



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Lucas Brandalise Menezes

**Efeito de compostos de coordenação de  $\text{Cu}^{\text{II}}$ ,  $\text{Fe}^{\text{III}}$  e  $\text{Mn}^{\text{II}}$  na regulação da homeostase redox em diferentes modelos de estresse oxidativo**

Florianópolis – SC  
2023

Lucas Brandalise Menezes

**Efeito de compostos de coordenação de  $\text{Cu}^{\text{II}}$ ,  $\text{Fe}^{\text{III}}$  e  $\text{Mn}^{\text{II}}$  na regulação da homeostase redox em diferentes modelos de estresse oxidativo**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito final para obtenção do Título de Doutor em Química

Orientadora: Profa. Dra. Christiane Fernandes Horn

Coorientadora: Profa. Dra. Alexandra Latini

Lucas Brandalise Menezes

**Efeito de compostos de coordenação de Cu<sup>II</sup>, Fe<sup>III</sup> e Mn<sup>II</sup> na regulação da homeostase redox em diferentes modelos de estresse oxidativo**

O presente Trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Carla Inês Tasca  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Júlio Santos Rebouças  
Universidade Federal da Paraíba

Profa. Dra. Regina de Sordi  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutor em Química.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Profa. Dra. Christiane Fernandes Horn – Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Profa. Dra. Alexandra Latini – Coorientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

## Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais e minha irmã, cujo amor, apoio incondicional e incentivo foram a força motriz por trás de cada passo dado nesse caminho. Sem vocês, nada disso seria possível.

À minha orientadora, Christiane Fernandes, e à minha coorientadora, Alexandra Latini, duas notáveis pesquisadoras e mulheres inspiradoras. Suas orientações, expertises e comprometimentos foram faróis que guiaram cada etapa desta pesquisa. Aprendi não apenas sobre ciência, mas também sobre resiliência e determinação.

Aos colegas de laboratório, Ana, André, Bruna, Eduardo, Felipe, Iago, Monica, Renne e Samuel, que ao longo do tempo se transformaram em amigos valiosos. As trocas de experiências, colaborações e amizades foram essenciais para o enriquecimento deste trabalho. Um agradecimento especial à Bruna pela amizade e companheirismo.

Às equipes dos laboratórios LABOX e LabCare, e seus coordenadores Prof. Alexandra Latini e Daniel Fernandes, pela disponibilidade de recursos, infraestrutura e suporte técnico indispensáveis para a realização dos estudos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Agradecimentos especiais aos colegas de laboratório Gianni Mancini (LABOX) e Gabrieli Delfrati (LabCare).

Ao Prof. Adolfo Horn Junior, do Departamento de Química-UFSC, pela realização dos estudos de EPR, discussão dos resultados e pela parceria estabelecida.

Ao Prof. Marcos Dias Pereira, do Departamento de Bioquímica da UFRJ pelo estudo bioquímico empregando leveduras e pela parceria estabelecida.

Ao técnico Nilton César Pereira, do Departamento de Química- UFSC pelo auxílio na realização das análises de IV e EPR, pela disponibilidade e eficiência.

Às Professoras Carla Inês Tasca e Regina de Sordi e ao Professor Júlio Santos Rebouças pela participação como membros avaliadores dessa tese.

Por fim, não posso deixar de agradecer a CAPES que tornou possível a realização deste trabalho. O suporte financeiro foi vital para a condução das pesquisas e para o alcance dos resultados aqui apresentados.

A todos, o meu mais profundo agradecimento. Cada um de vocês teve um papel crucial nessa jornada, e sou imensamente grato por isso.

## Resumo

As Espécies Reativas (ERs) são primariamente geradas na mitocôndria durante a fosforilação oxidativa. Elas desempenham uma série de funções essenciais quando presentes em concentrações apropriadas, como a sinalização redox e a modulação do sistema imunológico. No entanto, em excesso, estão associadas ao fenômeno conhecido como estresse oxidativo, o qual está relacionado ao desenvolvimento de várias doenças. As metaloenzimas têm um papel crucial na manutenção da homeostase redox, regulando os níveis de ERs nos organismos. Exemplos de metaloenzimas incluem a Catalase (CAT) e a Superóxido Dismutase (SOD), que têm uma enorme relevância para os seres humanos. Dessa forma, compostos de coordenação contendo  $\text{Cu}^{\text{II}}$ ,  $\text{Fe}^{\text{III}}$  e  $\text{Mn}^{\text{II}}$ , com o ligante 1-bispiridina-2-ilmetilamina-3-cloropropan-2-ol (hpclnol), considerados miméticos da CAT e SOD, foram utilizados em diferentes modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, de estresse oxidativo, para avaliar o impacto desses compostos nesses sistemas. Interações diretas entre os compostos de coordenação da série hp e as ERs (peróxido de hidrogênio, ânion radical superóxido e radical hidroxila) foram detectadas e investigadas pelas técnicas de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) e espectroscopia eletrônica, revelando a formação de espécies como superóxido-cobre(I), superóxido-cobre(II), espécie de valência-mista  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$  e uma espécie de alta valência  $\text{Mn}^{\text{IV}}\text{-oxo-Mn}^{\text{III}}$ . Os compostos inibiram a geração de ERs em modelos *in vitro* de estresse oxidativo, induzidos por rotenona e LPS, sendo a ordem de inibição observada neste estudo:  $\text{FeHP} > \text{MnHP} > \text{EUK-8} > \text{CuHP}$ . Além disso, esses compostos aumentaram a sobrevivência da levedura *S. cerevisiae*, submetida ao estresse causado pelo radical hidroxil (reação de Fenton), seguindo a ordem  $\text{EUK-8} > \text{série hp}$ . Empregando-se modelo *ex vivo* de estresse oxidativo, utilizando-se preparações de fígado de camundongos *swiss* expostos ao radical hidroxil, os danos oxidativos foram atenuados, e os valores de  $\text{IC}_{50}$  calculados sugerem a ordem de atividade antioxidante:  $\text{CuHP} > \text{FeHP} > \text{MnHP} \gg \text{EUK-8}$ . A prevenção da disfunção mitocondrial induzida por rotenona foi avaliada por meio da técnica de respirometria de alta resolução (HRR). Todos os compostos preveniram a disfunção mitocondrial de forma semelhante, aumentando o consumo máximo de oxigênio. O composto FeHP foi o mais efetivo na inibição da progressão do edema de pata, (induzido por carragenina), em camundongos, seguido pelos compostos MnHP e EUK-8.

## Abstract

Reactive Species (RS) are primarily generated in the mitochondria during oxidative phosphorylation. They play a series of essential roles when present in appropriate concentrations, such as redox signaling and modulation of the immune system. However, in excess, they are associated with the phenomenon known as oxidative stress, which is related to the development of various diseases. Metalloenzymes play a crucial role in maintaining redox homeostasis by regulating RS levels in organisms. Examples of metalloenzymes include Catalase (CAT) and Superoxide Dismutase (SOD), which are highly relevant to humans. Thus, coordination compounds containing  $\text{Cu}^{\text{II}}$ ,  $\text{Fe}^{\text{III}}$ , and  $\text{Mn}^{\text{II}}$ , with the ligand bispyridine-2-ylmethylamine-3-chloropropan-2-ol (hpclnol), considered mimetics of CAT and SOD, were used in different *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* models of oxidative stress to assess the impact of these compounds on these systems. Direct interaction between the coordination compounds of the hp series and RS (hydrogen peroxide, superoxide radical anion, and hydroxyl radical) was detected and investigated by electron paramagnetic resonance (EPR) and electronic spectroscopy techniques, revealing the formation of species such as copper(I) superoxide, copper(II) superoxide, mixed-valence  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$  species, and a high-valence  $\text{Mn}^{\text{IV}}\text{-oxo-Mn}^{\text{III}}$  species. The compounds inhibited the generation of RS in *in vitro* models of oxidative stress induced by rotenone and LPS, with the observed inhibition order in this study being:  $\text{FeHP} > \text{MnHP} > \text{EUK-8} > \text{CuHP}$ . Furthermore, these compounds increased the survival of *S. cerevisiae* yeast subjected to hydroxyl radical-induced stress (Fenton reaction), following the order  $\text{EUK-8} > \text{hp series}$ . Employing an *ex vivo* model of oxidative stress using preparations of Swiss mouse liver exposed to the hydroxyl radical, oxidative damage was attenuated, and the calculated  $\text{IC}_{50}$  values suggest the order of antioxidant activity:  $\text{CuHP} > \text{FeHP} > \text{MnHP} \gg \text{EUK-8}$ . Prevention of rotenone-induced mitochondrial dysfunction was assessed using the high-resolution respirometry (HRR) technique. All compounds prevented mitochondrial dysfunction in a similar way by increasing maximum oxygen consumption. The compound FeHP was the most effective in inhibiting the progression of paw edema (induced by carrageenan) in mice, followed by the compounds MnHP and EUK-8.

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Representação esquemática dos diagramas de orbital molecular, considerando as interações covalentes entre os orbitais atômicos 2p, para as moléculas diatômicas  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$  e  $NO$ . Em vermelho, estão destacados os elétrons nos orbitais HOMO.<sup>5</sup> 17
- Figura 2.** Estrutura do ligante hpcInol e dos respectivos compostos de coordenação de  $Cu^{II}$ ,  $Fe^{III}$  e  $Mn^{II}$ .<sup>34,38,39</sup> 19
- Figura 3.** Representação dos processos da peroxidação lipídica. Na figura, PUFA = Ácidos Graxos Poli-Insaturados; RL = lipídio radicalar; LP = peroxilipídio; HNE - 4-hidroxinonenal; ACR = acrilamida.<sup>53</sup> 21
- Figura 4.** Representação do processo de fosforilação oxidativa. Os complexos proteicos estão dispostos na membrana mitocondrial interna. Os substratos orgânicos fornecem elétrons para os complexos a partir da matriz mitocondrial. Os elétrons transitam entre os complexos I ao IV até interagir com o oxigênio molecular, formando água metabólica. Os prótons, provenientes dos substratos, são bombardeados para o espaço entre as membranas interna e externa, gerando uma diferença de potencial (ddp) entre -120 a -180 mV. Essa dpp é utilizada para rotacionar o fragmento  $F_1$  do complexo V e essa energia mecânica é responsável por transformar ADP, na presença de um grupo fosfato, em ATP.<sup>104,105</sup> 25
- Figura 5.** Espectros EPR do aduto  $DMPO\cdot OH$  (linha preta) e titulação com concentrações crescentes de: complexo (1) (linha azul), complexo (2) (linha rosa) e  $[Mn(salen)Cl]$  (linha verde).<sup>145</sup> 30
- Figura 6.** Efeito dos miméticos de SOD/CAT na peroxidação lipídica em células envelhecidas de forma cronológica. Os níveis de peroxidação lipídica foram determinados por quantificação de MDA utilizando o método TBARS. A peroxidação lipídica foi expressa em pmols de MDA  $mg^{-1}$  de células.<sup>37</sup> 31
- Figura 7.** Ensaio respirométrico representativo de células HT22 intactas pré-incubadas com  $2 \mu mol L^{-1}$  de  $(PhSe)_2$  seguido da exposição ou não com  $tert-BuOOH$  ( $40 \mu mol L^{-1}$ ).<sup>158</sup> 34
- Figura 8.** Representação genérica da estrutura molecular do LPS. Em preto está representada a fração “lipídio A”, enquanto nas cores azul e vermelho estão representadas as frações “oligossacarídeo” e “polissacarídeo O”, respectivamente. 35
- Figura 9.** Representação das estruturas moleculares dos compostos de coordenação  $VO(AAIT)$ ,  $VO(ANIT)$ ,  $VO(SCA)_2$ ,  $VO(MBIT)$  e  $VO(AAMB)_2$ .<sup>176</sup> 37

- Figura 10.** Volume do edema (mL) para cada tratamento nos tempos de 0,5 a 5 h.<sup>176</sup> 38
- Figura 11.** Representação esquemática da síntese do precursor bmpa e do pré-ligante hpclnol. 40
- Figura 12.** Representação esquemática da síntese do pré-ligante salen. 40
- Figura 13.** Representação esquemática das equações químicas envolvidas na síntese dos compostos da série hp, onde M = Fe<sup>III</sup>, Cu<sup>II</sup> ou Mn<sup>II</sup>. 41
- Figura 14.** Representação da equação de reação química envolvida na síntese do EUK-8. 41
- Figura 15.** Representação da oxidação do MTT (amarelo) em formazan (violeta), catalisado pela enzima NADH desidrogenase 43
- Figura 16.** Reações de oxidação do DCFH-DA (não fluorescente) até sua forma oxidada DCF (fluorescente) no meio intracelular. 44
- Figura 17.** Representação das reações de nitração e diazotação que ocorre com os reagentes de Griess na presença dos metabólitos do NO. 45
- Figura 18.** Reação entre o MDA e TBA que ocorre no ensaio de TBARS em meio ácido e à 100 °C para formar o aduto fluorescente TBA-MDA-TBA 48
- Figura 19.** Espectros na região do IV para o ligante hpclnol (acima) e do FeHP (abaixo). Destaque em laranja: banda Fe-O-Fe, em 830 cm<sup>-1</sup>. 57
- Figura 20.** Espectro eletrônico e estrutura proposta para o FeHP, obtido em DMSO. 57
- Figura 21.** Voltamograma cíclico para o FeHP, obtido em DMSO. 57
- Figura 22.** Avaliação da viabilidade celular dos compostos nas doses de 0,3 a 100 µmol L<sup>-1</sup> frente a células C6 através do ensaio colorimétrico de MTT. Cada barra representa a média de sobrevivência das células em experimentos independentes ± erro padrão da média (n=4). 58
- Figura 23.** Redução da emissão de fluorescência (u.a.) em células C6, tratadas com os compostos de coordenação e submetidas ao estresse oxidativo, induzido por meio da rotenona (Rot) na concentração de 50 µmol L<sup>-1</sup>. O ácido gálico (AG) na concentração de 100 µmol L<sup>-1</sup> foi utilizado como controle positivo. A análise de variância (ANOVA) de dois fatores foi realizada com um valor de p<0,05 e os grupos foram agrupados em diferentes categorias representadas por asteriscos (\*) de acordo com suas similaridades estatísticas. 59
- Figura 24.** Inibição da produção de NO<sub>x</sub> em células C6 tratadas com os compostos de coordenação e submetidas ao estresse oxidativo, induzido por meio do LPS, na concentração de 50 µmol L<sup>-1</sup>. Dexametasona (Dexa), na concentração de 10 µmol L<sup>-1</sup>,



foi utilizado como controle positivo. Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) com um valor de  $p < 0,05$  e os grupos foram agrupados em diferentes categorias representadas por asteriscos (\*) de acordo com suas similaridades estatísticas. 61

**Figura 25.** Propostas de mecanismos dos compostos da série hp envolvidos na modulação do estresse oxidativo induzido por rotenona e LPS em células C6 62

**Figura 26.** Sobrevivência das células de *S. cerevisiae* pré-tratadas com os compostos da série hp e expostas ao radical hidroxil. \*Indica resultados estatisticamente diferentes das condições de geração do  $\bullet\text{OH}$ ; \*\*Indica resultados estatisticamente diferentes das condições de geração do  $\bullet\text{OH}$  da concentração menor testada de cada composto; #Indica resultados estatisticamente diferentes de 12,5 e 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de EUK-8; §Indica resultados estatisticamente diferentes de 12,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de EUK-8. 64

**Figura 27.** Redução da peroxidação lipídica em células de *S. cerevisiae* tratadas com os compostos pertencentes a série hp e expostas a condições de estresse pelo radical hidroxil. A análise estatística foi realizada usando o teste t, com  $P < 0,05$ . \*Indica resultados estatisticamente diferentes do controle. \*\* Indica resultados estatisticamente diferentes das condições geradoras do  $\bullet\text{OH}$ . 65

**Figura 28.** Interação entre o CuHP e o  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , investigado por EPR (esquerda) e espectroscopia eletrônica (direita). O espectro do CuHP é mostrado em linha azul em ambos os espectros (linha pontilhada referente a 24 h após a interação). O intermediário formado “superóxocobre” é mostrado em rosa em ambos os espectros. O  $\text{O}_2^{\bullet-}$  não apresenta nenhuma transição eletrônica na faixa avaliada. 70

**Figura 29.** Proposta do mecanismo e intermediários formados na reação entre o CuHP e o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  com base nos resultados obtidos por EPR e espectroscopia eletrônica. 71

**Figura 30.** Interação entre o composto FeHP e o  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , investigado por EPR. O espectro do composto FeHP é mostrado em azul. (linha pontilhada referente a 24 h após a interação). O intermediário formado em violeta. 72

**Figura 31.** Proposta do mecanismo da reação entre o composto FeHP e o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  com base nos resultados obtidos por EPR. 72

**Figura 32.** Interação entre os compostos de manganês (MnHP e EUK-8) e o  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , investigados por EPR. Os espectros em azul são referentes aos compostos isolados e os espectros em azul tracejado são referentes aos espectros provenientes das reações com o  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , após 24 h. Todos os espectros de EPR foram registrados em DMSO seco, a 100 K. 73

- Figura 33.** Espectros de EPR dos compostos CuHP (esquerda) e FeHP (direita), registrados em PBS pH 7,4 e a 100 K. Os espectros em preto são referentes a interação entre esses compostos de coordenação e a espécie reativa  $\text{H}_2\text{O}_2$ . 74
- Figura 34.** Espectro de EPR, à esquerda do composto MnHP, registrado em PBS e a 100 K. Espectro eletrônico, à direita, do composto de MnHP, registrados em PBS pH e a temperatura ambiente. Os espectros em azul são referentes aos compostos isolados e os espectros em azul tracejado são referentes aos espectros provenientes das reações com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  após 24 h. 76
- Figura 35.** Proposta de mecanismo da decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  na presença do MnHP em solução de tampão fosfato pH = 7,4. 76
- Figura 36.** Interação entre os compostos de coordenação e o  $\cdot\text{OH}$ . Os compostos foram separados em cores. A linha cheia colorida representa o espectro de DMPO-OH na presença do composto na menor concentração e a linha colorida tracejada representa o espectro de DMPO-OH na presença do composto na maior concentração. 78
- Figura 37.** Consumo de oxigênio celular em Parâmetros respiratórios mitocondriais. células C6. 80
- Figura 38.** Valores de consumo de oxigênio obtidos pela técnica de HRR. Cada grupo contém 300 milhões de células C6. O grupo Rot (barra vermelha), recebeu um tratamento de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de rotenona. Os grupos restantes receberam um pré-tratamento com  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  dos compostos indicados por 1 h. Os grupos contendo a barra texturizada receberam um pré-tratamento com os compostos indicados por 1 h, seguido do tratamento com rotenona  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  por mais 1 h. 81
- Figura 39.** Efeito dos compostos de coordenação na massa do edema (mg) em função do tempo (h). O gráfico à esquerda é referente aos valores obtidos para os grupos tratados com  $2 \text{ mg kg}^{-1}$ , e o gráfico à direita é referente aos grupos tratados com  $8 \text{ mg kg}^{-1}$ . 83
- Figura 40.** Imagens do edema de pata em 48 h (pico). A imagem A é referente ao grupo controle Cgn no tempo de 48 h após a injeção intradérmica de carragenina. A imagem B é referente ao controle positivo  $8 \text{ mg kg}^{-1}$  no tempo de 48 h após a injeção intradérmica de carragenina. A imagem C é referente ao FeHP  $8 \text{ mg kg}^{-1}$  no tempo de 48 h após a injeção intradérmica de carragenina. A pata direita funciona como uma referência a uma pata sem edema (0 mg de edema). 84
- Figura 41.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do hpclnol registrado em  $\text{CD}_3\text{Cl}$  109
- Figura 42.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do salen registrado em  $\text{CD}_3\text{CL}$  109

- Figura 43.** Sobreposição dos espectros de infravermelho do hpclnol e seus respectivos compostos de  $\text{Cu}^{\text{II}}$ ,  $\text{Fe}^{\text{III}}$  e  $\text{Mn}^{\text{II}}$ . O espectro do ligante e dos compostos de coordenação foram obtidos em filme e pastilha de KBr, respectivamente. 110
- Figura 44.** Sobreposição dos espectros de infravermelho do ligante salen (preto) e do composto de manganês (III) EUK-8 (azul). 111
- Figura 45.** Sobreposição dos espectros eletrônicos do composto CuHP em diferentes concentrações para o cálculo de coeficiente de absorção molar, registrados em DMSO. Os espectros em preto foram registrados em concentrações micromolares e os espectros em vermelho foram registrados em concentração milimolares. 112
- Figura 46.** Sobreposição dos espectros eletrônicos do FeHP em diferentes concentrações, registrado em DMSO. 113
- Figura 47.** Sobreposição dos espectros eletrônicos do MnHP em diferentes concentrações, registrados em DMSO. 114
- Figura 48.** Voltamograma cíclico do composto MnHP registrado em DMSO seco no sentido anódico e com velocidade  $10 \text{ mV s}^{-1}$ . Foi empregado um sistema de três eletrodos de platina conforme descrito em Materiais e Métodos. 116
- Figura 49.** Voltamograma cíclico do composto EUK-8 registrado em DMSO seco no sentido anódico e com velocidade  $10 \text{ mV s}^{-1}$ . Foi empregado um sistema de três eletrodos de platina conforme descrito em Materiais e Métodos. 116

“A vida é para quem é corajoso o suficiente para se arriscar e humilde o bastante para aprender”

(Clarice Lispector)

## Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos

ACR – Acrilamida

ATP – Adenosina trifosfato

bmpa - bis-(piridin-2-ilmetil)amina

CAT – Catalase

CTE – Cadeia de transporte de elétrons

DA – Doença de Alzheimer

ddp – Diferença de potencial

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial

EPR – Ressonância Paramagnética Eletrônica

ER – Espécie reativa

EUK-8 – Composto de coordenação [Mn(salen)Cl]

FCCP – Carbonil cianeto 4-(trifluorometoxi)fenil-hidrazona

FTIR – Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

GPx – Glutathione peroxidase

GSH – Glutathione

GSH – Glutathione reduzida

HNE – 4-hidroxi-nonenal

hpcnlol - (1-bispiridina-2-ilmetilamina-3-cloropropan-2-ol)

