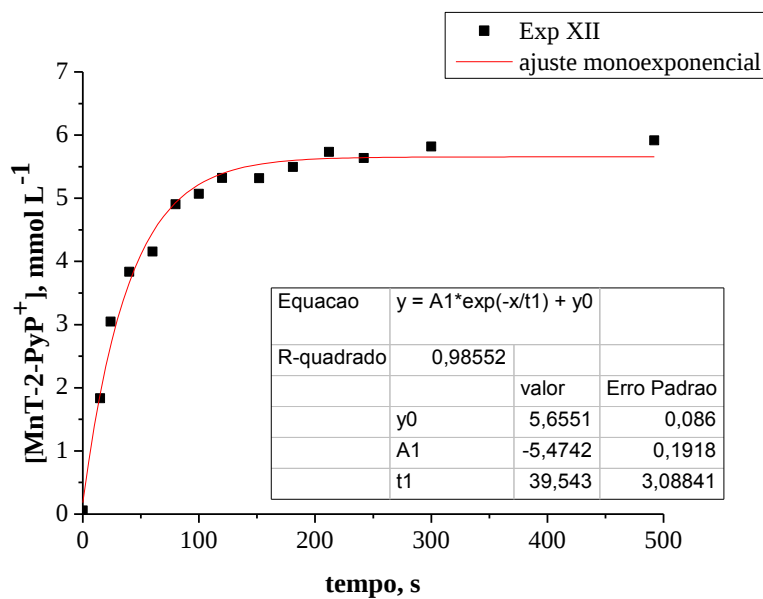


Figura A.12 Curva cinética da formação da MnT-2-PyP⁺ para o **Experimento XII** do planejamento de Doehlert.

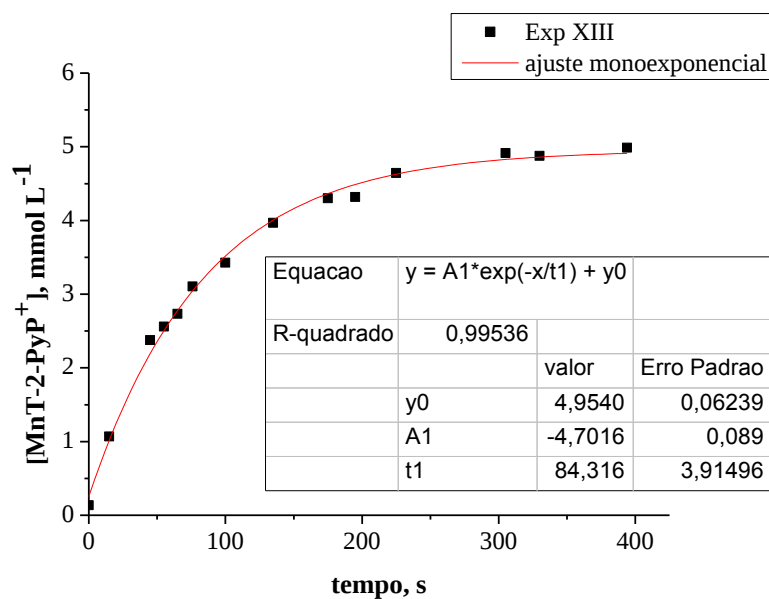


Figura A.13 Curva cinética da formação da MnT-2-PyP⁺ para o **Experimento XIII** do planejamento de Doehlert. Clique ou toque aqui para inserir o texto.