HRR – Respirometria de alta resolução

IC<sub>50</sub> – Concentração inibitória 50

LP – Peroxilipídio

LPO – Peroxidação lipídica

LPS - Lipopolissacarídeo

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazóli

NADH – Dinucleotídeo adenina com nicotinamida reduzido

NO<sub>x</sub> – Metabólitos do NO

NSAIDs – Anti-inflamatórios não esteroidais

OCR – Taxa de consumo de oxigênio molecular

OCR-ATP – Taxa de consumo de oxigênio molecular associado à síntese de ATP

PBS – Tampão fosfato pH = 7,4

PBS – Tampão fosfato salino

PUFA – Ácidos Graxos Poli-Insaturados

RL – Lipídio radicalar

Salen/EUK – bis(salicilideno)etilenodiamina

SOD – Superóxido dismutase

## SUMÁRIO

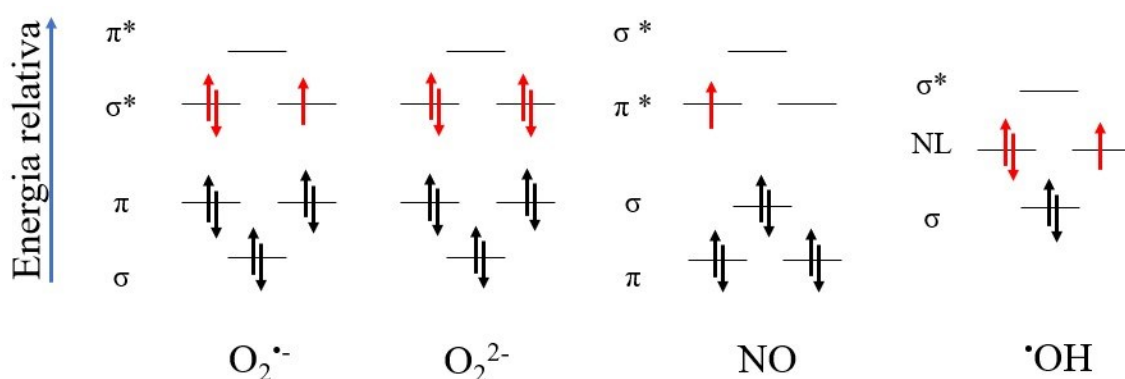
1. INTRODUÇÃO .....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	21
2.1 Estresse oxidativo, danos oxidativos às biomoléculas e doenças relacionadas .....	21
2.2 O papel dos antioxidantes na modulação do estresse oxidativo .....	24
2.4 Efeito de antioxidantes na disfunção mitocondrial .....	31
2.5 Atividade anti-inflamatória de compostos de coordenação .....	34
2. Objetivos.....	39
3.1 Objetivo geral.....	39
3.2 Objetivos específicos .....	39
3. Material e Métodos .....	40
4.1 Síntese das moléculas orgânicas e dos compostos de coordenação.....	40
4.1.2 Síntese dos pré-ligantes hpclnol e salen .....	40
4.1.3 Síntese dos compostos de coordenação.....	41
4.2. Caracterização dos ligantes e compostos de coordenação .....	41
4.3 Atividade <i>in vitro</i> dos compostos de coordenação .....	42
4.3.1 Avaliação da viabilidade celular – ensaio de MTT.....	42
4.3.2 Investigação da atividade antioxidante em modelos <i>in vitro</i> de estresse oxidativo.....	43
4.3.2.1 Inibição da produção de ERs.....	44
4.3.2.2 Inibição da produção de NOx.....	45
4.3.3 Estudo do efeito protetor - Sobrevivência das células de <i>S. cerevisiae</i> ...	46
4.3.6 Inibição da oxidação de lipídios – ensaio de TBARS.....	47
4.10 Investigação da captura de ERs em reações <i>in situ</i> .....	48
4.11 Simulações dos espectros de EPR.....	50
4.12 Efeito dos compostos de coordenação na respiração celular .....	51
4.13 Efeito dos compostos da série hp em edema de pata de camundongo.....	51
4.14 Análise estatística.....	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	53
5.1 Síntese e caracterização .....	53
5.2 Estudo de viabilidade celular (citotoxicidade).....	58
5.3 Avaliação da inibição da geração ERs <i>in vitro</i> .....	59
5.4 Efeito dos compostos de coordenação na sobrevivência de <i>S. cerevisiae in vivo</i> .....	62

5.5 Avaliação da atividade dos compostos de coordenação na redução do dano oxidativo: monitoramento da LPO <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i> .....	65
5.6 Investigação e propostas de mecanismo de ação antioxidante apresentados pelos compostos de coordenação da série hp.....	68
<b>5.6.1.</b> Interação dos compostos de coordenação da série hp e EUK8 com o $O_2^{\cdot-}$ .....	68
<b>5.6.2.</b> Interação dos compostos de coordenação da série hp e EUK8 com $H_2O_2$ .....	73
<b>5.6.3.</b> Interação dos compostos de coordenação da série hp e EUK8 com o $\cdot OH$ .....	76
5.7. Efeito dos compostos de coordenação na disfunção mitocondrial induzida por rotenona em células C6.....	79
5.8. Efeitos dos compostos de coordenação na inibição da progressão do edema de pata induzida por carragenina em camundongos <i>swiss</i> .....	82
5.9. RESULTADOS ADICIONAIS .....	86
5. CONCLUSÃO .....	89
6. Perspectivas futuras .....	90
7. Referências.....	91
8. Apêndices.....	108



## 1. INTRODUÇÃO

O termo "espécies reativas" (ERs) refere-se a um grupo de moléculas, íons ou espécies radicais (moléculas que possuem elétrons desemparelhados) com elétrons em seu orbital molecular de maior energia (HOMO, do inglês High Occupied Molecular Orbit) em um estado de alta energia, tornando-se assim altamente instáveis e reativas.<sup>1,2</sup> O ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxil ( $\cdot OH$ ), óxido nítrico (NO), peróxido nitrito ( $ONOO^-$ ), são exemplos dessas espécies.<sup>3,4</sup> Os diagramas de orbital molecular das ERs  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$  e NO estão apresentados na Figura 1.



**Figura 1.** Representação esquemática dos diagramas de orbital molecular, considerando as interações covalentes entre os orbitais atômicos 2p, para as moléculas diatômicas  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$  e NO. Em vermelho, estão destacados os elétrons nos orbitais HOMO.<sup>5</sup>

As ERs são geradas no organismo em quantidades limitadas e são necessários para manter a homeostase celular, para a transdução de sinais, expressão gênica, ativação de receptores, reconhecimento de patógenos, garantindo a viabilidade celular, proliferação, migração, diferenciação.<sup>6,7</sup> Assim, as ERs atuam como moléculas de sinalização por meio de alterações redox reversíveis em enzimas que controlam processos celulares, como a S-nitrosilação da caspase-3, que controla a apoptose.<sup>8,9</sup>

De modo geral, a cadeia respiratória mitocondrial é uma das principais fontes de ERs celulares.<sup>10</sup> As mitocôndrias são organelas celulares que, entre suas variadas funções, são responsáveis pela produção de energia por meio da fosforilação oxidativa. A síntese de adenosina trifosfato (ATP; a principal molécula carreadora da energia química utilizada nas mais diversas reações que ocorrem nas células) produz ERs durante o metabolismo normal do oxigênio.<sup>11</sup> Durante esse processo, os elétrons são carreados pela cadeia transportadora de elétrons, localizadas na membrana interna das mitocondriais, até o oxigênio molecular, que atua como receptor final de elétrons,

levando a formação de água metabólica ( $O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$ ).<sup>12,13</sup> Entretanto, uma pequena parte desse oxigênio molecular é reduzido de forma incompleta formando ERs, principalmente o  $O_2^{\bullet-}$  ( $O_2 + 1e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$ ) e o  $H_2O_2$  ( $O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O_2$ ), as quais são necessárias para funções fisiológicas, como sinalização celular, defesa contra patógenos, cicatrização de feridas, dentre muitas outras funções.<sup>14,15</sup>

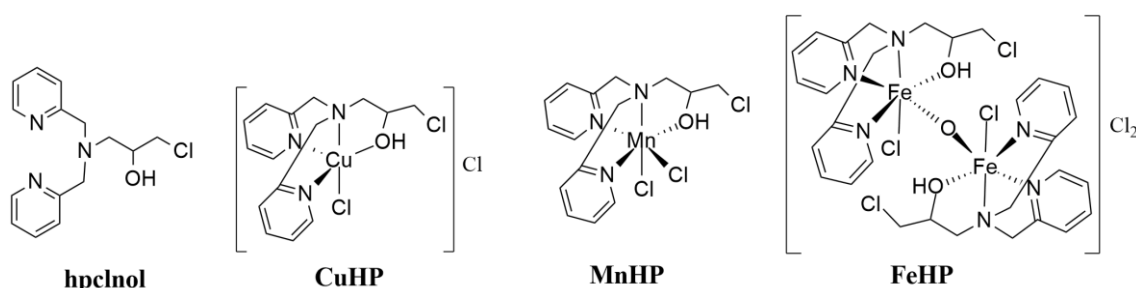
Para controlar o nível de ERs geradas nesse processo, as mitocôndrias possuem sistema antioxidante que converte essas espécies em moléculas menos reativas.<sup>16</sup> No entanto, conforme envelhecemos, a eficácia do sistema antioxidante diminui, levando ao acúmulo de ERs e danos em biomoléculas de forma progressiva. Isso leva a uma menor eficiência na produção de ATP, disfunção mitocondrial e inflamação crônica, os quais contribuem para o desenvolvimento de doenças promovidas pelo estresse oxidativo.<sup>17-20</sup>

O emprego de antioxidantes como moduladores do estresse oxidativo tem sido extensivamente investigado.<sup>21-25</sup> Antioxidantes são entidades químicas que podem receber ou doar prótons e/ou elétrons para ERs, transformando-as em moléculas menos reativas. Nesse sentido, os antioxidantes surgem como agentes promissores na modulação da homeostase redox, minimizando o estresse oxidativo e seus efeitos danosos.<sup>26-28</sup> Pode-se citar como exemplo as metaloenzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), que atuam na defesa antioxidante celular frente ao estresse oxidativo e por converter as ERs  $H_2O_2$  e  $O_2^{\bullet-}$  em moléculas menos reativas.<sup>29</sup>

Compostos de coordenação (compostos que contém uma fração orgânica denominada base de Lewis, coordenada à um centro metálico denominado como ácido de Lewis) miméticos funcionais às enzimas antioxidantes endógenas, como a SOD<sup>30</sup> e a CAT<sup>31</sup>, têm se mostrado promissores no campo das terapias destinadas a modular o estresse oxidativo. Uma das vantagens mais significativas desses compostos consiste na capacidade de se regenerar após interagir com as ERs.<sup>32,33</sup> Essa característica permite que tais compostos atuem de maneira catalítica, mesmo quando administrados em doses mais baixas, o que é altamente desejável do ponto de vista terapêutico, devido à diminuição dos potenciais efeitos adversos.

Os compostos de coordenação de  $Cu^{II}$ ,  $Fe^{III}$  e  $Mn^{II}$  contendo o ligante 1-bispiridina-2-ilmetilamina-3-cloropropan-2-ol (hpclnol ou hp), representados na Figura 2 são miméticos funcionais às enzimas SOD e CAT.<sup>34</sup> Esses compostos apresentam atividades catalíticas intrínsecas que permitem a remoção do excesso de ERs, como  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$ .<sup>35,36</sup> Além disso, esses compostos aumentaram a expectativa de vida de células

de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) submetidas ao envelhecimento cronológico.<sup>37</sup> Presume-se que esse efeito seja resultado da remoção do excesso de ERs gerado durante o processo de envelhecimento, aliviando as reações do ciclo redox intracelular.<sup>37</sup> Esse estudo demonstrou, portanto, o potencial desses compostos no combate ao estresse oxidativo, empregando-se o modelo de envelhecimento cronológico. No entanto, investigações relacionadas à função mitocondrial não foram possíveis, uma vez que as células de *S. cerevisiae* foram estudadas na fase fermentativa, na qual as mitocôndrias estão metabolicamente inativas (em estado de dormência).<sup>34</sup>



**Figura 2.** Estrutura do ligante hpclnol e dos respectivos compostos de coordenação de  $\text{Cu}^{\text{II}}$ ,  $\text{Fe}^{\text{III}}$  e  $\text{Mn}^{\text{II}}$ .<sup>34,38,39</sup>

Apesar dos avanços significativos nos estudos sobre a atividade antioxidante da série hp,<sup>34,37,40</sup> há ainda questões a serem investigadas, visando esclarecer o modo de interação desses compostos de coordenação com as ERs. Além disso, é essencial compreender melhor a relação desses compostos com a função mitocondrial e determinar se os efeitos biológicos observados serão mantidos em modelos *in vivo* de estresse oxidativo. Essas investigações adicionais contribuirão para um entendimento mais abrangente do potencial terapêutico dos compostos da série hp e sua viabilidade como agentes antioxidantes em contextos fisiológicos mais complexos.

Nesse sentido, a estratégia desse trabalho baseou-se na execução de estudos *in vitro* empregando-se células da linhagem astrogliar C6, estudos *ex vivo* empregando-se preparações de fígado de camundongo *swiss* e estudos *in vivo* em camundongo *swiss*, empregando-se compostos de coordenação já investigados pelo nosso grupo de pesquisa.

Diante do exposto, a hipótese desse trabalho é que os compostos da série hp conseguem garantir a homeostase redox em sistemas biológicos submetidos a condições de estresse oxidativo e inflamação. Esses efeitos podem estar atrelados à interação dos

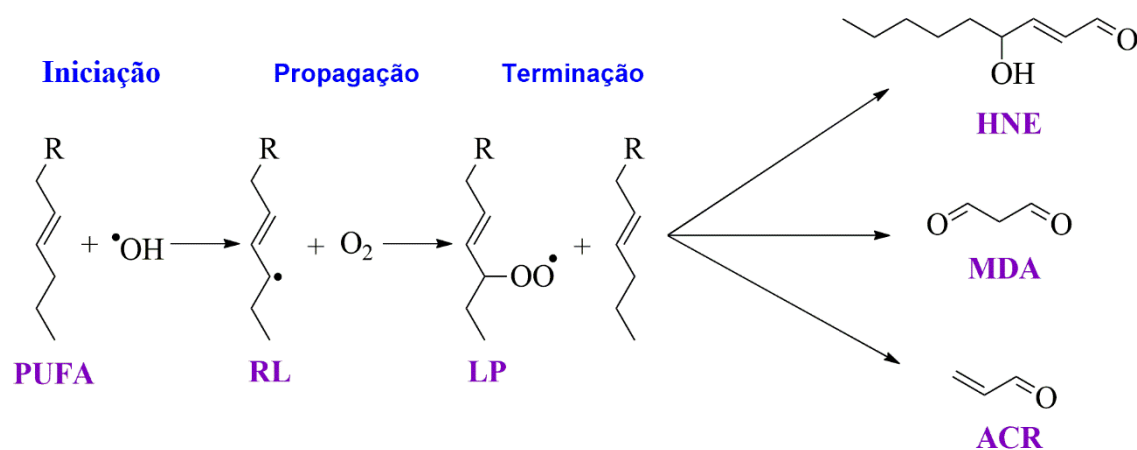
compostos da série hp com as ERs geradas nesses modelos, impactando positivamente na homeostase do metabolismo redox desses sistemas e na função mitocondrial.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Estresse oxidativo, danos oxidativos às biomoléculas e doenças relacionadas

O estresse oxidativo, entendido como "uma perturbação no equilíbrio pró-oxidante - antioxidante em favor do primeiro", foi redefinido como uma "interrupção na sinalização redox e no controle e/ou dano molecular"<sup>41-43</sup>. Assim, o estresse oxidativo é uma condição em que há o aumento excessivo de ERs, corroborado por uma defesa antioxidante insuficiente, levando a diversas alterações estruturais e funcionais em biomoléculas. Entretanto, esse conceito evoluiu desde a sua definição inicial em 1985. Atualmente, o estresse oxidativo pode ser caracterizado pela sua intensidade como estresse oxidativo fisiológico (eustresse) ou estresse oxidativo tóxico, alterando biomoléculas (distresse): uma baixa exposição de células e organismos é necessária para a sinalização redox, direcionada a alvos específicos, enquanto uma exposição elevada resulta na interrupção da sinalização redox e/ou deterioração, atingindo alvos não específicos.<sup>44-46</sup>

O acúmulo de danos em biomoléculas é resultante de uma variedade de processos, os quais podem ser de origem tanto externa quanto interna ao organismo.<sup>47</sup> Em geral, esses danos advêm de reações de oxidação que afetam as biomoléculas, comprometendo-lhes a integridade estrutural e funcional. Dentre essas reações, destaca-se a peroxidação lipídica (LPO, do inglês "*Lipid Peroxidation*"), responsável pela formação de peroxilipídios.<sup>48-50</sup> A peroxidação de lipídios segue uma progressão em três fases distintas (iniciação, propagação e terminação), conforme esquematizado na Figura 3, sendo intermediada pela formação de radicais capazes de alterar a estrutura e função das membranas celulares e dos receptores a elas associados.<sup>51,52</sup>



**Figura 3.** Representação dos processos da peroxidação lipídica. Na figura, PUFA = Ácidos Graxos Poli-Insaturados; RL = lipídio radicalar; LP = peroxilipídio; HNE - 4-hidroxinonenal; MDA = malondialdeído, ACR = acrilamida.<sup>53</sup>

Os danos oxidativos oriundos da superprodução de ERs estão intimamente relacionados ao desenvolvimento de diversas doenças. Além disso, o estresse oxidativo pode desencadear e perpetuar a inflamação crônica.<sup>54,55</sup> Quantidades moderadas de ERs promovem sinalização de estresse e contribuem para mutações, favorecendo assim o desenvolvimento do câncer.<sup>56</sup> A produção de ERs mitocondriais ativa a sinalização redox celular ligada às respostas proliferativas. A ativação de fatores de transcrição, como os HIFs (fator induzível pela hipóxia), pode promover a tumorigênese. Foi constatado que o DNA mitocondrial pode ser prejudicado por ERs, e as mutações resultantes foram encontradas regulando o fenótipo tumorigênico.<sup>57</sup> ERs também estão envolvidas na isquemia crônica e na lesão de reperfusão isquêmica (IRI), uma característica importante de doenças cardiovasculares como acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio e doença arterial periférica.<sup>58-62</sup> Durante a lesão de reperfusão isquêmica, o desacoplamento da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) devido ao aumento do estresse oxidativo e à hipóxia resulta na formação de ERs em vez de NO, sendo este último um mediador da vasodilatação, dotado de propriedades antiproliferativas em condições fisiológicas. Portanto, a menor disponibilidade de NO e o aumento das quantidades de  $O_2^{\cdot-}$  e  $ONOO^-$  resultam em danos celulares e comprometem a função vascular.<sup>63-65</sup>

A ocorrência de estresse oxidativo na doença de Alzheimer (DA) e seu papel na neurodegeneração são amplamente documentados. A DA é caracterizada por depósitos extracelulares de beta-amiloides (nas placas neuríticas) e emaranhados neurofibrilares intracelulares (filamentos helicoidais emparelhados). Além disso, a hiperfosforilação da proteína Tau também é uma característica distintiva da DA.<sup>66</sup> O mau funcionamento mitocondrial resulta em elevados níveis de ERs, contribuindo para a formação de agregados da proteína Tau. O 4-hidroxinonenal, produto reconhecido da LPO, pode induzir alterações na conformação da proteína Tau, favorecendo a ocorrência de emaranhados neurofibrilares, o que sustenta o envolvimento do estresse oxidativo induzido por  $\beta$ -amiloide na patogênese do Alzheimer.<sup>67,68</sup> Foi sugerido que o estresse oxidativo também desempenha um papel fundamental na doença de Parkinson.<sup>69,70</sup> Embora os mecanismos que subjazem à fisiopatologia da doença de Parkinson não estejam completamente elucidados, uma série de estudos relatam que a inflamação e o estresse oxidativo desempenham papéis críticos na degeneração de neurônios dopaminérgicos.<sup>71</sup> A investigação do papel do estresse oxidativo na neurotoxicidade dopaminérgica revela que deficiências no complexo proteico I da

cadeia respiratória são responsáveis pela degeneração neuronal. A presença de neurotoxinas, inseticidas, pesticidas e dopamina, bem como mutações genéticas em proteínas associadas à doença de Parkinson, contribuem para a disfunção mitocondrial, anterior à ocorrência de ERs.<sup>72</sup> A inibição do complexo proteico I abrange o aumento do estresse oxidativo e a diminuição da síntese de ATP, o que leva ao dano de biocomponentes essenciais e à morte celular.<sup>73</sup>

O estresse oxidativo está intrinsicamente relacionado à diabetes, pois pode desencadear resistência à insulina, principalmente a nível endotelial.<sup>74</sup> O aumento de marcadores de estresse oxidativo está diretamente associado à redução da ativação do receptor de insulina. A oxidação intensificada de ácidos graxos livres em células endoteliais aumenta a produção de  $O_2^{\cdot-}$  pela cadeia de transporte de elétrons (CTE) mitocondrial, promovendo resistência na sinalização da insulina.<sup>75-77</sup> Além disso, as espécies reativas de oxigênio (EROs) e o estresse oxidativo têm a capacidade de ativar múltiplas cascatas de cinases de serina, interrompendo a cascata de sinalização do receptor de insulina. Por outro lado, níveis elevados de insulina podem intensificar a produção de espécies reativas de oxigênio e o estresse oxidativo, acelerando a resistência à insulina.<sup>78</sup>

Outros estudos também sugerem a participação do estresse oxidativo no início e progressão do declínio articular na artrite reumatoide.<sup>79,80</sup> Pacientes com artrite reumatoide apresentam níveis aumentados de ERs e menor capacidade antioxidante, quando comparados a controles. As amostras de fluido sinovial e sangue têm um maior grau de LPO e menor potencial antioxidante e os níveis séricos de malondialdeído (MDA, produto da LPO) estão positivamente correlacionados com citocinas pró-inflamatórias.<sup>80,81</sup>

O estresse oxidativo foi identificado como uma das principais causas de danos renais. As consequências confirmadas do estresse oxidativo incluem isquemia renal, lesões glomerulares, morte celular e apoptose, bem como o agravamento da inflamação já presente.<sup>82,83</sup> Além disso, uma série de condições patológicas que representam fatores de risco para doença renal crônica (hipertensão, diabetes e aterosclerose) são causadas pela deterioração oxidativa.<sup>84,85</sup> Em pacientes com doença renal crônica, foi observada a regulação negativa da SOD2 nos neutrófilos devido ao estresse, levando a uma geração aumentada de ERs causada pela disfunção dos neutrófilos.<sup>86</sup>

## 2.2 O papel dos antioxidantes na modulação do estresse oxidativo

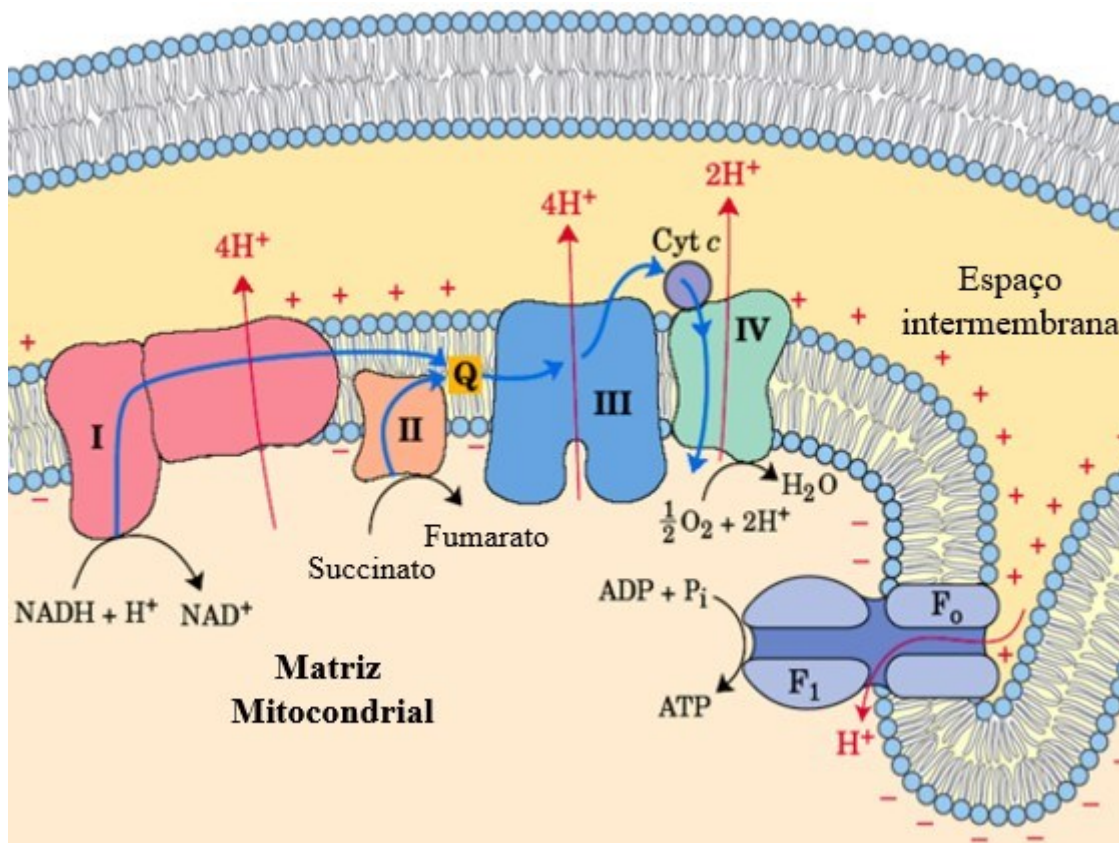
O termo antioxidante se refere a um composto capaz de impedir ou retardar a oxidação de substratos, atuando em uma concentração menor em comparação com a do substrato protegido.<sup>87</sup> Funções antioxidantes implicam na redução do estresse oxidativo, das mutações no DNA, das transformações malignas, bem como outros parâmetros de danos oxidativos que garantem a homeostase redox celular.<sup>88</sup> Assim, a homeostase redox da célula é assegurada pelo seu sistema endógeno de defesa antioxidante, que inclui enzimas antioxidantes como a SOD, CAT, glutathione peroxidase (GPx), e compostos não-enzimáticos como glutathione (GSH), proteínas (ferritina, transferrina, ceruloplasmina, e até mesmo albumina) e agentes de baixo peso molecular, como ácido úrico, coenzima Q e ácido lipóico.<sup>89,90</sup> Antioxidantes exógenos também desempenham o papel de modular o estresse oxidativo. Antioxidantes exógenos presentes em frutas e vegetais sempre complementam a atividade da defesa antioxidante endógena mencionada anteriormente. Antioxidantes como a vitamina C e E, carotenoides e fenólicos, são atualmente considerados os principais antioxidantes exógenos.<sup>91,92</sup>

A geração predominante de ERs ocorre durante a fosforilação oxidativa, etapa que se realiza na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial.<sup>93-95</sup> Quando respiramos, o ar atmosférico entra nos pulmões através das vias respiratórias, chega aos alvéolos e o oxigênio molecular se liga à deoxi-hemoglobina (transportadora de oxigênio molecular) presente no sangue. O sangue oxigenado é então bombeado pelo coração para os tecidos do corpo, onde ocorre a difusão do oxigênio.<sup>96,97</sup> Dentro das células, o oxigênio é utilizado pela mitocôndria, a organela responsável pela produção de energia através da respiração celular aeróbica, completando assim o caminho do oxigênio até a mitocôndria.<sup>98</sup>

Estima-se que aproximadamente 90% do oxigênio consumido pelo organismo é utilizado pela mitocôndria para a produção de ATP durante o processo de fosforilação oxidativa.<sup>98,99</sup> Os substratos orgânicos, como os ácidos graxos e os produtos finais do metabolismo da glicose (piruvato e NADH - dinucleotídeo adenina com nicotinamida reduzido), desempenham um papel crucial nesse processo, fornecendo elétrons para a CTE, localizada na membrana mitocondrial interna. Assim, os elétrons transitam nos complexos proteicos mitocondriais I, II, III e IV e o oxigênio molecular atua como acceptor final de elétrons, no complexo IV, sendo reduzido e resultando na formação de água metabólica.<sup>100-102</sup> Entretanto, aproximadamente 2% do oxigênio molecular consumido pelas mitocôndrias, são reduzidos em  $O_2^{\bullet-}$ , que são necessários, em



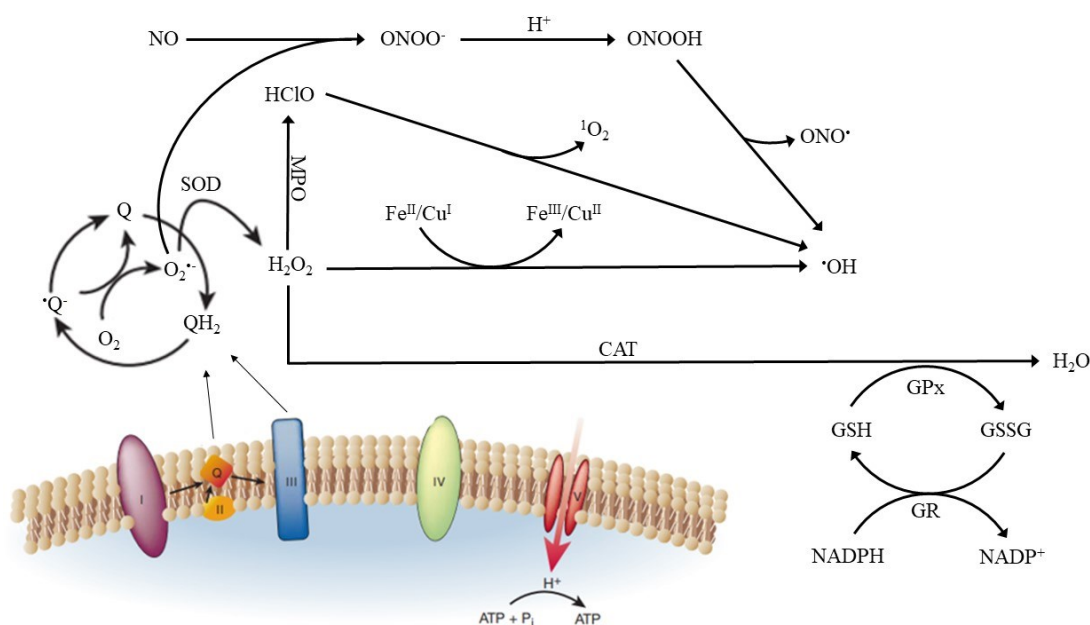
concentrações adequadas, para sinalização redox e outros processos bioquímicos.<sup>103</sup> O fluxo de elétrons é acompanhado pela transferência de  $H^+$  através da membrana interna mitocondrial nos complexos proteicos, criando um gradiente eletroquímico. Os  $H^+$  reentram na matriz mitocondrial através do complexo V, que usa a força motriz do gradiente de  $H^+$  para gerar adenosina trifosfato. A Figura 4 ilustra o processo da síntese de ATP por meio do processo de fosforilação oxidativa.



**Figura 4.** Representação do processo de fosforilação oxidativa. Os complexos proteicos estão dispostos na membrana mitocondrial interna. Os substratos orgânicos fornecem elétrons para os complexos a partir da matriz mitocondrial. Os elétrons transitam entre os complexos I ao IV até interagir com o oxigênio molecular, formando água metabólica. Os prótons, provenientes dos substratos, são bombardeados para o espaço entre as membranas interna e externa, gerando uma diferença de potencial (ddp) entre -120 a -180 mV. Essa ddp é utilizada para rotacionar o fragmento  $F_1$  do complexo V e essa energia mecânica é responsável por transformar ADP, na presença de um grupo fosfato, em ATP.<sup>104,105</sup>

Durante esse processo, ocorre a produção de ERs necessárias para a manutenção dos processos fisiológicos. *Clusters* de ferro-enxofre são considerados o local mais provável de produção de ERs no complexo proteico I.<sup>106–109</sup> No complexo proteico III, a produção de  $O_2^{\cdot-}$  ocorre por meio da transferência de elétrons da ubiquinona reduzida ( $Q^{\cdot-}$ ) para o oxigênio molecular.<sup>110–112</sup> Uma vez gerado, o  $O_2^{\cdot-}$  pode ser dismutado pela enzima SOD em  $H_2O_2$ , o qual é menos reativo e difusível na membrana.<sup>113–119</sup> Posteriormente, o peróxido de hidrogênio pode sofrer diferentes

reações, sendo que (i) na presença de íons de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  ou  $\text{Cu}^{\text{I}}$ , o  $\text{H}_2\text{O}_2$  passa por um processo de clivagem homo ou heterolítica, levando a formação do radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ) e do ânion hidroxila ( $^-\text{OH}$ );<sup>120,121</sup> (ii) na presença da enzima CAT ou da glutatona reduzida (GSH), o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é degradado em oxigênio molecular e água;<sup>122,123</sup> e (iii) na presença da enzima mieloperoxidase (MPO), o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é transformado em  $\text{HClO}$ .<sup>124-126</sup> Paralelamente a esse ciclo, o óxido nítrico (NO) também pode interagir com o  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , formando a espécie reativa peroxonitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) que, na presença de  $\text{H}^+$  pode ser clivada em  $\text{ONO}^\cdot$  e  $\cdot\text{OH}$ .<sup>127,128</sup> A Figura 5 apresenta de forma sistemática algumas equações de reações químicas que ocorre no sistema antioxidante.



**Figura 5.** Principais espécies reativas de oxigênio,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e seus locais subcelulares de geração.<sup>129</sup>

Esse sistema redox é regulado por vários fatores e enzimas que atuam, principalmente, sobre duas espécies reativas:  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Essas espécies reativas desempenham importantes papéis de sinalização fisiológica, mediando processos celulares essenciais e são normalmente mantidos em baixas concentrações ( $10^{-11}$  a  $10^{-8}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ).<sup>130,131</sup> Quando essas concentrações excedem os níveis fisiológicos, a especificidade da sinalização fica comprometida, o que pode levar a danos oxidativos em macromoléculas. As mitocôndrias, como alvo inicial desses danos oxidativos, desempenham um papel fundamental na manutenção da homeostase do estresse oxidativo. Assim, a disfunção mitocondrial contribui para o processo de

envelhecimento, interferências na sinalização apoptótica e o desencadeamento de respostas inflamatórias.<sup>132,133</sup>

Em uma condição de estresse oxidativo, o sistema antioxidante não é suficientemente eficaz para lidar com a grande produção de ERs. Estratégias para combater eventos oxidativos prejudiciais nas células e preservar a integridade mitocondrial, aumentando as defesas antioxidantes celulares, estão surgindo como abordagens terapêuticas promissoras para prevenir o desenvolvimento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Nesse cenário, vários compostos de coordenação têm sido sintetizados e estudados ao longo dos anos com o objetivo de imitar função de enzimas antioxidantes, como a SOD e a CAT.

Compostos de coordenação do tipo Mn–salen, miméticos funcionais da enzima SOD, foram capazes de aumentar a expectativa de vida dos nematoides *Caenorhabditis elegans* (animais cilíndricos, alongados e não segmentados) em valores superiores de 50% com concentrações variando entre 0,5 – 10 mmol L<sup>-1</sup>.<sup>117</sup> Compostos da série EUK contendo centros de Mn<sup>II</sup> (EUK-8 e EUK-134) também mostraram atividades antioxidantes potencialmente geroprotetoras (antienvelhecimento), a qual foi atrelada a interação com as ERs.<sup>134</sup> Os mecanismos envolvidos na neutralização das ERs pelos compostos EUK-8 EUK-134 indicam que, quando compostos são expostos a OCl<sup>-</sup> ou ONOO<sup>-</sup>, são oxidados para Mn<sup>VO</sup><sup>2-</sup>. O oxomanganês(V) interage com o NO, oxidando-o a espécies mais benéficas, como NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. As diferenças estruturais entre os compostos EUK-8 e EUK-134 não influenciam na formação do intermediário oxomanganês(V) e suas atividades correlatas.<sup>135</sup> No entanto, estudos de estrutura-atividade (bioisosterismo), que envolveram a introdução de substituintes de anel e a alteração da ponte etano por uma ponte aromática, revelaram mudanças significativas na atividade catalase.<sup>136</sup> A atividade da catalase é aumentada por substituintes alcoxi na posição orto ou para, e reduzida por substituição na posição meta. O intermediário de alta valência [(salen)Mn<sup>V</sup>=O] é estabilizado por substituintes doadores de elétrons, e desestabilizado por substituintes retiradores de elétrons. O acetato ou o cloreto são geralmente selecionados como ligantes axiais que afetam a solubilidade, mas não afetam a atividade biológica.<sup>137,138</sup>

Os avanços na química bioinorgânica têm desempenhado papel significativo na melhoria do *design* estrutural de compostos e na compreensão de seus mecanismos de ação, visando reduzir os efeitos colaterais.<sup>139,140</sup> Nesse contexto, novas estruturas de compostos de coordenação têm sido propostas com o intuito de ampliar a variedade de

agentes antioxidantes em sistemas biológicos.<sup>140</sup> Uma classe muito comum desses compostos de coordenação é representada pelos "anti-inflamatórios não esteroides" (NSAIDs, do inglês "Non-steroidal Anti-Inflammatory Drugs").

A atividade de captura dos radicais hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ) exercida pelos compostos  $\text{Cu}^{\text{II}}$ - $\text{Zn}^{\text{II}}$ -NSAID foram investigadas por meio de técnicas espectroscópicas e comparadas com o composto de referência 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (trolox), um análogo da vitamina E. Observou-se que a maioria dos compostos exibiu maior atividade na captura de  $\cdot\text{OH}$  em relação ao trolox ( $\cdot\text{OH}\% = 82,8\%$ ) e ao pré-ligante correspondente. Entre os complexos  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -NSAID, destacaram-se os compostos  $[\text{Cu}(\text{mef})_2(\text{phen})]$  ( $\cdot\text{OH}\% = 99,7\%$ ),<sup>141</sup>  $[\text{Cu}_2(\text{indo})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  ( $\text{OH}\% = 97,4\%$ )<sup>142</sup> e  $[\text{Cu}_2(\text{keto})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  ( $\cdot\text{OH}\% = 97,3\%$ ).<sup>143</sup> No caso dos complexos  $\text{Zn}^{\text{II}}$ -NSAID, os três mais ativos contra os radicais hidroxil foram o  $[\text{Zn}(\text{mef})_2(\text{Hpko})_2]$  ( $\cdot\text{OH}\% = 98,4\%$ ),<sup>144</sup>  $[\text{Zn}(\text{mef})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$  ( $\cdot\text{OH}\% = 96,7\%$ )<sup>144</sup> e  $[\text{Zn}_3(\text{tolf})_6(\text{MeOH})_2]$  ( $\cdot\text{OH}\% = 96,4\%$ ).<sup>145</sup> Apesar dos resultados promissores, uma proposta de mecanismo entre os compostos e o  $\cdot\text{OH}$  não foi elaborada.

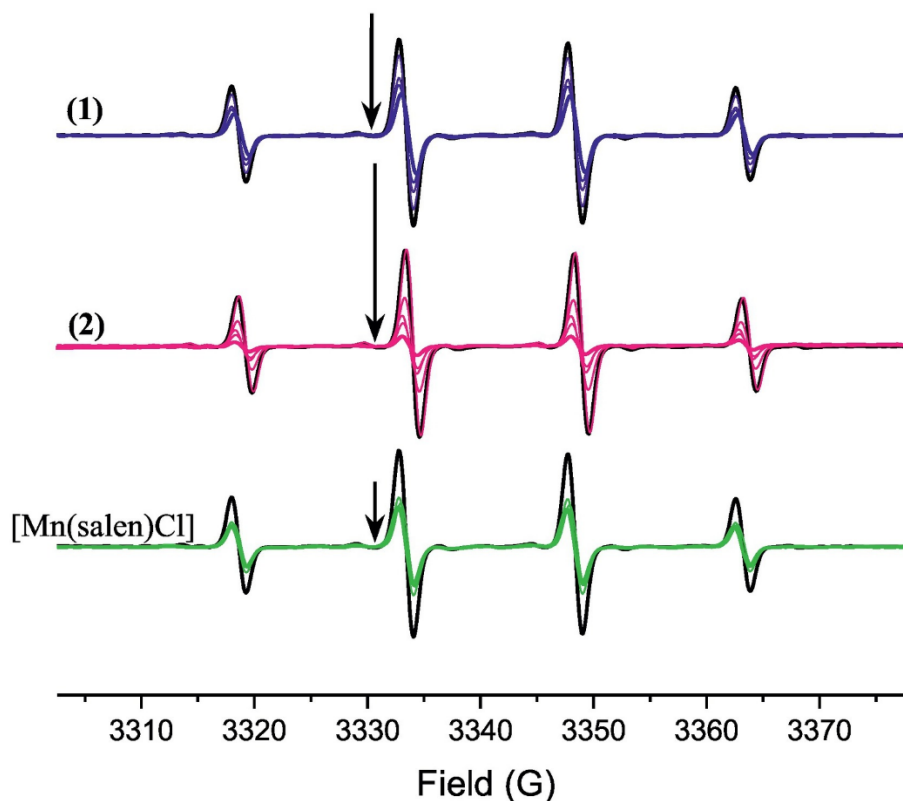
O  $\cdot\text{OH}$  é definido como a forma neutra do  $\cdot\text{OH}$  e é altamente reativo.<sup>146</sup> Assim como as ER, eles podem reagir de forma agressiva com moléculas orgânicas e inorgânicas e causar danos mais graves à célula do que qualquer outra ER, pois não existe enzima específica para estabelecer níveis adequados desse radical em sistemas biológicos.<sup>146</sup> O  $\cdot\text{OH}$  pode ser produzido na reação de Fenton ( $\text{Fe}^{\text{II}} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}} + \cdot\text{OH} + \cdot\text{OH}$ ), frequentemente coordenados a diferentes proteínas, como resultado das interações entre  $\text{H}_2\text{O}_2$  e íons metálicos ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ ,  $\text{Cu}^{\text{I}}$ ,  $\text{Cu}^{\text{II}}$  ou  $\text{Cu}^{\text{III}}$ ), frequentemente coordenados com diferentes proteínas, como ferritina ou ceruloplasmina. O radical  $\cdot\text{OH}$  também pode ser gerado pela reação de Haber-Weiss, envolvendo interações entre ERs ( $\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \cdot\text{OH} + \cdot\text{OH}$ ).<sup>120,147-149</sup> Outras fontes de  $\cdot\text{OH}$  também são conhecidas, como reações com ácido hipocloroso, quinonas e semiquinonas.<sup>150</sup> Os  $\cdot\text{OH}$  são capazes de reduzir ligações dissulfeto em proteínas, especialmente a fibrinogênio, resultando em seu desdobramento e redobramento desordenado e configurações espaciais anormais. As consequências de tais reações podem se traduzir em inúmeros distúrbios, como doenças inflamatórias crônicas, lesão por isquemia e perfusão, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, artrite reumatoide e doença inflamatória intestinal, mostrando uma relação mutuamente sinérgica entre inflamação e ERs.<sup>150,151</sup>

A maioria das ERs são paramagnéticas e podem ser detectadas e quantificadas por Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR, do inglês "*Electronic Paramagnetic*

*Ressonance*”).<sup>152,153</sup> Essa é uma técnica espectroscópica de alta sensibilidade utilizada para investigar os estados eletrônicos de espécies paramagnéticas, como átomos ou moléculas que possuem elétrons desemparelhados. O EPR envolve a interação dos elétrons com campo magnético externo estático. Essa interação entre o(s) elétron(s) não emparelhado(s) e o campo magnético aplicado é descrita pelos valores *g*. Além disso, há a interação entre os dipolos magnéticos dos elétrons não emparelhados e os núcleos circundantes (tipicamente dentro de 5 Å, por exemplo, <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>14</sup>N, <sup>31</sup>P, <sup>51</sup>V, <sup>63,65</sup>Cu), resultando em um acoplamento hiperfino (A).<sup>154,155</sup>

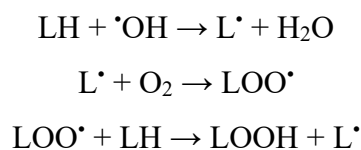
Em particular, o radical <sup>•</sup>OH tem um tempo de meia-vida muito baixo, o que dificulta sua detecção por EPR. Assim, faz-se necessário o emprego de *spin trap* para formar uma espécie paramagnética mais estável e detectável por EPR (aduto). O <sup>•</sup>OH, na presença do *spin trap* 5,5-Dimetil-1-pirrolidina N-óxido (DMPO) apresenta no espectro de EPR um conjunto de quatro linhas com uma proporção de intensidade de 1:2:2:1.<sup>156,157</sup> Essas linhas são resultantes das interações de um elétron desacoplado com um átomo de nitrogênio primário, juntamente com um próton β secundário do DMPO (Figura 6).