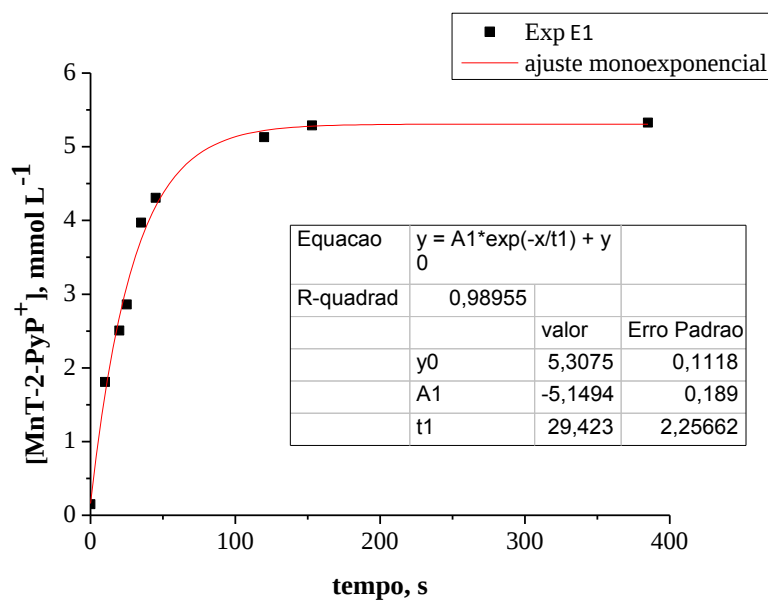


Figura A.14 Curva cinética da formação da MnT-2-PyP⁺ para o **Experimento E1**.

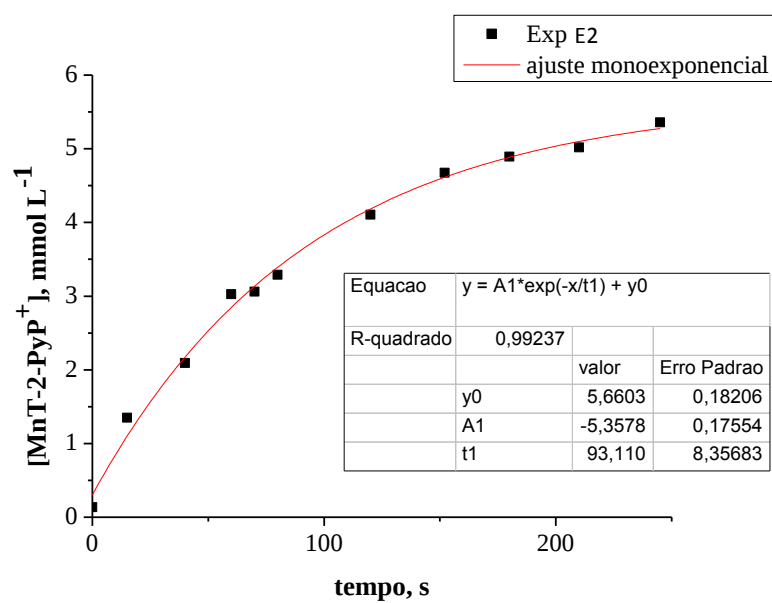


Figura A.15 Curva cinética da formação da MnT-2-PyP⁺ para o **Experimento E2**.

APÊNDICE B

Tabela B.1 Tempo de formação de 50% da MnT-2-PyP⁺ (t_{50}) obtida do planejamento de Doehlert.

Experimentos	Valores experimentais			
	X_1	X_2	X_3	t_{50} min
	[H ₂ SO ₄] mmol L ⁻¹	(C _{Mn} /C _{H2P}) _{inicial}	T°C (± 2)	
Ia	95	7,0	50	73
Ib	95	7,0	50	67
Ic	95	7,0	50	61
II	125	7,0	50	80
III	110	11,5	50	31
IV	110	8,5	60	NR
V	65	7,0	50	51
VI	80	2,5	50	179
VII	80	5,5	40	161
VIII	110	2,5	50	230
IX	110	5,5	50	NR
X	80	11,5	50	28
XI	95	10,0	40	83
XII	80	8,5	60	29
XIII	95	4,0	60	74

NR significa experimentos não realizados.