Dados prévios do nosso grupo mostram que a capacidade dos compostos [Mn(N<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]Cl (**1**), [Mn(N<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sub>n</sub>ClO<sub>4</sub> (**2**) e do EUK-8 ou [Mn(salen)Cl], em capturar o radical <sup>•</sup>OH foi avaliada pela técnica de EPR com o emprego do *spin trap* DMPO.<sup>158</sup> O radical foi gerado *in situ* por meio da reação de Fenton e os valores da capacidade de capturar 50 % dos radicais (CNR<sub>50</sub>) foi calculada por meio da regressão linear. Os valores de CNR<sub>50</sub> obtidos foram 15,5 (±1,8), 7,2 (±1,6) e 29,1 (±2,01) μmol L<sup>-1</sup>, para [Mn(N<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]Cl (**1**), [Mn(N<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sub>n</sub>ClO<sub>4</sub> (**2**) e EUK-8 ou [Mn(salen)Cl], respectivamente.



**Figura 6.** Espectros EPR do aduto DMPO-•OH (linha preta) e titulação com concentrações crescentes de: complexo (1) (linha azul), complexo (2) (linha rosa) e [Mn(salen)Cl] (linha verde).<sup>158</sup>

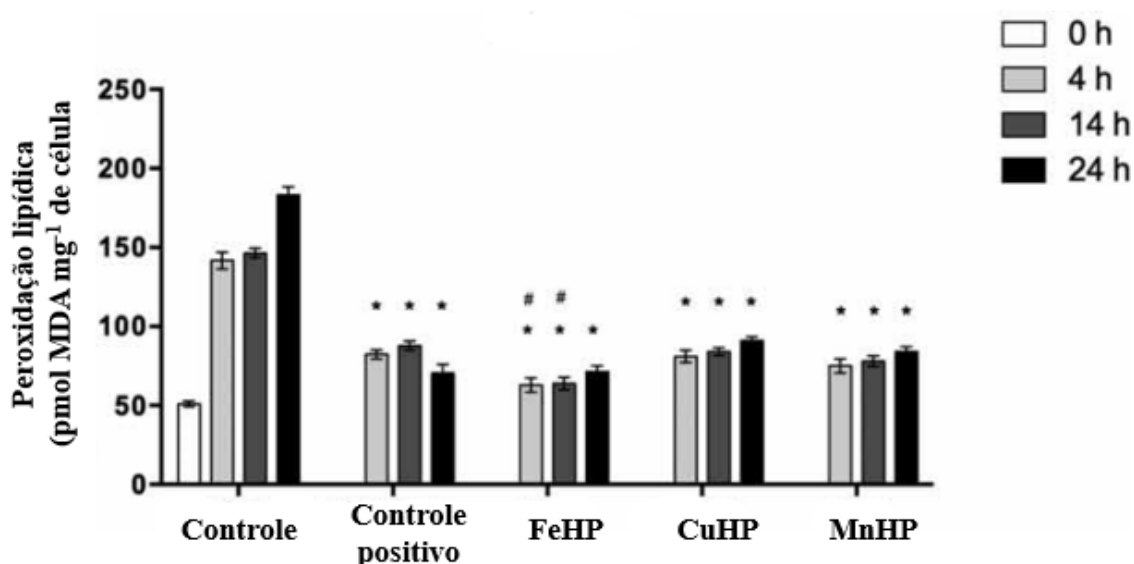
Além da capturar das ERs, é necessário avaliar se os danos oxidativos também foram mitigados. O radical hidroxil, por exemplo, por ser um potente agente oxidante, representa um perigo imediato para a integridade estrutural e a função das biomoléculas e, conseqüentemente, para as células.<sup>158</sup> A reação em cadeia de oxidação lipídica pode ser iniciada da seguinte forma:



onde LH é um lipídio reduzido, L• é uma espécie radicalar de lipídio, LOO• é um lipídio hidroperóxido, que pode estar presente em ácidos graxos poli-insaturados.<sup>159</sup>

Os compostos da série hp demonstraram a habilidade de inibir a peroxidação lipídica em um modelo de envelhecimento cronológico de *S. cerevisiae*.<sup>37</sup> A indagação central focou-se na possibilidade de que o efeito antienvhecimento pudesse estar associado à redução dos biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo, à oxidação

de lipídeos e às alterações proteicas. Os resultados prévios obtidos pelo nosso grupo (conforme ilustrado na Figura 7) evidenciou um aumento substancial nos níveis de lipoperóxidos nas células de *S. cerevisiae* em um modelo de envelhecimento cronológico. De forma previsível, tanto o tratamento com trealose quanto o choque térmico (empregados como controles positivos) resultaram em uma redução notável na peroxidação lipídica. Os compostos de coordenação avaliados, pertencentes à série hp, também reduziram os níveis de lipoperóxidos observados nas células envelhecidas com uma atividade estatisticamente semelhante ao do controle positivo. Considerando que a peroxidação lipídica pode afetar a integridade da membrana, pode-se propor uma relação entre decréscimo nos níveis de peroxidação lipídica e integridade da membrana, tornando as células menos susceptíveis aos danos oxidativos.<sup>37</sup>



**Figura 7.** Efeito dos miméticos de SOD/CAT na peroxidação lipídica em células envelhecidas de forma cronológica. Os níveis de peroxidação lipídica foram determinados por quantificação de MDA utilizando o método TBARS. A peroxidação lipídica foi expressa em pmols de MDA mg<sup>-1</sup> de células.<sup>37</sup>

#### 2.4 Efeito de antioxidantes na disfunção mitocondrial

Com o avanço das pesquisas sobre estresse oxidativo, surge a percepção de que a mera restauração do equilíbrio redox pode não ser suficiente para restaurar a condição fisiológica ideal. Diante dessa constatação, os esforços têm se concentrado no estudo de moléculas de maior versatilidade que, além de reestabelecer a homeostase redox, exerçam também efeitos benéficos adicionais, como redução da inflamação e melhoria na função mitocondrial.<sup>160,161</sup>

Assim, ao direcionar o foco para moléculas que apresentem não somente capacidade antioxidante, mas também a habilidade de aprimorar a função mitocondrial,

busca-se estabelecer uma abordagem terapêutica mais abrangente e promissora para modulação do estresse oxidativo. A melhoria da função mitocondrial pode implicar em uma maior eficiência energética celular, regulação do estresse oxidativo e preservação da integridade celular.<sup>162,163</sup>

Para avaliação da função mitocondrial, destaca-se a técnica de respirometria de alta resolução (HRR, do inglês "*High-Resolution Respirometry*") como um método amplamente empregado.<sup>164-168</sup> Esta abordagem possibilita a mensuração das taxas de consumo de oxigênio molecular (OCR, do inglês "*O<sub>2</sub> consumption rate*") em diversas matrizes biológicas, viabilizando a avaliação da eficiência da CTE e da função mitocondrial.

O princípio químico da técnica baseia-se em fundamentos eletroquímicos. O equipamento é composto, de maneira geral, por duas células eletroquímicas que contém um agitador magnético e um sistema de três eletrodos (eletrodo de Clark). O eletrodo de trabalho, constituído de ouro, encontra-se separado da solução de análise por uma membrana de TEFLON, cuja malha possui 25 µm, sendo permeável apenas a gases. Para o contra eletrodo e o eletrodo de referência, emprega-se uma superfície de Ag/AgCl. Este arranjo opera como um sensor de oxigênio polarográfico, fundamentando-se em princípios eletroquímicos para mensurar a concentração de oxigênio molecular dissolvido em meio líquido. A redução do O<sub>2</sub> ( $O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$ ) ocorre na superfície do eletrodo de ouro devido à aplicação de uma voltagem entre o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo. O oxigênio dissolvido no meio reage na superfície de ouro, gerando uma corrente elétrica proporcional à concentração de oxigênio molecular dissolvido. A corrente medida é convertida em uma leitura de concentração de oxigênio molecular.<sup>169,170</sup>

O potencial efeito protetor do disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> em uma linhagem de células neuronais (HT22) exposta ao estresse oxidativo via hidroperóxido de terc-butanol (tert-BuOOH) foi investigado empregando-se a técnica de HRR.<sup>171</sup> A linha de células neuronais do hipocampo HT22 tem sido usada para desvendar aspectos mecanísticos associados ao dano do hipocampo e potenciais estratégias terapêuticas em doenças neurodegenerativas, enquanto o hidroperóxido de tert-butila (tert-BuOOH) tem sido amplamente usado para induzir estresse oxidativo e disfunção mitocondrial em uma variedade de tipos de células, incluindo células HT22.<sup>171</sup>

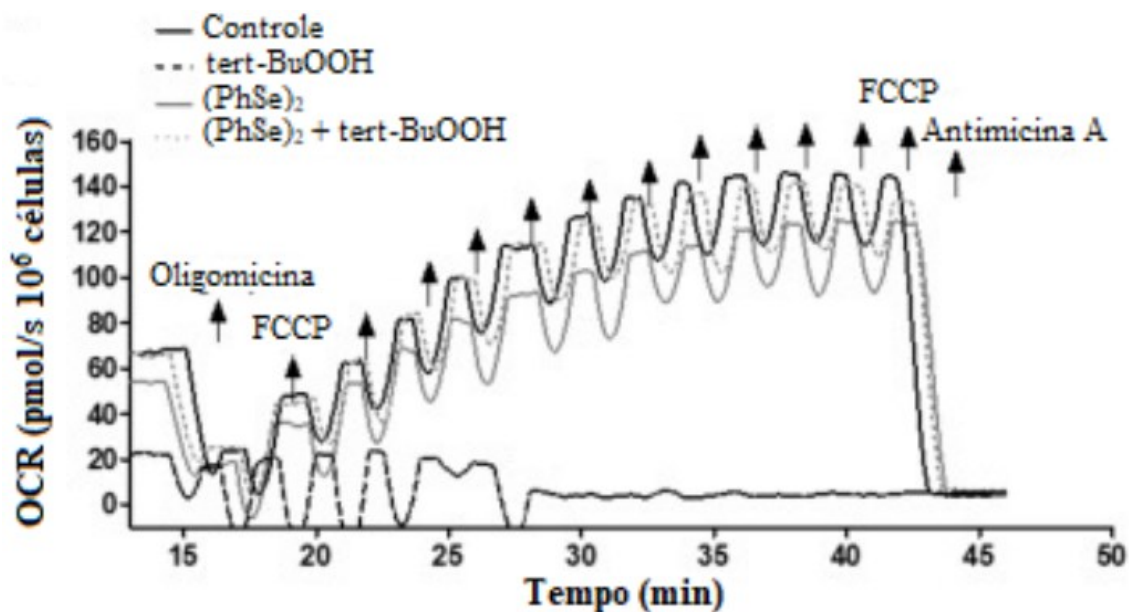
As células foram tratadas com 2 µmol L<sup>-1</sup> de (PhSe)<sub>2</sub> ou veículo (0,05% de DMSO) por um período de 48 h, seguido da exposição a tert-BuOOH (40 µmol L<sup>-1</sup>;



concentração que não afetou a viabilidade celular) por 4 h. As taxas basais de OCR foram registradas (Figura 8; Linha cheia escura). A ATP sintase (complexo proteico V) foi inibida com oligomicina ( $1,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e o OCR desacoplado foi registrado. Posteriormente, o carbonil cianeto 4-(trifluorometoxi) fenil-hidrazona (FCCP, desacoplador de fosforilação oxidativa) foi administrado em sucessivas alíquotas de  $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  para determinar o OCR máximo. A respiração foi inibida pela aplicação de antimicina A ( $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) para determinar o OCR não mitocondrial (consumo residual de oxigênio).<sup>171</sup>

A exposição das células HT22 a  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$  de tert-BuOOH resultou em uma diminuição nas diversas taxas de consumo de oxigênio (Figura 8, linha tracejada), evidenciando a disfunção mitocondrial. Este efeito foi corroborado pela redução nos níveis basais de consumo de  $\text{O}_2$ , bem como pelo OCR associado ao ATP (mediado pela adição de oligomicina) e ao consumo máximo de  $\text{O}_2$  (mediado pela adição de FCCP). A incubação das células HT22 apenas com o  $(\text{PhSe})_2$  também provocou uma redução, porém menos acentuada, em todas as taxas de consumo de oxigênio (Figura 8; Linhas cheias claras).<sup>171</sup>

A pré-incubação com  $2 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $(\text{PhSe})_2$ , seguida da adição de tert-BuOOH, impediu a diminuição do OCR (Figura 8; Linha tracejada clara) induzida pela presença de tert-BuOOH. Isso sugere que o pré-tratamento foi capaz de prevenir os danos causados pelo agente estressor, evitando a disfunção mitocondrial induzida pelo tert-BuOOH em células HT22.



**Figura 8.** Ensaio respirométrico representativo de células HT22 intactas pré-incubadas com  $2 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $(\text{PhSe})_2$  seguido da exposição ou não com  $\text{tert-BuOOH}$  ( $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ ).

171

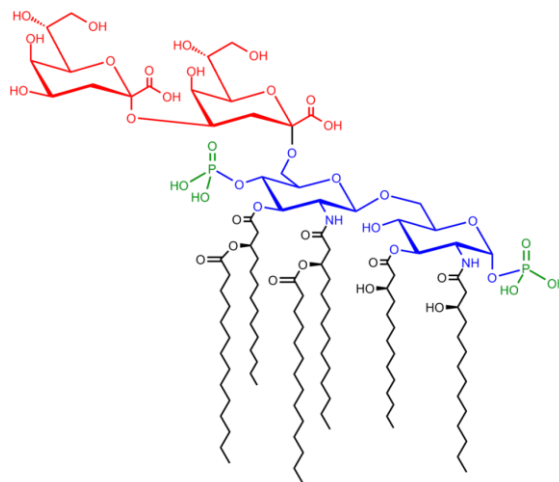
As mitocôndrias também desempenham função relevante no controle da resposta inflamatória.<sup>172</sup> Quando ocorre disfunção mitocondrial, seja em decorrência de danos agudos, crônicos ou a fatores genéticos, é desencadeada uma cascata de eventos que culminam na produção excessiva de ER, resultando em estresse oxidativo e dano celular.<sup>173</sup> Além disso, a disfunção mitocondrial pode gerar uma condição pró-inflamatória e contribuir para o desenvolvimento de um quadro inflamatório crônico e, por consequência, agravar doenças associadas ao estresse oxidativo.<sup>174</sup>

## 2.5 Atividade anti-inflamatória de compostos de coordenação

O lipopolissacarídeo (LPS, Figura 9) é molécula empregada para provocar respostas inflamatórias em sistemas biológicos.<sup>175-177</sup> Essa molécula é um componente da parede celular de bactérias gram-negativas e sua estrutura varia de acordo com a cepa de bactéria da qual é isolado.<sup>178,179</sup> De modo geral, a estrutura molecular do LPS é composta por três frações principais: o lipídeo A, o oligossacarídeo central e o polissacarídeo O.

O lipídeo A, representado na Figura 9 na cor preta, é constituído por di-3-hidroxi-tetradecanoato e duas moléculas de glucosamina nas suas extremidades com cadeias de ácidos graxos ramificados intercaladas. O oligossacarídeo central, representado em azul, atua como uma estrutura de açúcares localizada entre o lipídeo A e o polissacarídeo O. Sua composição varia de acordo com as diferentes espécies

bacterianas. O polissacarídeo O, representado em vermelho, a camada exterior e variável do LPS, é constituído por unidades de açúcares que se repetem, mas se distinguem entre as várias espécies bacterianas.



**Figura 9.** Representação genérica da estrutura molecular do LPS. Em preto está representada a fração “lipídio A”, enquanto nas cores azul e vermelho estão representadas as frações “oligosacarídeo” e “polissacarídeo O”, respectivamente.

Quando essas bactérias invadem o corpo, o LPS é liberado e imediatamente identificado pelo sistema imunológico como um sinal de invasão microbiana. Esse reconhecimento resulta na criação de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) e interleucina-6 (IL-6).<sup>179</sup> Essas citocinas, funcionando como mensageiros moleculares, reforçam a resposta inflamatória e sinalizam outras células do sistema imune para o foco da infecção, desempenhando um papel vital na eliminação dos patógenos.<sup>180</sup> Adicionalmente, o LPS tem a capacidade de induzir a geração de NO pelos macrófagos ativados, que é uma molécula muito presente nos processos inflamatórios, mas que, em concentrações muito altas, pode ter efeitos tóxicos para as células e os tecidos vizinhos (nitração oxidativa).<sup>181</sup>

A atividade anti-inflamatória de uma nova série de compostos de coordenação mononucleares contendo centros de metais de transição foi investigada em células de macrófagos murinos RAW 264.7, sendo o processo inflamatório ativado com o tratamento com LPS por 24, 48 e 72 h.<sup>182</sup> Inicialmente, os compostos foram sintetizados e caracterizados, apresentando a fórmula genérica  $[M(3\text{-ind})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ , onde M representa metais de transição como cobalto, níquel, zinco, ferro ou manganês, coordenados ao 3-indazol-carboxilato (3-ind). Os níveis de nitrito, correlacionados à

oxidação do NO gerado, foram mensurados como um indicador do efeito anti-inflamatório.

O composto de manganês apresentou o maior atividade anti-inflamatória, inibindo aproximadamente 55% da geração de NO após 24 h. O composto de zinco seguiu com 50% de inibição. O pré-ligante não mostrou atividade. Após 48 h, a inibição ocorreu tanto no pré-ligante como em todos os compostos, sendo proporcional à concentração. O pré-ligante exibiu 60% de inibição do NO, enquanto compostos de cobalto e níquel tiveram menor inibição que o pré-ligante. Compostos de zinco e ferro exibiram 75% de inibição, enquanto o composto de manganês apresentou 85% de inibição consistente em todas as concentrações. Após 72 h, compostos de cobalto, níquel e zinco mostraram padrões semelhantes na inibição do NO, enquanto compostos de ferro e manganês mantiveram inibições superiores a 90% em todas as concentrações.<sup>182</sup>

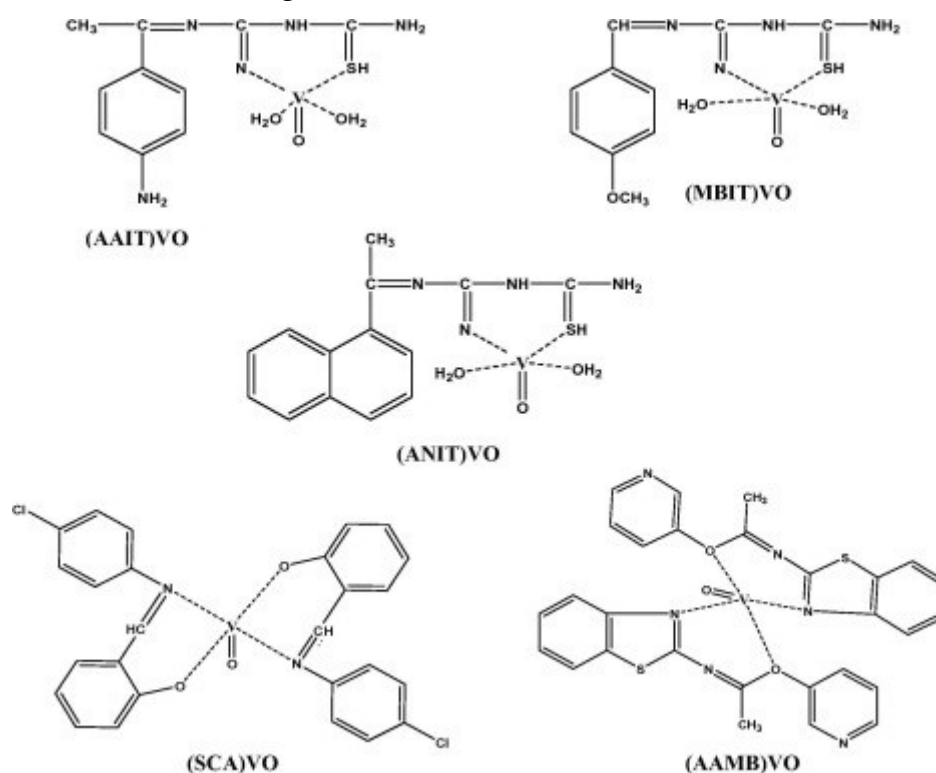
O NO é uma molécula gasosa que atua como um mensageiro químico, desencadeando uma série de eventos vasomotores.<sup>183,184</sup> Em particular, o NO promove a vasodilatação dos vasos sanguíneos, relaxando o músculo liso presente nas paredes arteriais. Esse relaxamento aumenta a permeabilidade capilar, permitindo a saída de fluidos e proteínas do sangue para o espaço intersticial dos tecidos. Esse acúmulo de líquido nos tecidos periféricos é um dos principais mecanismos que conduzem à formação do edema.<sup>185</sup> Portanto, o NO exerce um papel essencial na modulação da resposta vascular que culmina na ocorrência do edema em situações inflamatórias.<sup>186-188</sup>

O edema de pata em camundongo ou em rato, induzido por carragenina tem sido frequentemente utilizado como um modelo experimental animal para simular respostas inflamatórias. Nesse aspecto, a atividade anti-inflamatória dos compostos de vanadila foi investigada em um modelo *in vivo* de inflamação.<sup>189</sup> Os compostos de coordenação de vanadila contendo derivados de bases de Schiff foram sintetizados, caracterizados e codificados como [VO(AAIT)], [VO(ANIT)], [VO(SCA)<sub>2</sub>], [VO(MBIT)] e [VO(AAMB)<sub>2</sub>]. A estrutura molecular de cada compostos está representada na Figura 10. Para o modelo de inflamação, os animais foram previamente tratados com os compostos de coordenação estudados, 1 h antes da administrado intradérmica de carragenina (100 µg) na pata traseira dos animais (ratos albinos da linhagem Wistar).

A administração da λ-carragenina resultou em uma resposta bifásica nos animais: o volume do edema na pata duplicou de 3 para 6 mL nos tempos de 0,5 para 1

h após a administração da carragenina, mantendo-se próximo a 6 mL até o tempo de 5 h (Figura 11). Este padrão de comportamento é corroborado na literatura para ratos e camundongos de diversas linhagens.

No que se refere aos cinco compostos de vanadila examinados, todos demonstraram capacidade de inibição do edema de pata induzido pela  $\lambda$ -carragenina em todos os intervalos temporais avaliados. No entanto, o composto [VO(AAMB)<sub>2</sub>] apresentou atividade mais consistente em comparação aos demais compostos, exibindo uma maior eficácia na inibição do edema em todos tempos analisados. Em comparação com o controle positivo (diclofenaco de sódio), os compostos não demonstraram uma atividade anti-inflamatória tão uniforme ao longo dos intervalos de tempo avaliados, conforme demonstrado na Figura 11.



**Figura 10.** Representação das estruturas moleculares dos compostos de coordenação VO(AAIT), VO(ANIT), VO(SCA)<sub>2</sub>, VO(MBIT) e VO(AAMB)<sub>2</sub>.<sup>189</sup>

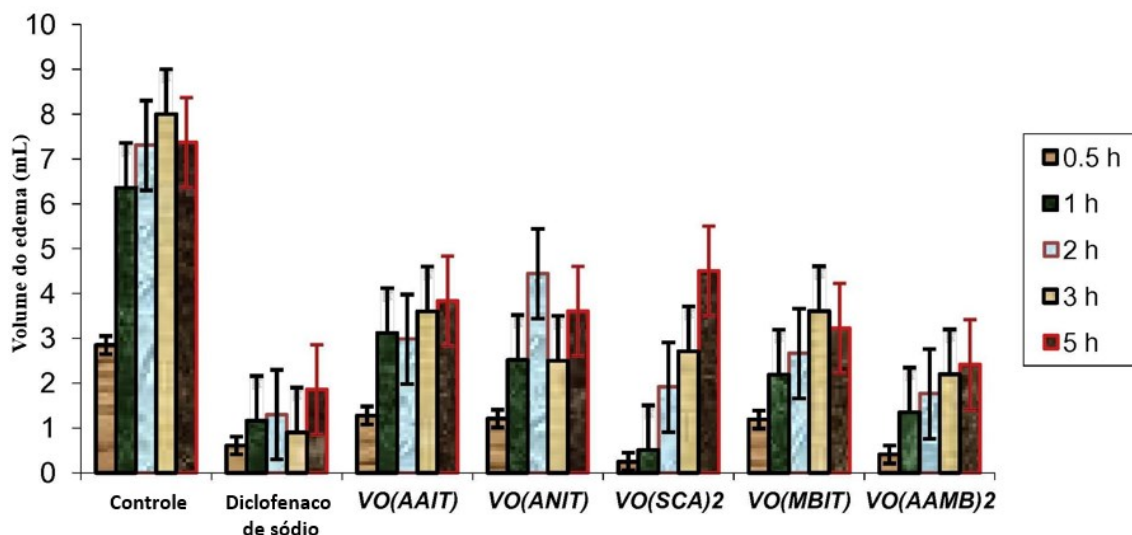


Figura 11. Volume do edema (mL) para cada tratamento nos tempos de 0,5 a 5 h.<sup>189</sup>

Diante disso, compostos de coordenação emergem como ferramentas multifuncionais e promissoras, capazes de fornecer *insights* valiosos em diversos aspectos do estresse oxidativo, inflamação e doenças relacionadas. A habilidade de modular a homeostase redox e de reduzir a inflamação ressalta sua relevância dessa classe de compostos como agentes antioxidantes, motivando estudos em modelos *ex vivo* e *in vivo*. Embora muitos trabalhos investiguem a atividade anti-inflamatória e antioxidante de compostos de coordenação, ainda não existam estudos substanciais sobre o impacto dos compostos de coordenação na melhoria da função mitocondrial. Este trabalho pioneiro busca preencher essa lacuna e explorar esse novo horizonte de pesquisa.

## 2. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo geral

- Investigar o efeito dos compostos da série hp na prevenção da disfunção mitocondrial e da mitigação de danos oxidativos em diferentes modelos de estresse oxidativo.

### 3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar os compostos de coordenação da série hp ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ ,  $\text{Cu}^{\text{II}}$  e  $\text{Mn}^{\text{II}}$ ), bem como o composto de referência EUK-8, de acordo com rotas previamente descritas na literatura;
- Avaliar a interação entre os compostos de coordenação e as ERs ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot\text{OH}$ ), *in vitro*, empregando-se técnicas espectroscópicas (EUK-8 será utilizado como controle positivo, sendo estabelecido na literatura como *SOD mimic*);
- Determinar a capacidade de inibição de ERs em dois modelos *in vitro* de inflamação induzido por LPS e estresse oxidativo induzido por rotenona em células C6;
- Investigar o efeito dos compostos de coordenação na disfunção mitocondrial induzida por rotenona em células C6, através da técnica de HRR;
- Avaliar a capacidade de inibição de danos oxidativos em um modelo *ex vivo* de estresse oxidativo induzido pela reação de Fenton, empregando-se preparações de fígado de camundongo;
- Investigar a eficácia dos compostos da série hp na inibição da progressão do edema de pata induzido por carragenina em camundongos *swiss* (modelo *in vivo*).

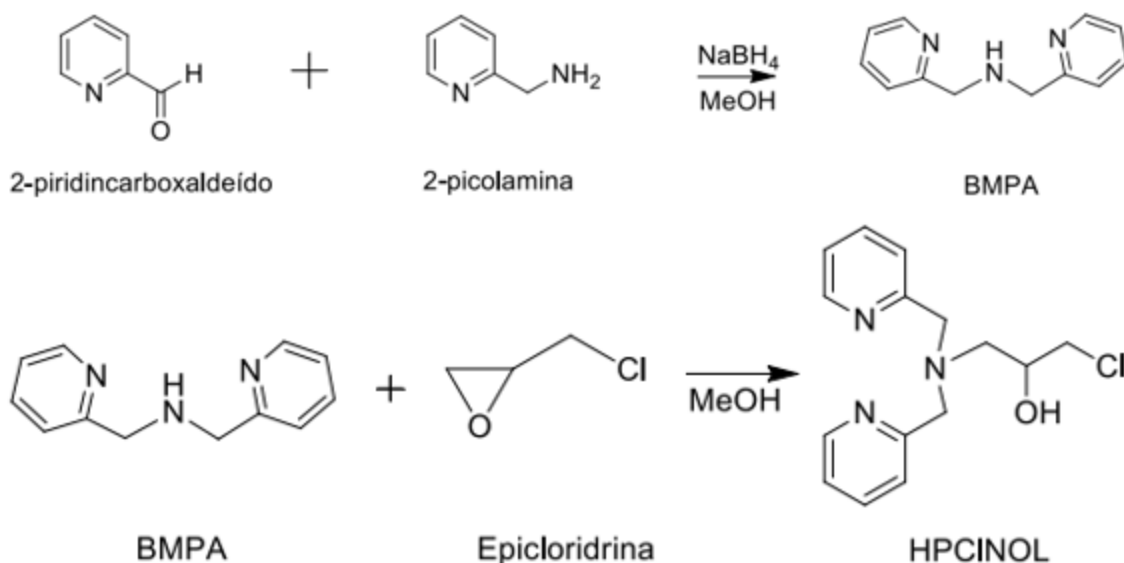
### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.1 Síntese das moléculas orgânicas e dos compostos de coordenação

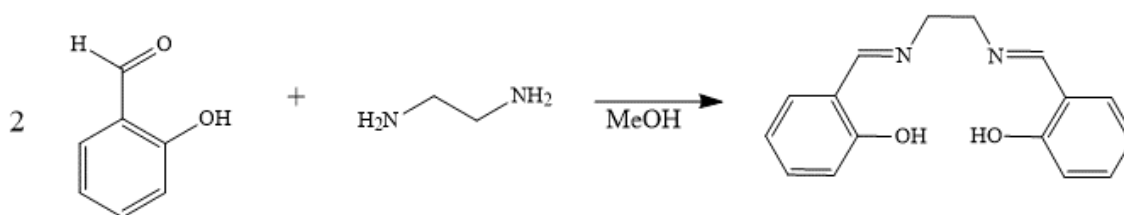
Neste trabalho foram estudados os compostos de coordenação de  $\text{Cu}^{\text{II}}$ ,  $\text{Fe}^{\text{III}}$  e  $\text{Mn}^{\text{II}}$ , contendo o ligante hpcinol. Os compostos foram sintetizados seguindo as rotas sintéticas descritas na literatura,<sup>34,38,39</sup> e utilizando reagentes de alta pureza. Todos os compostos obtidos foram armazenados em um dessecador até o momento do uso. O ligante hpcinol foi mantido na geladeira.

#### 4.1.2 Síntese dos pré-ligantes hpcinol e salen

A síntese do hpcinol foi realizada seguindo a metodologia proposta por Horn Jr e colaboradores em 2005, por meio de reação de adição nucleofílica entre quantidades equimolares de bis-(2-metilpiridil)amina (bmpa) e epícloridrina<sup>190</sup> (Figura 12). O ligante salen foi obtido através da reação entre dois equivalentes de salicilaldeído e um equivalente de etilendiamina, conforme reportado na literatura (Figura 13).<sup>191</sup>



**Figura 12.** Representação esquemática da síntese do precursor bmpa e do pré-ligante hpcinol.

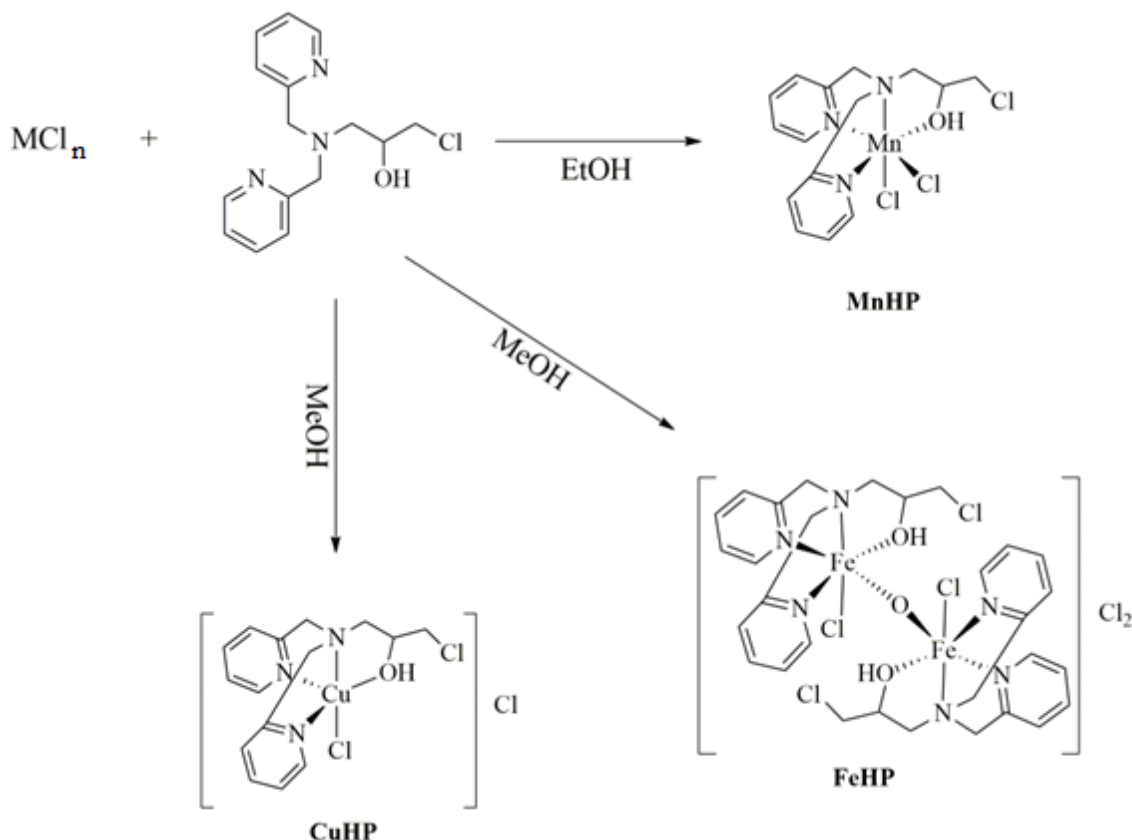


**Figura 13.** Representação esquemática da síntese do pré-ligante salen.

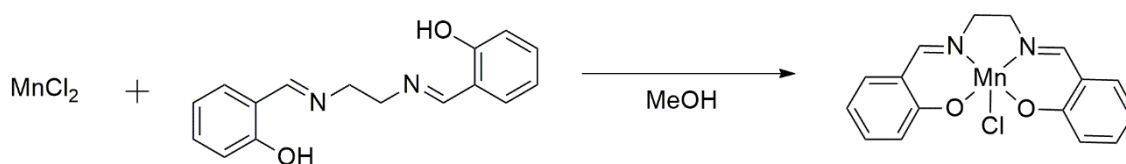


### 4.1.3 Síntese dos compostos de coordenação

Os compostos de coordenação,  $[\text{Cu}(\text{hpclnol})\text{Cl}]\text{Cl}$  ( $\text{CuHP}$ )<sup>38</sup>,  $[\text{Cl}(\text{hpclnol})\text{Fe}(\mu\text{-O})\text{Fe}(\text{hpclnol})\text{Cl}]\text{Cl}_2$  ( $\text{FeHP}$ )<sup>39</sup> e  $[\text{Mn}(\text{hpclnol})\text{Cl}_2]$  ( $\text{MnHP}$ )<sup>34</sup> foram obtidos por meio da reação equimolar entre os sais de cloreto ( $\text{Cu}^{\text{II}}$ ,  $\text{Fe}^{\text{III}}$  e  $\text{Mn}^{\text{II}}$ ) e o ligante hpclnol, em metanol, conforme descrito na literatura (Figura 14). O composto  $[\text{Mn}(\text{salen})\text{Cl}]$  (EUK-8) foi sintetizado por meio da reação equimolar entre cloreto de manganês(II) e o ligante salen, conforme literatura (Figura 15).<sup>191</sup>



**Figura 14.** Representação esquemática das equações químicas envolvidas na síntese dos compostos da série hp, onde  $\text{M} = \text{Fe}^{\text{III}}$ ,  $\text{Cu}^{\text{II}}$  ou  $\text{Mn}^{\text{II}}$ .



**Figura 15.** Representação da equação de reação química envolvida na síntese do EUK-8.

## 4.2. Caracterização dos ligantes e compostos de coordenação

A estrutura e pureza das moléculas orgânicas (hpclnol e salen), obtidas como óleo castanho e como sólido amarelo e respectivamente foram confirmadas utilizando

técnicas de espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e determinação do ponto de fusão para o ligante salen. A caracterização dos compostos de coordenação foi realizada utilizando diversas técnicas, incluindo determinação de ponto de fusão, parâmetros eletroquímicos (medidas de condutividade e voltametria cíclica), espectroscopias na região do infravermelho e eletrônica, análise elementar e ressonância paramagnética eletrônica (EPR). Todas estas análises foram realizadas na Central de Análise do Departamento de Química- UFSC ou no Laboratório Interdisciplinar de Química Inorgânica Medicinal e Catálise (LIQIMeC) ou em laboratórios com os quais temos parcerias científicas.

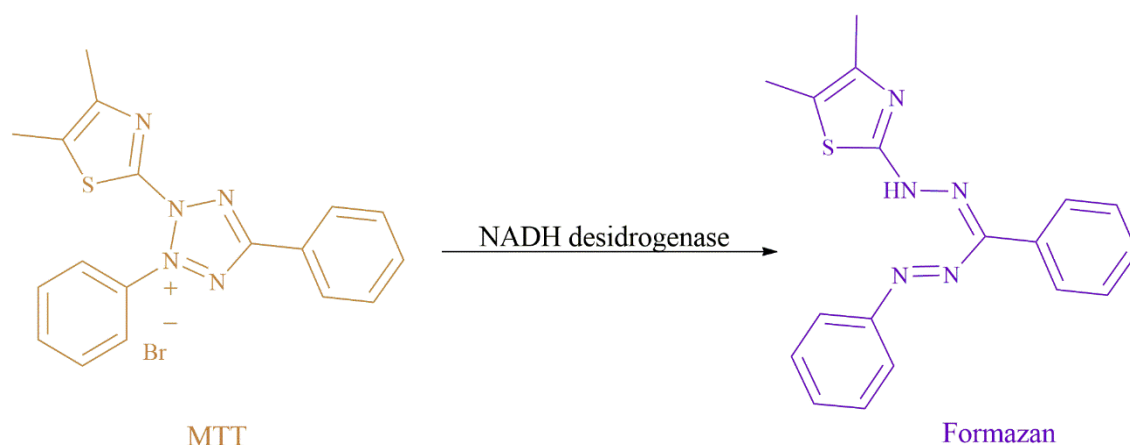
Para as medidas de condutividade, os compostos de coordenação foram dissolvidos em metanol na concentração de  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ . Os voltamogramas cíclicos foram obtidos em um voltamograma do tipo VersaSTAT 3 AMETEK®, empregando-se um sistema de três eletrodos de platina, hexafluorofosfato de tetrabutílamônio como eletrólito suporte (solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ), e DMSO como solvente. O ferroceno foi utilizado como padrão interno e seu E/2 foi ajustado para  $0,4 \text{ V}$ .

### 4.3 Atividade *in vitro* dos compostos de coordenação

Para investigar a atividade desses compostos de coordenação em modelos de estresse oxidativo, foram empregadas células C6. Esse estudo foi realizado no Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo (LABOX) com a supervisão da Professora Dra. Alexandra Latini.

#### 4.3.1 Avaliação da viabilidade celular – ensaio de MTT

O ensaio de MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) avalia a viabilidade celular a partir da atividade das enzimas mitocondriais em células metabolicamente ativas. O princípio químico envolvido no ensaio de MTT é a conversão desse sal de coloração amarela, através de enzimas e outras moléculas antioxidantes, em um precipitado violeta de formazan, insolúvel em água (Figura 16). Assim, a medida da atividade mitocondrial pela conversão do sal MTT em formazan violeta é um indicador indireto da viabilidade celular, e pode ser usado para avaliar o efeito de agentes químicos ou condições de tratamento celulares.



**Figura 16.** Representação da oxidação do MTT (amarelo) em formazan (violeta), catalisado pela enzima NADH desidrogenase.

Para esses ensaios, as células foram cultivadas em placas de 96 poços, contendo  $1 \times 10^5$  células por poço e tratadas com os compostos de coordenação nas concentrações de 100, 30, 3 e  $0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Como controle negativo, as células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de SFB sem a adição do composto. Como controle positivo, as células foram cultivadas com 10% de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Após 24 h de tratamento, o sobrenadante da cultura foi removido, e  $15 \mu\text{L}$  de MTT  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  em solução de meio DMEM *high glucose* foram adicionados a cada poço por 1 h. Os cristais de formazan foram posteriormente solubilizados pela adição de  $100 \mu\text{L}$  de dimetil sulfóxido (DMSO) puro. Os  $100 \mu\text{L}$  do sobrenadante foram coletados e transferidos para uma nova placa de 96 poços, e a absorbância foi registrada em  $570 \text{ nm}$  em uma multileitora *infinite m200* tecan, disponível no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB).<sup>192</sup>

#### 4.3.2 Investigação da atividade antioxidante em modelos *in vitro* de estresse oxidativo

A atividade antioxidante foi inicialmente investigada em modelo *in vitro* de estresse oxidativo em células C6 induzido por rotenona e por LPS.<sup>193, 194.</sup> Os experimentos foram conduzidos após a verificação prévia da viabilidade celular. Desta forma, a quantificação das células viáveis foi realizada através da técnica de azul de Tripan. Antes de cada experimento, as células foram descoladas das garrafas, centrifugadas e ressuspendidas em  $1 \text{ mL}$  de meio de cultura. Uma alíquota desta suspensão foi separada em um eppendorf, onde foi acrescentado o corante azul de Tripan, em uma diluição 1:1. Após homogeneização,  $10 \mu\text{L}$  foram transferidos para uma câmara de Neubauer. Todas as células não coradas (viáveis) foram contadas nos 4 quadrantes com o auxílio de um microscópio óptico comum (aumento de  $400\times$ ). O

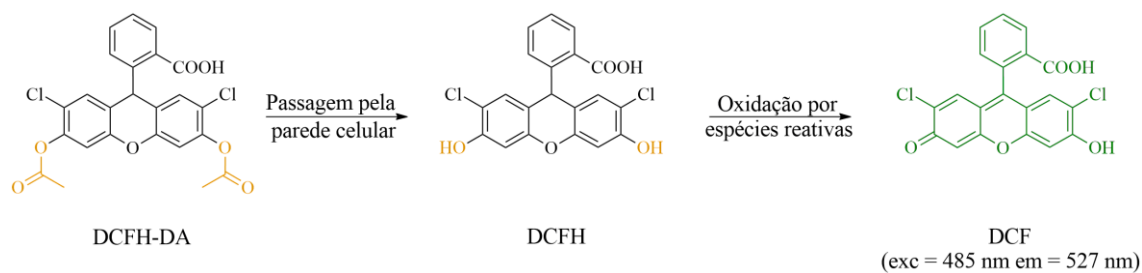
número obtido foi utilizado para realização dos plaqueamentos em placas de 96 poços nas concentrações necessárias.

Além disso, o efeito protetor dos compostos de coordenação da série hp foi investigado contra o estresse oxidativo induzido pela  $\cdot\text{OH}$  gerado pela reação de Fenton em leveduras *S. cerevisiae*. O composto EUK-8 foi utilizado como comparativo nos testes de atividade antioxidante por ser um conhecido agente antioxidante e anti-inflamatório, além de pertencer à classe dos compostos de coordenação.<sup>195,196</sup>

O estudo envolvendo células C6 foi conduzido no Departamento de Bioquímica da UFSC, com a supervisão da Professora Dra. Alexandra Latini. Os experimentos envolvendo a levedura *S. cerevisiae* foram realizados no Departamento de Bioquímica da UFRJ, pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Professor Dr. Marcos Dias Pereira.