APÊNDICE C

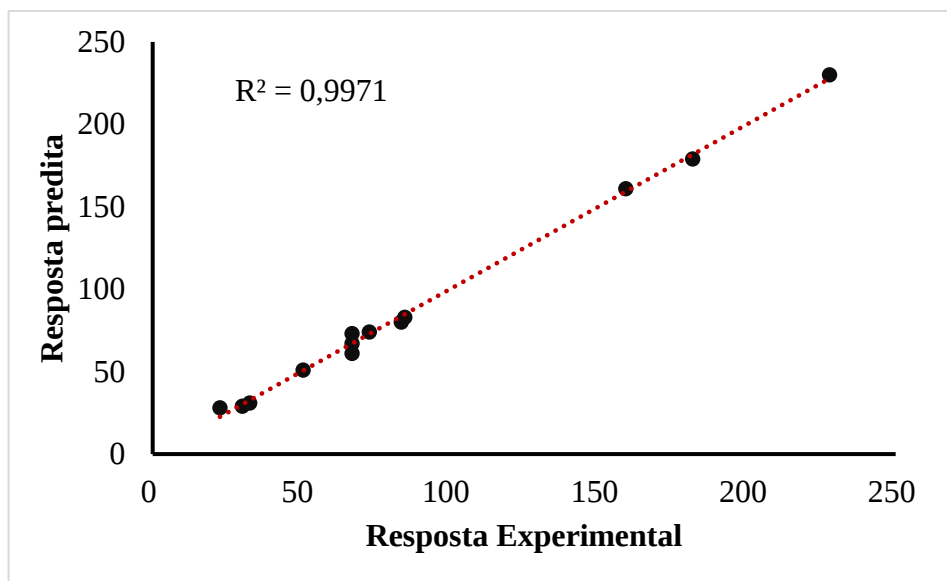


Figura C.1 Gráfico de correlação entre a resposta predita pela equação do modelo ajustado nas condições experimentais do planejamento de Doehlert e a resposta experimental (t_{50}).

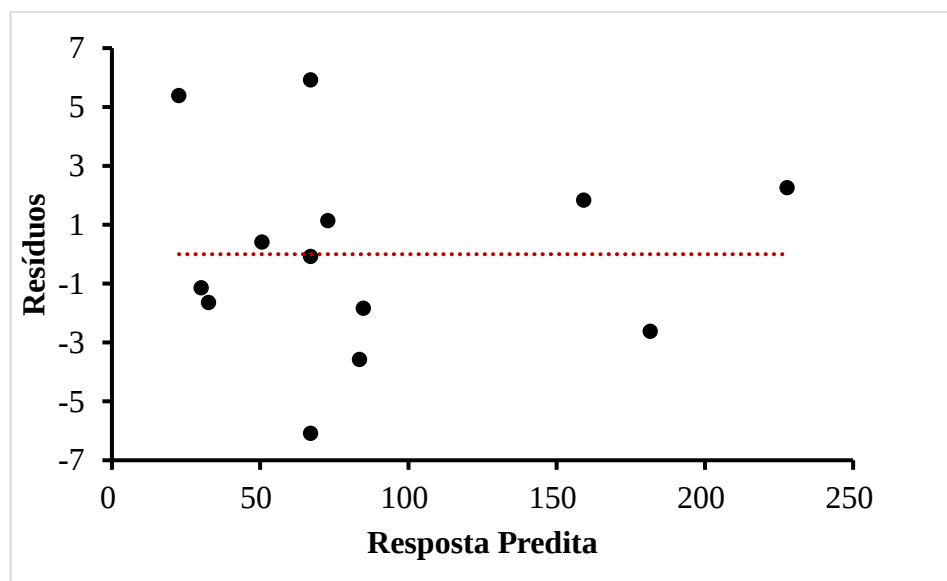


Figura C.2 Distribuição dos resíduos em função dos valores da resposta predita pela equação do modelo ajustado nas condições experimentais do planejamento de Doehlert.