#### 4.3.2.1 Inibição da produção de ERs

O ensaio de DCFH (2',7'-diclorodihidrofluoresceína) é uma metodologia utilizada para medir a produção intracelular de ERs. Inicialmente, a DCFH-DA é uma molécula não fluorescente que é internalizada pelas células. Na presença de ERs, a DCFH é oxidada, resultando na formação de DCF (2',7'-diclorofluoresceína), que é altamente fluorescente (Figura 17). A intensidade da fluorescência é proporcional à quantidade de ERs produzida pela célula.<sup>197,198</sup>



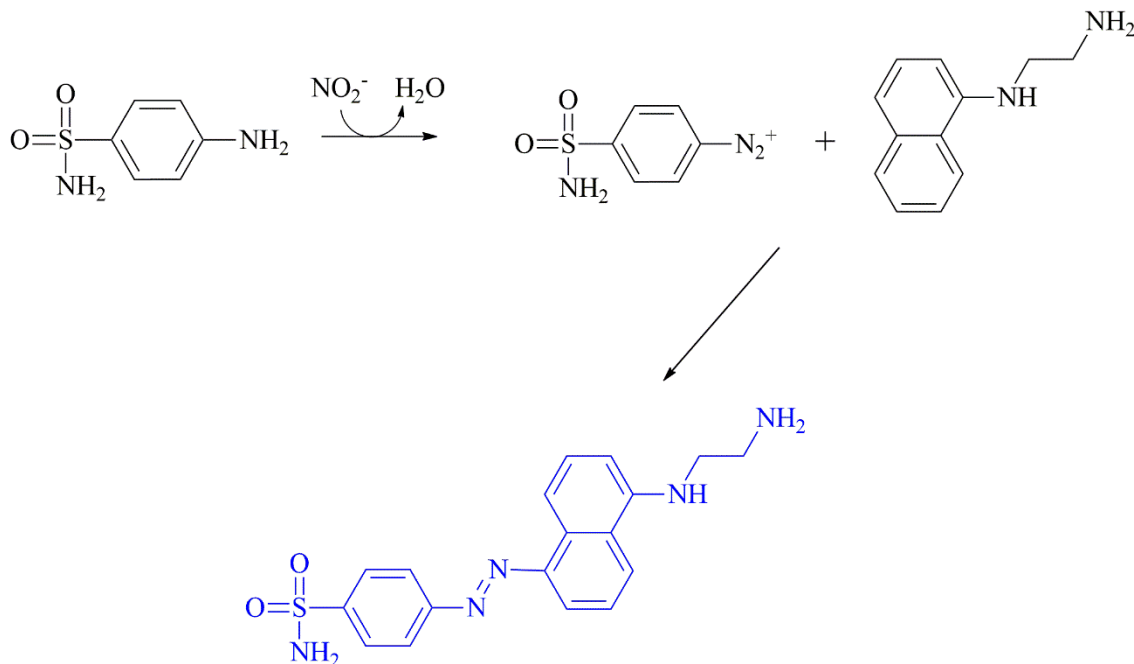
**Figura 17.** Reações de oxidação do DCFH-DA (não fluorescente) até sua forma oxidada DCF (fluorescente) no meio intracelular.

Para esse modelo de disfunção mitocondrial induzido pela rotenona (inibidor do complexo proteico I), foram utilizadas placas de 96 poços com concentração estimada de  $2 \times 10^4$  células por poço. Após o plaqueamento as mesmas foram incubadas durante 24 h (temperatura  $37^\circ\text{C}$  e  $\text{CO}_2$  a 5%) para a adesão e proliferação. Após esta incubação, as células foram tratadas com as concentrações pré-determinadas de cada composto (100, 30, 10, 3 e  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Após 1 h, o sobrenadante foi removido e todos os grupos (exceto branco) foram tratados com uma alíquota de  $100 \mu\text{L}$  contendo 50

$\mu\text{mol L}^{-1}$  de rotenona (diluída em EtOH) por um período de 1 h. Os grupos foram divididos em branco ou controle (células sem tratamento), controle negativo (rotenona  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), controle positivo (ácido gálico AG  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e os tratamentos com os compostos de coordenação nas concentrações já informadas. Após a incubação, o sobrenadante foi removido e  $100 \mu\text{L}$  de DCFH na concentração de  $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  foi adicionado e a placa foi incubada por mais 45 min. Passado esse tempo, o sobrenadante foi coletado e transferido para uma placa preta de 96 poços para obtenção dos valores de emissão fluorescente em multileitora *infinite* m200 tecan ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 485 nm e  $\lambda_{\text{em}}$ : 527 nm).

#### 4.3.2.2 Inibição da produção de NOx

A reação de Griess é um método químico utilizado para determinar a presença dos metabólitos de óxido nítrico ( $\text{NO}_x$ ) em células ou amostras biológicas. Nessa reação, a sulfanilamida interage com nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), por meio de uma reação de diazotização (Figura 18). O produto dessa reação interage com N-(1-naftil)etilenodiamina, levando a formação de um diazocomposto, o qual possui coloração vermelha intensa, sendo facilmente detectado e quantificado por espectroscopia eletrônica.<sup>199</sup>



**Figura 18.** Representação das reações de nitração e diazotização que ocorre com os reagentes de Griess na presença dos metabólitos do NO.

Para esse modelo de inflamação induzido pelo LPS, foram utilizadas placas de 96 poços com concentração estimada de  $2 \times 10^4$  células por poço. Após o plaqueamento as mesmas foram incubadas durante 24 h (temperatura  $37^\circ\text{C}$  e  $\text{CO}_2$  a 5%) para a adesão

e proliferação. Após esta incubação, as células foram tratadas com as concentrações pré-determinadas de cada composto (100, 30, 10, 3 e 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Após 1 h, o sobrenadante foi removido e todos os grupos (exceto branco) foram tratados com uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  contendo 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de LPS por um período de 24 h. Os grupos foram divididos em branco ou controle (células sem tratamento), controle negativo (LPS 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), controle positivo (dexametasona 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e os tratamentos com os compostos de coordenação nas concentrações já informadas. Após a incubação, 50  $\mu\text{L}$  dos sobrenadantes foram transferidos para outra placa de 96 poços contendo 50  $\mu\text{L}$  de nitrato redutase. Em seguida, 50  $\mu\text{L}$  de sulfanilamida e 50  $\mu\text{L}$  de cloridrato de N-(1-naftil)etilenodiamina. Os valores de emissão fluorescente em multileitora infinite m200 tecan ( $\lambda = 540 \text{ nm}$ ).<sup>200,201</sup>

#### 4.3.3 Estudo do efeito protetor - Sobrevivência das células de *S. cerevisiae*

Estoques *S. cerevisiae* foram mantidos em meio YPD 2% sólido (1% de extrato de lêvedo, 2% de Peptona, 2% de Glicose e 2% de Ágar) em condições apropriadas (37 °C). Para todos os experimentos as células foram crescidas até a metade da primeira fase de crescimento exponencial na presença de glicose (0,8 a 1,0 mg do peso seco de células/cm<sup>3</sup>), em meio YPD 2% líquido com a proporção de 5/1 volume do frasco/volume do meio, utilizando um agitador mantido a 28°C e 160 rpm.<sup>34</sup>

A concentração celular foi determinada através da medida da turbidez de uma suspensão de células, em comprimento de onda de 570 nm. Em seguida a absorbância foi convertida em unidade de concentração (mg de peso seco de células mL<sup>-1</sup>) utilizando um fator de conversão que foi calculado previamente, a partir de uma curva de peso seco onde um volume adequado da suspensão de células foi filtrado em filtro Millipore (45  $\mu\text{m}$ ) e colocado em estufa até atingir peso constante. Paralelamente foram feitas diferentes diluições da suspensão de células para leitura da absorbância a 570 nm no espectrofotômetro para posterior cálculo do fator de conversão.

Foram realizados estudos de citotoxicidade contra à *S. cerevisiae*, afim de verificar se os compostos seriam tóxicos para as células. Em erlenmeyer de 25 mL, foram adicionados 5 mL de suspensão de células, na concentração de 0,8 a 1 mg de peso seco mL<sup>-1</sup>, com os compostos nas concentrações de 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , estes foram incubados por uma hora a 28 °C e 160 rpm e em seguida foi realizada diluição para o plaqueamento, este foi feito em triplicata, em placa de Petri com meio

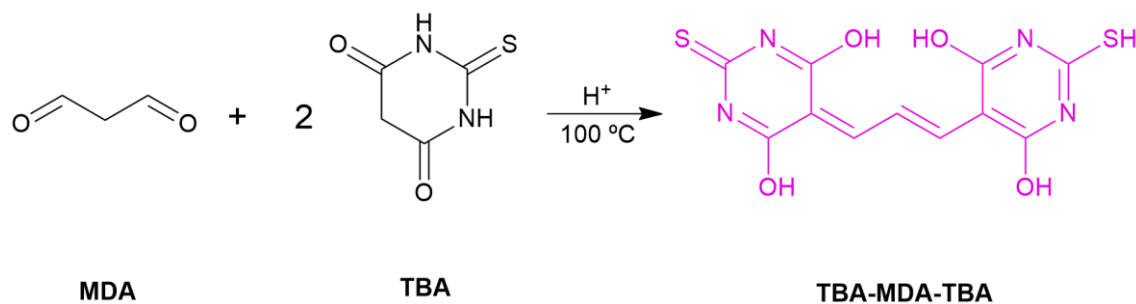
sólido YPD 2 % e incubadas por 72 h a 37 °C. Após a incubação as colônias formadas foram contadas.

Após o teste de citotoxicidade, foram realizados os testes de proteção celular. O estresse oxidativo foi induzido pela reação de Fenton (40 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 4 mmol L<sup>-1</sup> de Fe<sup>II</sup>). Em Erlenmeyer de 25 mL, foram adicionados 5 mL de suspensão de células, na concentração de 0,8 a 1 mg de peso seco mL<sup>-1</sup>, o controle foi exposto a condições de estresse, enquanto outro grupo de células recebeu o pré-tratamento com os compostos e ligantes, o inóculo foi feito usando o dobro do volume de meio necessário, após a adição dos compostos para o pré-tratamento, o restante do inóculo foi centrifugado, as células descartadas e meio reservado. O pré-tratamento foi feito com compostos e ligantes na concentração de 25 µmol L<sup>-1</sup> em meio YPGLY 4%, durante 60 min a 28 °C e 160 rpm. Após o pré-tratamento a suspensão de células foi centrifugada e em seguida as células foram lavadas duas vezes com água destilada estéril (5 mL por lavagem). Em seguida as células foram ressuspensas no meio de cultivo inicial (que foi reservado previamente) e expostas ao estresse induzido pelo <sup>•</sup>OH, gerado pela reação de Fenton, por 1 h a 28 °C e 160 rpm. Após o pré-tratamento e o estresse as células foram então diluídas e plaqueadas em placas de petri com meio sólido YPD 2%. A placas foram incubadas por 72 horas a 37 °C e as colônias formadas foram contadas. Estes estudos foram realizados em colaboração do Prof. Marcos Dias Pereira, no Departamento de Bioquímica da UFRJ.

#### 4.3.6 Inibição da oxidação de lipídios – ensaio de TBARS

O ensaio de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, do inglês "*thiobarbituric acid reactive substances*") foi utilizado como uma abordagem para avaliar se a atividade antioxidante foi suficiente para inibir a oxidação dos lipídios.

O ensaio de TBARS é utilizado para mensurar a quantidade de produtos finais de oxidação de lipídios, conhecidos como lipoperóxidos, em uma amostra biológica. O princípio químico subjacente ao método de TBARS baseia-se na reação dos produtos de oxidação de lipídios com o ácido tiobarbitúrico (TBA), que ocorre em meio ácido e a uma temperatura de 100 °C. Essa reação resulta na formação de uma molécula com coloração rosa, a qual pode ser quantificada por meio de espectroscopia de absorção ou emissão fluorescente (Figura 19).<sup>202</sup>



**Figura 19.** Reação entre o MDA e TBA que ocorre no ensaio de TBARS em meio ácido e à 100 °C para formar o aduto fluorescente TBA-MDA-TBA

O fígado foi dissecado de camundongos *swiss* e cortado em pequenos pedaços com um par de tesouras e adicionado a um tubo contendo 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de PBS ((1:10 P/V). Os tecidos foram homogeneizados com um homogeneizador de tecido de vidro à temperatura ambiente por 2 a 3 minutos e centrifugados a 1500 g durante e a 4 °C 10 minutos. O precipitado foi ressuspenso em solução de PBS.

O efeito dos compostos, em concentrações variando de 0,2 a 500  $\text{nmol L}^{-1}$ , foi investigado em 50  $\mu\text{L}$  de homogenatos de fígado pré-tratados com os compostos (1 h) e expostos ao estresse do  $\cdot\text{OH}$  gerado pela reação de Fenton (50  $\mu\text{L}$  de 40 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 50  $\mu\text{L}$  de 4 mM  $[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2(\text{NH}_4)]$ ).

A detecção da LPO foi avaliada pela medição de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Resumidamente, 150  $\mu\text{L}$  de 10% TCA foi adicionado ao eppendorf contendo o homogenato de fígado, o composto e o  $\cdot\text{OH}$ , a fim de induzir a precipitação das proteínas. Os eppendorfs foram centrifugados a 300 g por 10 min e uma alíquota de 150  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi transferida para um tubo de ensaio contendo 150  $\mu\text{L}$  de 0,67% TBA. Os tubos de ensaio foram aquecidos a 100 °C em banho-maria por 1 h. Nessas condições, as espécies reativas ao TBA reagem formando um aduto TBA-MDA-TBA, que foi extraído com 450  $\mu\text{L}$  de n-butanol, centrifugado a 5000 g por 5 min. Uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi transferida para uma placa de 96 poços e a emissão foi medida em uma multileitora tecan infinite ( $\lambda_{\text{ex}} = 515$  e  $\lambda_{\text{em}} = 553$  nm).<sup>37,202</sup>

#### 4.10 Investigação da captura de ERs em reações *in situ*

As interações entre as ERs ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e  $\cdot\text{OH}$ ) e os compostos de coordenação, foram investigadas por EPR, de acordo com as seguintes condições experimentais:



**a) Interação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** a concentração da solução estoque de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi determinada via permanganometria de acordo com a literatura<sup>203</sup>. Soluções de cada composto (2 mmol L<sup>-1</sup>) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 mmol L<sup>-1</sup>) foram preparadas usando tampão PBS (pH = 7,4, mmol L<sup>-1</sup>). Os espectros de EPR de cada composto isolado na concentração de 1 mmol L<sup>-1</sup> foram registrados a 120 K. Em seguida, 150 µL da solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram adicionados a um tubo de EPR contendo 150 µL da solução contendo o complexo em investigação, resultando em uma razão complexo:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 1:100. Após 30 segundos, a mistura reacional foi congelada em nitrogênio a 120 K e os espectros de EPR foram registrados. Os tubos foram descongelados em temperatura ambiente e congelados novamente em nitrogênio em um tempo de reação igual a 24 e 48 h para obtenção de novos espectros.

**b) Interação com O<sub>2</sub><sup>•-</sup>:** soluções estoque de superóxido de potássio (KO<sub>2</sub>, ~5 mmol L<sup>-1</sup>) e dos complexos (1 mmol L<sup>-1</sup>) foram preparadas em DMSO seco em peneira molecular. A concentração de KO<sub>2</sub> foi quantificada por espectroscopia eletrônica ( $\lambda_{\text{max}}$  260 nm,  $\epsilon = 26.867 \text{ mol}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )<sup>204</sup>. Espectros de EPR para cada composto de coordenação e para o O<sub>2</sub><sup>•-</sup> isolado foram obtidos a 120 K. Então, alíquotas de diferentes concentrações (volume final de 150 µL) de solução de KO<sub>2</sub> foram adicionadas a um tubo de EPR contendo uma alíquota da solução estoque do complexo. O estudo foi realizado empregando diferentes razões complexo:KO<sub>2</sub>, de 1 até a detecção do sinal de EPR característico de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Espectros de EPR foram obtidos após 30 s de reação, a 120 K.

**c) Interação com <sup>•</sup>OH:** soluções estoque do spin trap 5,5-Dimetilpirrolina-N-óxido (DMPO, 400 mmol L<sup>-1</sup>), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4 mmol L<sup>-1</sup>), [Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>].6H<sub>2</sub>O (0,4 mmol L<sup>-1</sup>) e compostos de coordenação (100 a 1000 µmol L<sup>-1</sup>) foram preparados em água ultra pura. Primeiro, 10 µL de cada solução de composto de coordenação foram misturados com 10 µL de DMPO. Em seguida, o <sup>•</sup>OH foi gerado pela reação de Fenton, por meio da adição concomitante de 10 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e uma solução aquosa de [Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>].6H<sub>2</sub>O. A proporção utilizada na reação foi de DMPO:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:Fe de 100:1:0,1. A mistura reacional foi então transferida para um capilar com diâmetro interno de 1,0 mm e os espectros foram registrados a 291 K após 3 min. A determinação do IC<sub>50</sub> foi realizada através de uma regressão linear da relação entre a concentração dos compostos e a respectiva razão h/h<sub>0</sub>, onde h é altura final h<sub>0</sub> é a altura final relativa a segundo linha do conjunto de 4 linhas do aduto DMPO-<sup>•</sup>OH.

Para os compostos de coordenação que apresentaram mudança de coloração durante a reação com as ERs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou KO<sub>2</sub>, foram realizados estudos empregando-se a técnica de espectroscopia eletrônica. Nenhum dos complexos apresentou mudança de cor na presença do <sup>•</sup>OH. Os espectros foram registrados na razão molar em que algum intermediário foi identificado por espectroscopia EPR, utilizando tampão PBS para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e DMSO seco para KO<sub>2</sub>.

#### 4.11 Simulações dos espectros de EPR

Os valores de *g* foram calculados de acordo com a equação:

$$g = \frac{h \times \nu}{H \times \mu_B}$$

Onde *h* é a constante de Plank (6,626 10<sup>-14</sup> J s<sup>-1</sup>),  $\nu$  é a frequência do equipamento (9,5 GHz),  $\mu_B$  é o magnetão de Bohr (9,274 10<sup>-24</sup> J T<sup>-1</sup>) e *H* é o campo magnético obtido experimentalmente.

A simulação do espectro de EPR e a correção dos valores de *g* foram realizadas por meio do software MATLAB versão R2021b (9.10.0.1602886) e com a extensão “*easyspin*”. O *script* empregado nas seleções é descrito abaixo:

**% Importar dados**

```
[B,spc] = textread('nome do arquivo.txt','%f%f');
plot(B,spc);
```

**% Parâmetros de simulação**

```
Exp.mwFreq = 9.5; % Frequência de micro-ondas (GHz)
Exp.Range = [min(B) max(B)]; % Faixa de campo magnético (mT)
Exp.nPoints = numel (B); % Número de pontos no espectro
```

**% Parâmetros experimentais**

```
Sys0.Nucs = 'M'; % Núcleo paramagnético
Sys0.n = 1; % Quantidade de núcleos
Sys0.g = [2.03 2.18 1.8] % Tensores giromagnéticos gx, gy e gz
Sys0.A = [159 0.37 30]; % Acoplamento hiperfino A (MHz)
Sys0.lwpp = 3.3; % Largura da linha (MHz)
```

**% Simulação do espectro de EPR**

```
Vary.g = [0.5 0.5 0.5];
Vary.A = [100 100 100];
Vary.lwpp = 1;
esfit(@pepper, spc, Sys0, Vary, Exp);
```

#### 4.12 Efeito dos compostos de coordenação na respiração celular

Para avaliar o consumo de oxigênio mitocondrial, células C6 ( $3 \times 10^5$  células por placa) foram cultivadas em placas de Petri por 24 h. Em seguida, as células foram pré-incubadas com compostos de coordenação ou PBS por 48 h, seguido de exposição ao rotenona ( $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) por 1 h. Aproximadamente um milhão de células suspensas (em DMEM 5% FBS) foram carregadas nas câmaras do oxígrafo OROBOROS sob agitação contínua a 750 rpm a  $37^\circ\text{C}$ . Após a estabilização do sinal, foram registradas as taxas de consumo de oxigênio basal (OCR), definidas como a respiração com os substratos fisiológicos no meio de crescimento. A ATP sintase foi inibida com oligomicina ( $1,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e a OCR-ATP desacoplada foi registrada. Em seguida, o ionóforo de próton carbóxilo cianeto 4-(trifluorometoxi) fenilidrazona (FCCP, desacoplador da fosforilação oxidativa) foi usado em incrementos de  $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  para determinar a OCR máxima ou capacidade respiratória máxima. A respiração foi inibida pela aplicação de  $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  de antimicina A para determinar a OCR não mitocondrial (consumo residual de oxigênio). O software DatLab (Oroboros Instruments) foi usado para a aquisição e análise dos dados. A diferença na OCR foi comparada com o grupo controle (PBS).<sup>205,206</sup>

#### 4.13 Efeito dos compostos da série hp em edema de pata de camundongo

Os compostos que obtiveram melhor capacidade de inibir a geração de  $\text{NO}_x$  foram utilizados no estudo *in vivo*. Nesse experimento, o objetivo foi avaliar o efeito dos compostos da série hp no edema de pata induzido por carragenina. Camundongos *swiss* machos de 06 meses de idade foram utilizados nesse modelo (CEUA 8680260822).

Os animais foram submetidos a um pré-tratamento com os compostos de coordenação, os quais foram administrados por via intraperitoneal nas concentrações de 2 e  $8 \text{ mg kg}^{-1}$ . Posteriormente, uma injeção intradérmica, contendo  $300 \mu\text{g}$  de carragenina, foi administrada na pata traseira esquerda de cada camundongos. A massa do edema foi mensurada nos intervalos de tempo de 0,5, 1, 2, 4, 24, 48 e 72 h, utilizando uma balança de precisão eletrônica, conforme o princípio de Arquimedes.<sup>207</sup> A dexametasona, um potente agente anti-inflamatório, foi empregada como controle positivo.

#### **4.14 Análise estatística**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas utilizando análises de variância (ANOVA) de um ou duas vias e também o teste “t” de Student não pareado quando apropriado. Posteriormente, comparações entre grupos foram realizadas com o emprego dos testes *post hoc* de Tukey. Todos os testes foram realizados utilizando o pacote de software Statistica ® (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Síntese e caracterização

Os pré-ligantes hpclnol e salen foram sintetizados de acordo com rotas sintéticas previamente descritas na literatura. Para a obtenção do hpclnol, o precursor bmpa foi sintetizado, caracterizado e reagido com epiclorigidina. O produto dessa síntese foi um óleo de cor castanha, com rendimento de 59%. O salen foi sintetizado por meio da reação entre etilenodiamina e salicilaldeído, na proporção 1:2, obtendo-se um sólido amarelo com rendimento de 78%. Após a obtenção dos pré-ligantes, o hpclnol foi devidamente armazenado em um frasco de vidro e mantido em refrigeração (geladeira) e o ligante salen foi armazenado em dessecador.

A caracterização das moléculas orgânicas foi realizada por meio das técnicas de  $^1\text{H}$  RMN e espectroscopia na região do infravermelho. Os valores de deslocamento químico e número de onda estão dispostos na Tabela 1 em Apêndices, e os espectros correspondentes são exibidos nas Figura 1A e 2A, ambos em Apêndices.

Os compostos de coordenação também foram sintetizados por meio de rotas sintéticas previamente descritas na literatura, pelo nosso grupo de pesquisa.<sup>34,38,39</sup> Assim, as caracterizações realizadas foram feitas com o intuito de confirmação das estruturas obtidas bem como da pureza dos compostos, comparando-se os dados obtidos com aqueles já disponíveis para estes compostos. Monocristais azuis e vermelhos de CuHP e FeHP, respectivamente, foram obtidos no intervalo de 3 a 6 dias após a reação de complexação e um sólido amorfo de coloração bege foi obtido para o composto MnHP imediatamente após a reação de síntese. O rendimento de cada síntese é apresentado no Quadro 1.

A coordenação do ligante hpclnol ao centro metálico foi inicialmente confirmada pela técnica de espectroscopia na região do infravermelho. Os estiramentos característicos da piridina ( $\nu_{\text{C}=\text{C}}$  e  $\nu_{\text{C}=\text{N}}$ ), atribuídos ao hpclnol isolado, foram respectivamente observados em 1592, 1570, 1475 e 1434  $\text{cm}^{-1}$ . Após a coordenação com o centro metálico, esses mesmos estiramentos aromáticos de  $\text{C}=\text{C}$  e  $\text{C}=\text{N}$  foram deslocados para regiões de maior número de onda, variando de acordo com o centro de metal presente no composto. Isso é um indicativo de uma alteração nas propriedades vibracionais dos grupos funcionais presentes na estrutura do ligante, o qual agora se encontra coordenado ao centro metálico.

Além disso, o espectro na região do infravermelho para composto FeHP exibiu uma banda distinta, correlacionada a formação de uma ponte ( $\mu$ -Oxo) entre os centros de  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . O estiramento assimétrico Fe–O–Fe foi observado em  $830\text{ cm}^{-1}$  e está destacado em laranja na Figura 20. Esta banda tem sido bastante evidenciada em complexos de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  contendo ponte ( $\mu$ -Oxo).<sup>208,209</sup> A confirmação da coordenação do ligante salen ao centro de  $\text{Mn}^{\text{III}}$  foi evidenciada pelo desaparecimento da banda localizada em  $3436\text{ cm}^{-1}$ , a qual foi previamente atribuídas ao estiramento da ligação OH do grupo fenol. Os espectros do ligante hpclnol, salen e seus respectivos compostos são apresentados na Figura 3A e 4A em Apêndices.

O ponto de fusão, ou faixa de degradação, foi determinado para cada um dos compostos de coordenação estudados e os valores foram comparados com aqueles disponíveis na literatura. Essa técnica foi empregada como uma forma de caracterização e como critério da pureza dos compostos obtidos. Nesse contexto, os pontos de fusão obtidos para cada um dos compostos de coordenação estiveram em consonância com as expectativas, solidificando a confirmação da síntese dos compostos, bem como a pureza de cada composto.

A fórmula empírica e massa molar de cada composto foram determinadas por meio dos percentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio obtidos através da técnica de análise elementar. Além de confirmar a pureza, esses dados também corroboraram com a estrutura dos compostos de coordenação, propostas por outras técnicas, como difração de raios X de monocristal, condutivimetria e voltametria cíclica. Os dados obtidos através da análise elementar estão descritos no Quadro 1 na página 55.

Os espectros eletrônicos dos compostos de coordenação foram registrados em DMSO, previamente seco em peneira molecular. As transições eletrônicas (intra-ligante e de transferência de carga) foram identificadas através da determinação do coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ). O espectro eletrônico composto CuHP, registrado em DMSO, apresenta uma transição eletrônica do tipo d-d em  $\lambda = 700\text{ nm}$  ( $\epsilon = 127\text{ mol L}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ). O espectro eletrônico composto FeHP, também DMSO, mostra três transições eletrônicas, sendo uma transferência de carga do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  em  $\lambda = 253\text{ nm}$  ( $\epsilon = 1,2 \times 10^4\text{ mol L}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ) e duas transferência de carga ligante metal em  $\lambda = 342$  e  $437\text{ nm}$  ( $\epsilon = 5,5 \times 10^3$  e  $3,8 \times 10^3\text{ mol L}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ )  $\text{Cl} \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}$  ou  $\text{DMSO} \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}$ . O espectro eletrônico composto MnHP apresenta uma única transição de transferência de carga do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  em  $\lambda = 270\text{ nm}$  ( $\epsilon = 1,2 \times 10^4\text{ mol L}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ). Esses dados estão em consonância com as transições eletrônicas descritas na literatura para os mesmos compostos, fazendo-se a

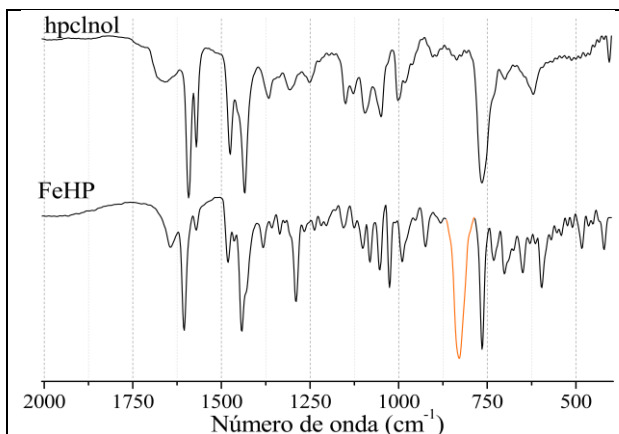
ressalva que os espectros relatados na literatura foram registrados em acetonitrila. Os valores dos coeficientes de absorvidade molar são exibidos no Quadro 1 e os espectros eletrônicos são apresentados na Figura 5A, 6A e 7A (Apêndices). O espectro eletrônico e estrutura do FeHP estão disponíveis na Figura 21.

Os voltamogramas cíclicos para os compostos de coordenação foram registrados em DMSO previamente seco em peneira molecular, empregando-se ferroceno como padrão eletroquímico interno. O voltamograma do CuHP exibe um processo *quasi-reversível*, atribuído ao par redox  $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{II}}$  com  $E_{pa}$  e  $E_{pc}$  em -156 /-470 mV vs NHE, respectivamente. Para o composto FeHP, o voltamograma cíclico exibiu dois processos *quasi-reversíveis*, os quais se referem às reações redox envolvendo os dois centros de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  do composto binuclear. Os dois processos de redução do  $\text{Fe}^{\text{III}}$  para  $\text{Fe}^{\text{II}}$  ocorrem em -293 e -797 mV vs NHE, enquanto os dois processos relativos às reações de oxidação de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  para  $\text{Fe}^{\text{III}}$  aparecem em -612 e 165 mV vs NHE, respectivamente. O voltamograma cíclico do composto FeHP é exibido na Figura 22. No voltamograma cíclico do composto MnHP, o processo *quasi-reversível* atribuídos ao par redox  $\text{Mn}^{\text{II}}/\text{Mn}^{\text{III}}$  aparecem em -50 e -372 mV vs NHE para  $E_{pa}$  e  $E_{pc}$ , respectivamente. Os valores de  $E_{pa}$  e  $E_{pc}$  para o EUK-8, atrelados ao o processo *quasi-reversível* atribuídos ao par redox  $\text{Mn}^{\text{II}}/\text{Mn}^{\text{III}}$  são observados respectivamente em -270 e -440 mV vs NHE. Os dados eletroquímicos correspondentes a esses compostos são inéditos e estão apresentados na Quadro 1. Na literatura, os valores de potenciais catódico e anódico estão registrados em solventes diferentes, sendo eles: acetonitrila e dimetilformamida, o que dificulta uma comparação direta. Os voltamogramas cíclicos para os compostos CuHP, MnHP e EUK-8 são apresentados na Figura 8A, 9A e 10A em Apêndices.

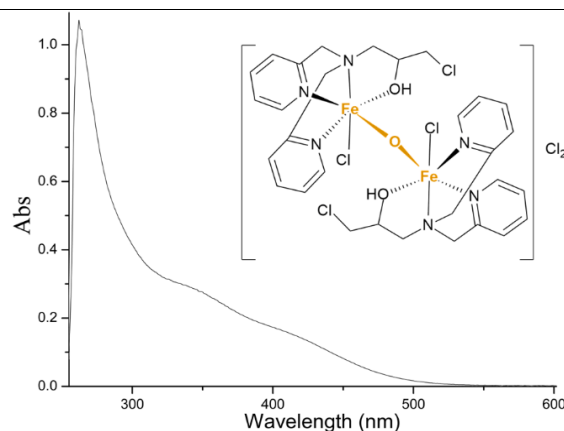
As medidas de condutivimetria dos compostos de coordenação foram realizadas em solução de metanol na concentração  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  e os resultados obtidos são apresentados no Quadro 1. Segundo Geary,<sup>210</sup> medidas de condutometria, em solução de metanol, para compostos de coordenação na concentração  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , exibem valores entre 0 e  $80 \text{ cm}^2 \Omega^{-1} \text{ mol}^{-1}$  e indicam a formação de um composto neutro; já valores ente 80 e  $120 \text{ cm}^2 \Omega^{-1} \text{ mol}^{-1}$  sugerem a formação de eletrólitos 1:1 em solução e acima de  $120 \text{ cm}^2 \Omega^{-1} \text{ mol}^{-1}$  indicam a formação de eletrólitos 1:2. Dessa forma, pode-se considerar os compostos MnHP e EUK-8 como neutros, e o composto CuHP e FeHP como eletrólitos do tipo 1:1 e 1:2, respectivamente, em metanol. Esses resultados corroboram com as propostas estruturais de todos os compostos.



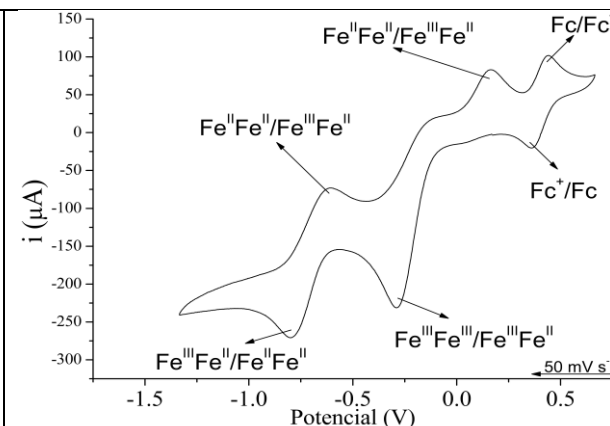




**Figura 20.** Espectros na região do IV para o ligante hpcInol (acima) e do FeHP (abaixo). Destaque em laranja: banda Fe-O-Fe, em  $830\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 21.** Espectro eletrônico e estrutura proposta para o FeHP, obtido em DMSO.



**Figura 22.** Voltamograma cíclico para o FeHP, obtido em DMSO.

**CuHP:** Cristal azul. Rend.: 62%.  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2\text{CuCl}_2$ . P.F (°C): 191.  $\epsilon$  ( $\text{nm/mol L}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ): 700/127. Epa/Epc em mV vs NHE: -156 /-470. CHN (%exp/%calc): C(40.56/40.27), H(4.54/4.81) e N(9.46/10.05).  $\kappa$ :  $91\text{ cm}^2\ \Omega^{-1}\text{ mol}^{-1}$

**FeHP:** Cristal vermelho. Rend.:52%.  $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{O}_3\text{Fe}_2\text{Cl}_6$ . P.F (°C): 179.  $\epsilon$  ( $\text{nm/mol L}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ): 378/150. Epa/Epc em mV vs NHE: (-293 e -797)/(-612 e 165) CHN (%exp/%calc): C(42.39/42.24), H(4.37/4.25) e N(9.66/9.85).  $\kappa$ :  $127\text{ cm}^2\ \Omega^{-1}\text{ mol}^{-1}$

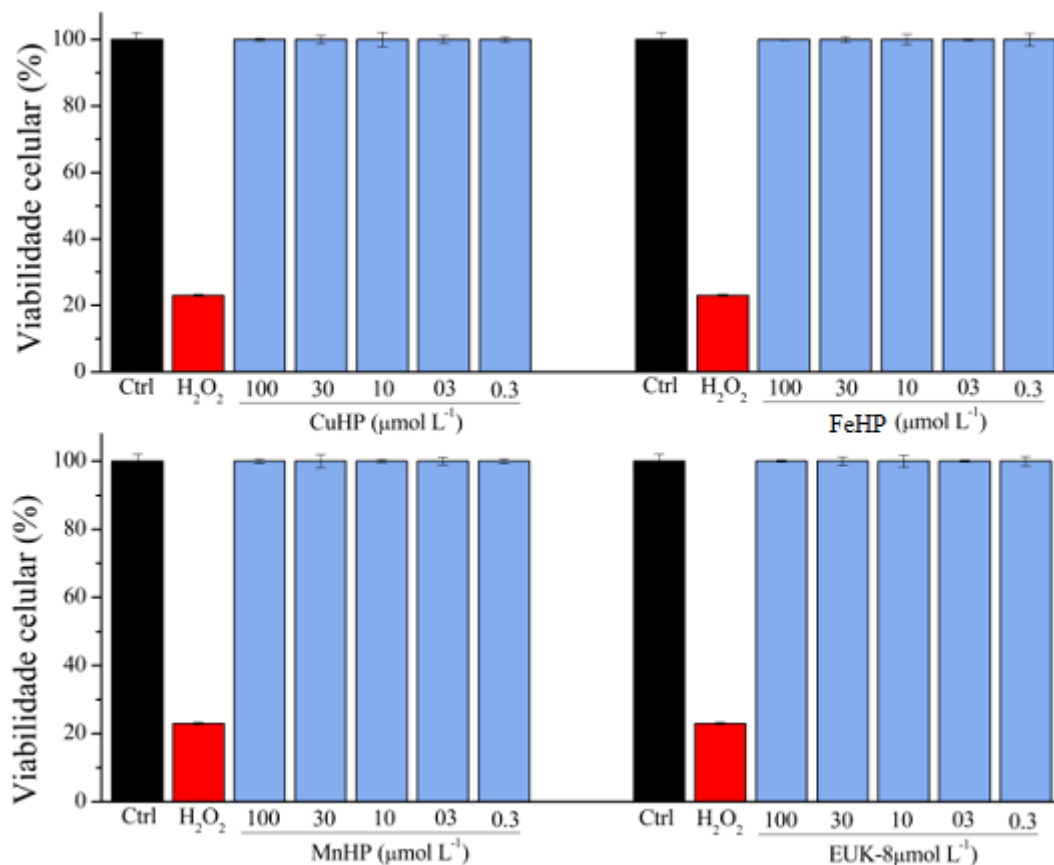
**MnHP:** Sólido bege. Rend.: 70%.  $\text{MnC}_{14}\text{H}_{16}\text{Cl}_3\text{N}_3\text{O}$ . P.F (°C): 217.  $\epsilon$  ( $\text{nm/mol L}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ): 270/11978. Epa/Epc em mV vs NHE: -50/-372. CHN (%exp/%calc): C(48.92/48.55), H(4.62/4.60) e N(7.13/7.16).  $\kappa$ :  $75\text{ cm}^2\ \Omega^{-1}\text{ mol}^{-1}$

**EUK-8:** Cristais marrons. Rend.: 66%.  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{MnCl}$ . F.D. (°C): 287 – 290. Epa/Epc em mV vs NHE: -270/-440. CHN (%exp/%calc): C(48.92/48.55), H(4.62/4.60) e N(7.13/7.16).

## 5.2 Estudo de viabilidade celular (citotoxicidade)

Com o objetivo de avaliar o efeito citotóxico dos compostos pertencentes à série hp e do composto EUK-8, a viabilidade celular foi mensurada em células C6 utilizando o ensaio de MTT (Figura 23). Nesse ensaio,  $1 \times 10^4$  células C6 foram expostas a concentrações crescentes (100, 30, 10, 3 e  $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) dos diferentes compostos durante 24 h. O tratamento com  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi empregado como controle positivo.

Os resultados obtidos mostraram que concentrações inferiores a  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de todos os compostos testados não afetaram a viabilidade celular quando considerado o  $\text{IC}_{50}$  (concentração citotóxica que ocasiona um efeito adverso em 50% das células) ( $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ).



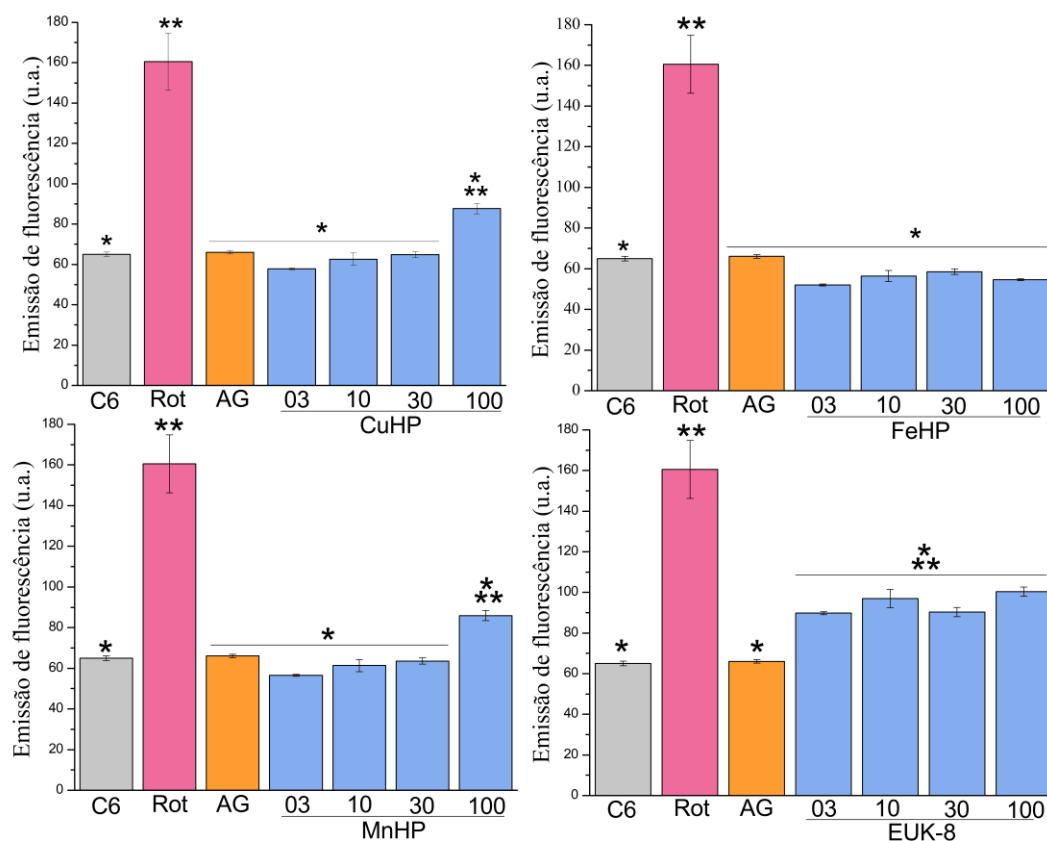
**Figura 23.** Avaliação da viabilidade celular dos compostos nas doses de 0,3 a  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  frente a células C6 através do ensaio colorimétrico de MTT. Cada barra representa a média de sobrevivência das células em experimentos independentes  $\pm$  erro padrão da média (n=4).

Esses resultados sugerem que os compostos da série hp apresentam baixa citotoxicidade e estão de acordo com resultados prévios do nosso grupo, mostrados em outras linhagens celulares.<sup>34,211</sup>

### 5.3 Avaliação da inibição da geração ERs *in vitro*

A capacidade de inibição da formação das ERs dos compostos de coordenação em estudo foi avaliada em dois modelos *in vitro* de estresse oxidativo induzido nos sistemas experimentais onde a produção de ERs foi induzida pela exposição a por (i) rotenona e a (ii) LPS. No modelo sistema (i) as ERs foram mensuradas através utilizando o fluoróforo DCF, e no modelo sistema (ii) os NOx foram mensurados pelo cromóforo azo, conforme descrito em Materiais e Métodos.

A Figura 24 mostra que as concentrações de 03, 10 e 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de todos os compostos pertencentes à série hp inibiram completamente a geração de ERs, mantendo a concentração basal de ERs. Especificamente, no caso do composto FeHP houve inibição das ERs de forma consistente em todas as concentrações testadas. Na concentração de 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , os compostos CuHP e MnHP inibiram em 80 % a formação de ERs, enquanto o EUK-8 inibiu apenas 60 %. Ademais, constatou-se que esses compostos da série hp inibiram as ERs de forma mais satisfatória que o composto EUK-8 nesse modelo de estresse oxidativo induzido por rotenona ( $F_{\text{tab}} > F_{\text{crit}}$ , considerando  $p = 0,05$ ).