APÊNDICE D

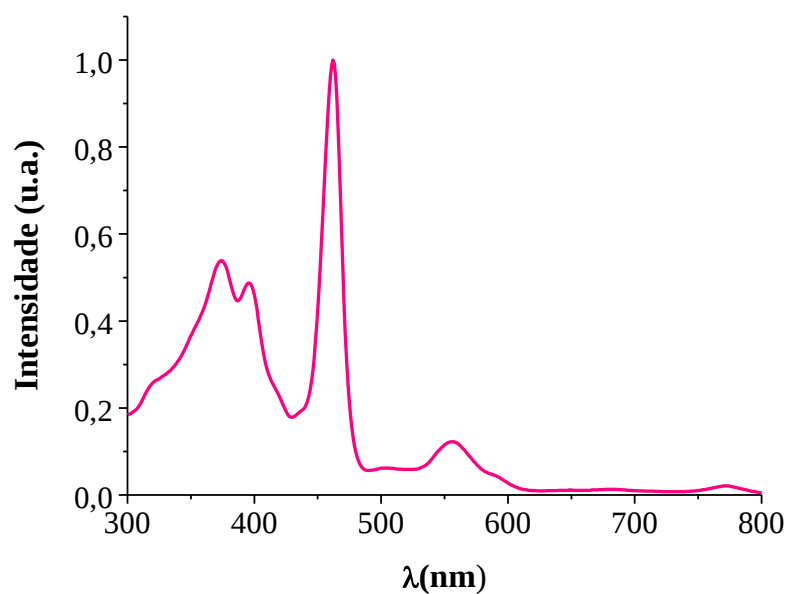


Figura D.1 Espectro de absorção (normalizado) da MnT-2-PyP⁺ em H₂O.

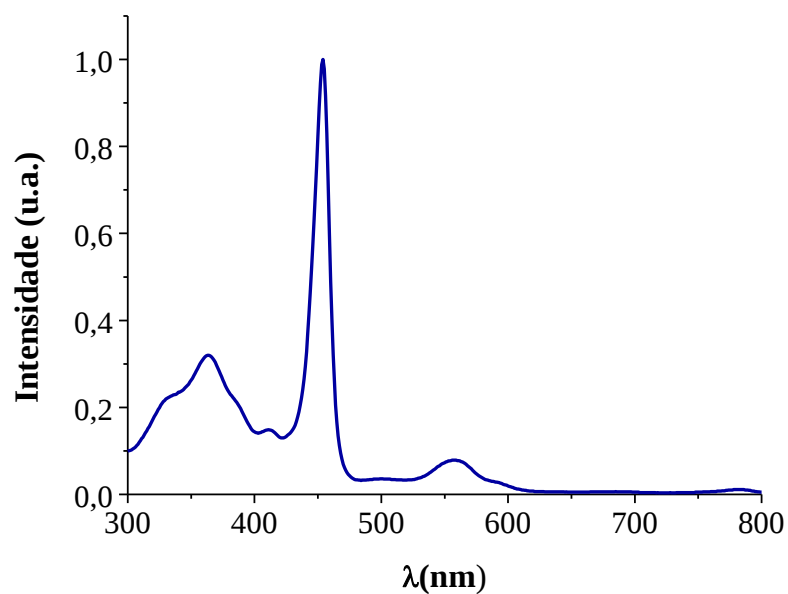


Figura D.2 Espectro de absorção (normalizado) da MnTE-2-PyP⁵⁺ em H₂O.

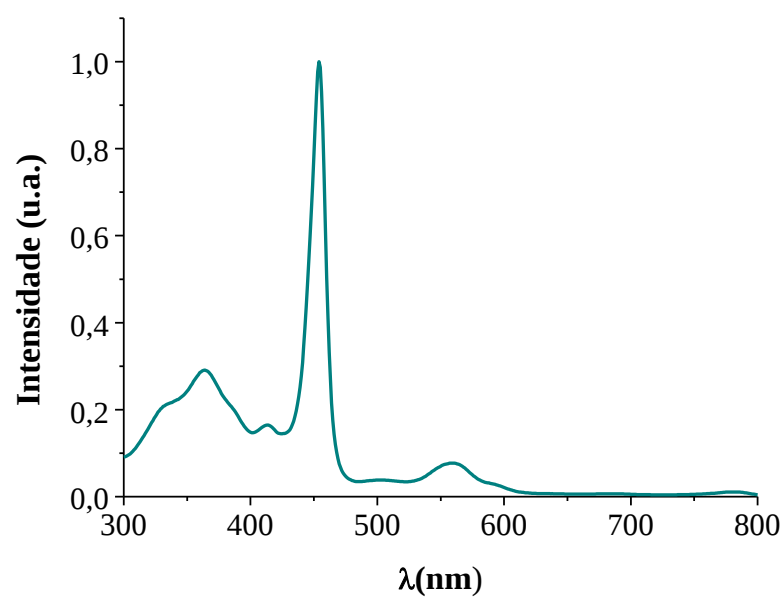


Figura D.3 Espectro de absorção (normalizado) da MnTnHex-2-PyP⁵⁺ em H₂O.