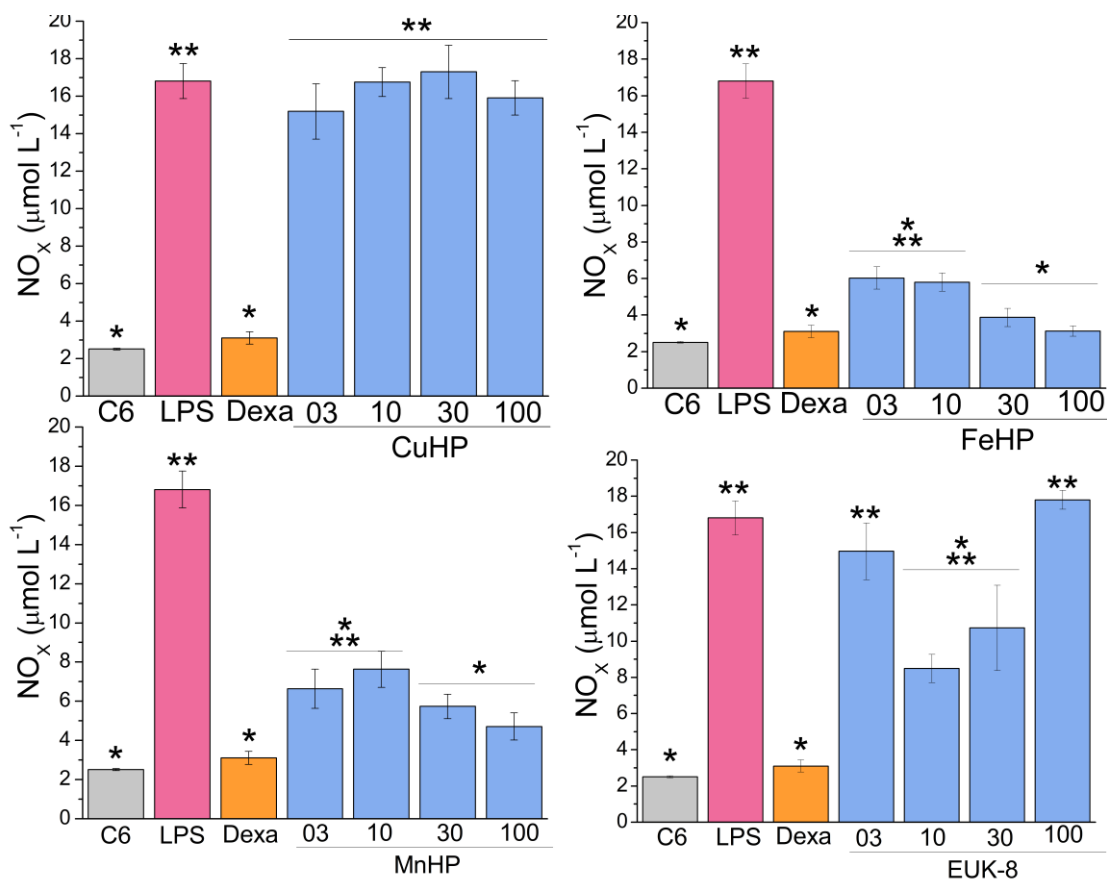


**Figura 24.** Redução da emissão de fluorescência (u.a.) em células C6, tratadas com os compostos de coordenação e submetidas ao estresse oxidativo, induzido por meio da rotenona (Rot) na concentração de

50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . O ácido gálico (AG) na concentração de 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  foi utilizado como controle positivo. A análise de variância (ANOVA) de dois fatores foi realizada com um valor de  $p < 0,05$  e os grupos foram agrupados em diferentes categorias representadas por asteriscos (\*) de acordo com suas similaridades estatísticas.

Os resultados para o modelo (ii) de estresse oxidativo são apresentados na Figura 25, a qual mostra que os compostos MnHP e FeHP inibiram a geração de NOx em todas as concentrações avaliadas. Destaca-se que, nas concentrações de 30 e 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , tanto o MnHP quanto o FeHP conseguiram restringir a geração de NOx aos níveis basais. Em relação ao composto EUK-8, a inibição da geração de NOx foi observada apenas nas concentrações de 10 e 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Em contrapartida, o composto CuHP inibiu a geração de NOx em nenhuma das concentrações avaliadas. Isso é um indicativo que esse composto não interage com o NOx, tampouco com as vias de sinalização celular envolvidas na resposta ao estresse oxidativo induzido por LPS.

Os resultados deste estudo demonstram que os compostos MnHP e FeHP também são eficientes moduladores de NO nesse modelo de estresse oxidativo. Embora o EUK-8 também revele atividade inibitória em determinadas concentrações, os compostos MnHP e FeHP destacam-se pela maior eficiência demonstrada. Por outro lado, o CuHP não exibiu atividade nesse modelo de estresse oxidativo.

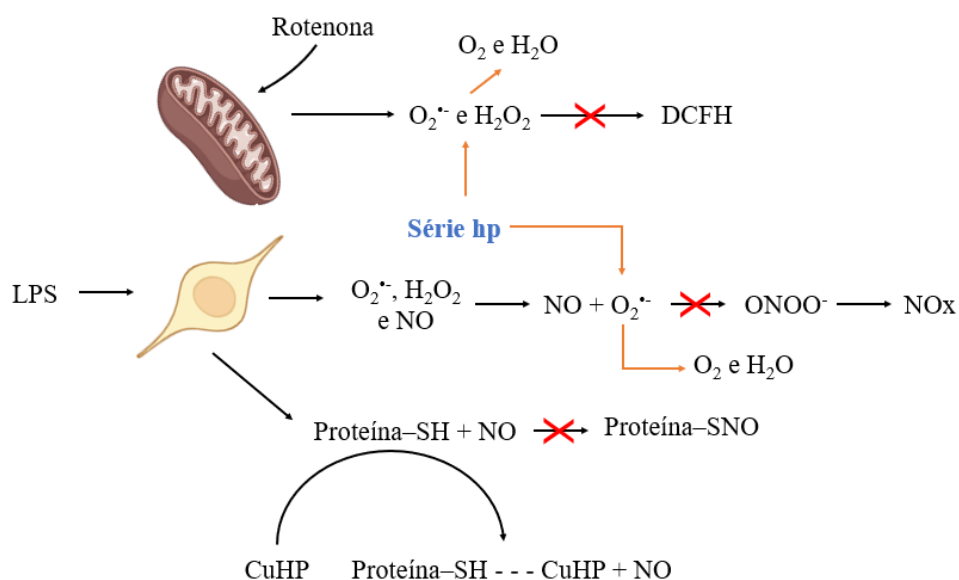


**Figura 25.** Inibição da produção de NO<sub>x</sub> em células C6 tratadas com os compostos de coordenação e submetidas ao estresse oxidativo, induzido por meio do LPS, na concentração de 50 µmol L<sup>-1</sup>. Dexametasona (Dexa), na concentração de 10 µmol L<sup>-1</sup>, foi utilizado como controle positivo. Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) com um valor de p<0,05 e os grupos foram agrupados em diferentes categorias representadas por asteriscos (\*) de acordo com suas similaridades estatísticas.

Através da interpretação dos dados obtidos nos sistemas acima apresentados, observa-se que a ordem de inibição na formação de ERs difere de acordo com a metodologia empregada. No sistema (i), observa-se a seguinte ordem de inibição da geração de ERs: FeHP > MnHP ~ CuHP > EUK-8. No entanto, para os resultados obtidos no sistema (ii), a sequência da inibição da geração de NO<sub>x</sub> observada foi: FeHP > MnHP > EUK-8 >> CuHP. Esses resultados ressaltam o papel do íon metálico central na modulação do estresse oxidativo.

A diferença na ordem de inibição pode estar relacionada aos diferentes tipos de ERs envolvidas em cada ensaio. O ensaio com o DCF indica a presença de ERs em geral. Assim, há uma maior diversidade de ERs que podem ser capturadas pelos compostos de coordenação. Deve ser aqui ressaltado, que o uso do controle negativo não comprometeu a fluorescência do DCF, sugerindo que os compostos não suprimem a fluorescência do DCF, mas sim das ERs que oxidam a sonda. Por outro lado, a metodologia que foi empregada para avaliar os NO<sub>x</sub>, identifica a formação de um

corante azo, o que também não permite identificar exatamente as ERs envolvidas no processo. A formação de NOx envolve uma série de mecanismos complexos, incluindo interações com o  $O_2^{\cdot-}$ , auto-oxidação, reações enzimáticas e interações com grupos heme.<sup>212</sup> Assim, os compostos de coordenação podem atuar de maneiras diversas na inibição da formação de NOx. Uma dessas abordagens envolve a redução dos níveis de  $O_2^{\cdot-}$  disponíveis, minimizando interações com o NO e reduzindo os níveis de NOx. Outra possibilidade é que esses compostos podem, também, estabelecer interações diretas com o NO. Entretanto, um cenário diferente se apresenta com o composto CuHP. Neste caso, notou-se a ausência de interações significativas com o NO. Apesar do composto demonstrar habilidade para interagir com ERs, essa interação aparentemente não é suficiente para reduzir os níveis dos compostos nitrogenados. Considerando que o composto não apresenta interações com o NO, é plausível considerar a possibilidade de que ele esteja direcionando suas interações para proteínas, evitando reações de nitrosilação, o que contribui para o aumento dos níveis de NO intracelular (Figura 25). De fato, alguns dados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, tem mostrado previamente que o composto CuHP apresenta atividade desnitrosilante. Todas essas possibilidades estão exemplificadas na Figura 26.



**Figura 26.** Propostas de mecanismos dos compostos da série hp envolvidos na modulação do estresse oxidativo induzido por rotenona e LPS em células C6

#### 5.4 Efeito dos compostos de coordenação na sobrevivência de *S. cerevisiae* *in vivo*

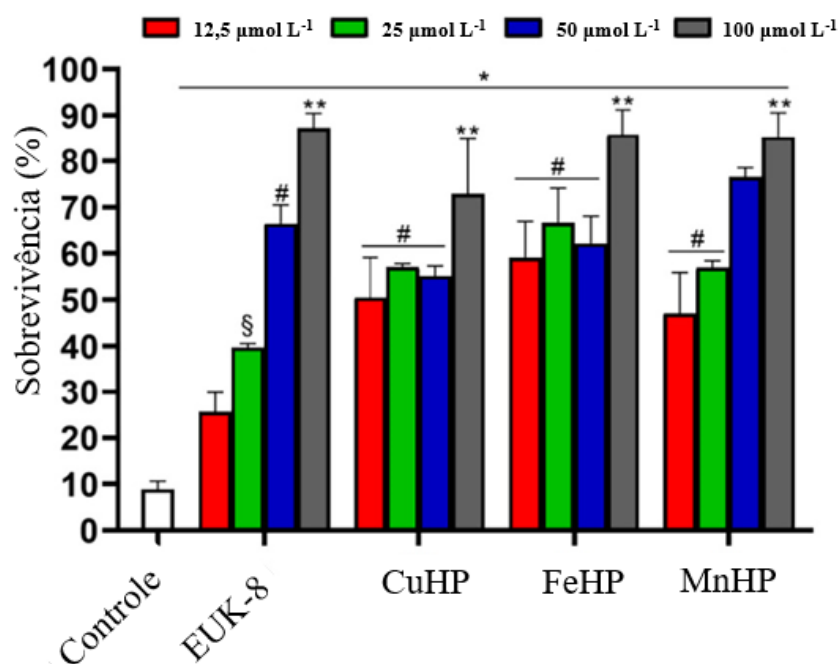
A utilização do modelo de células de levedura *S. cerevisiae* é uma prática comum na literatura<sup>213-216</sup> e já foi previamente adotada pelo nosso grupo de pesquisa

(seção 2.2). Na literatura, não existe uma concordância se os estudos envolvendo leveduras *S. cerevisiae* são considerados estudos *in vivo* ou *in vitro*. De qualquer forma, esse modelo envolve uma célula com uma membrana mais resistente a danos oxidativos. Nesse aspecto, optamos por induzir o estresse oxidativo por meio da reação de Fenton, a qual gera o radical hidroxil. Essa decisão se baseou na alta instabilidade e reatividade inerentes a esse radical. Ainda, é relevante enfatizar a ausência de uma enzima específica capaz de modular os níveis desse radical em sistemas biológicos, conferindo-lhe um potencial particularmente nocivo em termos de danos macromoleculares.

Em um estudo anterior<sup>34,37</sup>, já relatamos os efeitos dos compostos sobre a capacidade de sobrevivência da *S. cerevisiae* quando exposta a situações de estresse oxidativo causadas pelo  $H_2O_2$  e pelo  $O_2^{\cdot-}$ . Essa abordagem atual se concentra no estresse oxidativo induzido pelo radical  $\cdot OH$  e tem como parâmetro de avaliação a sobrevivência celular. Assim, analisamos quantas células, que foram previamente tratadas com os compostos da série hp, conseguiram permanecer vivas em condições de estresse oxidativo provocado pelo  $\cdot OH$ .

Na Figura 27, podemos observar os resultados relativos à sobrevivência das células de *S. cerevisiae* após o pré-tratamento com os compostos de coordenação, indicando aumento na viabilidade celular. Especificamente, o composto CuHP, quando administrado em uma concentração de  $12,5 \mu mol L^{-1}$ , desencadeou o aumento na sobrevivência das leveduras em até 50%, com um efeito semelhante ( $p < 0,05$ ) observado nos tratamentos utilizando as concentrações de  $25 \mu mol L^{-1}$  e  $50 \mu mol L^{-1}$ . Adicionalmente, o tratamento com a concentração de  $100 \mu mol L^{-1}$  também resultou em um aumento notável na sobrevivência celular, atingindo 75% de viabilidade nesse modelo específico de estresse oxidativo, empregando-se esse modelo de estresse oxidativo com  $\cdot OH$ .

O pré-tratamento com a menor concentração de FeHP ( $12,5 \mu mol L^{-1}$ ) elevou a sobrevivência celular de 7,5% para 67,5%. Resultados semelhantes foram observados para as concentrações de  $25 \mu mol L^{-1}$  e  $50 \mu mol L^{-1}$ . No entanto, quando as células foram tratadas com  $100 \mu mol L^{-1}$  de FeHP, a sobrevivência aumentou para mais de 85%, quase restaurando a sobrevivência total das células controle (sem estresse induzido pelo  $\cdot OH$ ).



**Figura 27.** Sobrevivência das células de *S. cerevisiae* pré-tratadas com os compostos da série hp e expostas ao radical hidroxil. \*Indica resultados estatisticamente diferentes das condições de geração do  $\bullet\text{OH}$ ; \*\*Indica resultados estatisticamente diferentes das condições de geração do  $\bullet\text{OH}$  da concentração menor testada de cada composto; #Indica resultados estatisticamente diferentes de 12,5 e 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de EUK-8; §Indica resultados estatisticamente diferentes de 12,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de EUK-8.

Quanto ao composto MnHP, observou-se resposta dependente da concentração, em que a sobrevivência das células de levedura foi de 48% na menor concentração, aumentando para 56% e 76% nos tratamentos com 25 e 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. O tratamento das células de levedura com 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de MnHP resultou em uma sobrevivência de 86%, assim como observado para o FeHP.

O tratamento das células com EUK-8 também aumentou a sobrevivência da levedura de maneira dependente da dose contra o estresse oxidativo. No entanto, este composto apresenta capacidade reduzida de melhorar a sobrevivência da levedura em comparação com os compostos da série hp. O EUK-8 alcançou um perfil de proteção celular equivalente aos compostos da série hp apenas acima de 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Esses resultados demonstram que os compostos pertencentes a série hp apresentaram uma melhor capacidade de atuar como antioxidante sintético em comparação com EUK-8, sob condição de estresse oxidativo induzido pelo  $\bullet\text{OH}$ .

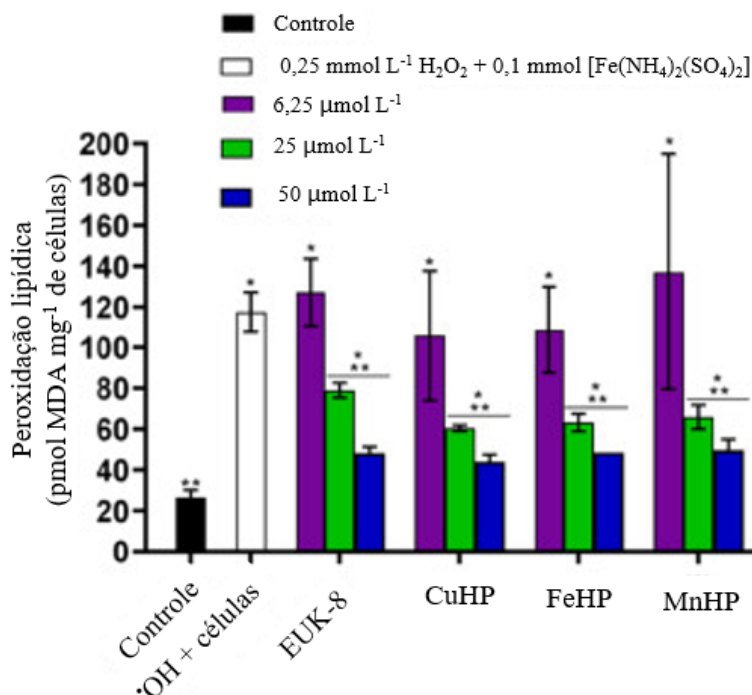
Além disso, foi realizado tratamento das células com o ligante hpclnol, o qual não induziu efeito no estresse induzido pelo  $\bullet\text{OH}$ . Esses resultados corroboram nossos trabalhos anteriores, que indicam a ausência de proteção do ligante hpclnol contra  $\text{H}_2\text{O}_2$



e  $O_2^{\bullet-}$ . Esses dados sugerem que a atividade antioxidante desses compostos de coordenação está atrelada aos seus centros metálicos, e não apenas ao ligante em si.

### 5.5 Avaliação da atividade dos compostos de coordenação na redução do dano oxidativo: monitoramento da LPO *in vivo* e *ex vivo*

Os resultados anteriores mostraram que os compostos estudados aumentam a sobrevivência das células de levedura expostas previamente ao estresse causado pelo  $\bullet OH$ . Este resultado positivo motivou a investigação da capacidade destes compostos inibirem a oxidação lipídica induzida pelo  $\bullet OH$ , empregando-se a levedura como modelo de estudo *in vivo*. Assim, surgiu a necessidade de avaliar se o tratamento das células de *S. cerevisiae* com os compostos em questão seria capaz de inibir a LPO induzida pelo  $\bullet OH$ . Vale ressaltar que a formação de lipoperóxidos está relacionada a danos às biomoléculas e comprometimento de estruturas e funções celulares importantes. Na Figura 28, fica evidenciado que todos os compostos avaliados conseguiram prevenir a LPO nas células de *S. cerevisiae*. Essa prevenção se traduziu em uma redução na emissão de fluorescência em quase três vezes em comparação com as células que foram submetidas ao estresse provocado pelo  $\bullet OH$ .



**Figura 28.** Redução da peroxidação lipídica em células de *S. cerevisiae* tratadas com os compostos pertencentes a série hp e expostas a condições de estresse pelo radical hidroxil. A análise estatística foi realizada usando o teste t, com  $P < 0,05$ . \*Indica resultados estatisticamente diferentes do controle. \*\* Indica resultados estatisticamente diferentes das condições geradoras do  $\bullet OH$ .

Nas células controle, que não receberam nenhum tratamento e não estavam sujeitas a condições de estresse, os níveis de oxidação lipídica foram muito baixos, em torno de 40 pmol MDA mg<sup>-1</sup> de célula. Sob condição de estresse do radical hidroxil, a peroxidação lipídica aumentou significativamente, atingindo níveis 4,5 vezes mais altos do que o controle. Considerando as células tratadas com os compostos da série hp, observou-se redução nos níveis de peroxidação lipídica sob estresse do radical hidroxil. Para determinar qual composto foi mais eficaz na redução da oxidação lipídica, a IC<sub>50</sub> de cada composto foi determinada traçando uma curva de regressão não linear com os valores absolutos da peroxidação de lipídios.

De acordo com a Tabela 2, os valores de IC<sub>50</sub> obtidos para os compostos CuHP e FeHP foram menores do que o exibido pelo MnHP e pelo [Mn(salen)Cl]. Assim, a ordem decrescente na redução da oxidação lipídica é: CuHP > FeHP > MnHP ~ EUK-8

**Tabela 2.** Valores de IC<sub>50</sub> para oxidação de lipídios em *S. cerevisiae*, calculados por meio de uma curva de regressão não-linear. Esses valores foram obtidos através de dados experimentais apresentados na Figura 28.

Compostos de coordenação	IC <sub>50</sub> em μmol L <sup>-1</sup>
CuHP	30,7 ± 2,4
FeHP	36,2 ± 1,0
MnHP	39,4 ± 1,9
EUK-8	41,8 ± 0,38

Devido aos resultados obtidos utilizando *S. cerevisiae*, investigamos o efeito protetor desses compostos de coordenação em preparações de fígado de camundongo *swiss*, que é mais sensível à LPO do que *S. cerevisiae*. Assim, as preparações de fígado de camundongos foram pré-tratados com os compostos e posteriormente expostos ao estresse induzido pelo <sup>•</sup>OH.

Antes da investigação do efeito protetor em modelos celulares, as preparações de fígado de camundongo foram tratado com diferentes concentrações tanto de [Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>] quanto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para estabelecer as condições ótimas para o estresse do <sup>•</sup>OH. A combinação de 50 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 5 mmol L<sup>-1</sup> de [Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>] foi a mais efetiva na geração do <sup>•</sup>OH e na promoção da LPO, aumentando os níveis de TBARS em 283%. A geração do radical hidroxil foi confirmada por espectroscopia de EPR com o emprego do *spin trap* DMPO.

O pré-tratamento com o MnHP, na concentração de 25  $\mu\text{M}$ , inibiu a LPO a níveis basais. Em contraste, os compostos CuHP e FeHP aumentaram os níveis de MDA em até 57% e 93%, respectivamente, na mesma concentração. Uma vez que foi observada uma atividade pró-oxidante dos compostos nessa concentração, investigou-se se concentrações mais baixas poderiam demonstrar atividades protetoras contra a LPO. De fato, como mostrado na Tabela 3, os compostos CuHP e FeHP reduziram a LPO quando aplicados em concentração mais baixa. Foi observada uma melhora na capacidade antioxidante em relação ao fígado de camundongo, com  $\text{IC}_{50}$  na faixa de nanomolar, seguindo a sequência:  $\text{CuHP} > \text{FeHP} > \text{MnHP} \gg [\text{Mn}(\text{salen})\text{Cl}]$ , indicando a atividade antioxidante menos satisfatória para o composto EUK-8.

Tabela 3 Valores de  $\text{IC}_{50}$  para oxidação de lipídios em fígado de camundongo, calculados por meio de uma curva de regressão não-linear.

<b>Compostos de coordenação</b>	<b><math>\text{IC}_{50}</math> em <math>\text{nmol L}^{-1}</math></b>
CuHP	$0,48 \pm 0,03$
FeHP	$0,60 \pm 0,05$
MnHP	$0,69 \pm 0,01$
EUK-8	$42,75 \pm 3,50$

De modo geral, esses resultados indicam que todos os compostos testados tiveram um impacto positivo na sobrevivência das células de levedura, além de reduzirem a peroxidação lipídica em um sistema biológico submetido ao estresse pelo  $\cdot\text{OH}$ . Nesse contexto, é notável que, embora todos os compostos de coordenação tenham demonstrado aprimorar a capacidade de *S. cerevisiae* sobreviver ao estresse causado pelo  $\cdot\text{OH}$ , as taxas mais elevadas de sobrevivência com doses mais baixas foram alcançadas com o tratamento envolvendo o FeHP. O tratamento das células com CuHP e MnHP também resultou em um aumento na sobrevivência celular diante do estresse provocado pelo  $\cdot\text{OH}$ .

No que se refere à proteção contra danos macromoleculares, o composto CuHP exibiu o efeito inibitório mais pronunciado na inibição da peroxidação lipídica em ambas as matrizes biológicas estudadas. Assim, a ordem de eficácia contra a peroxidação lipídica para ambos os modelos foi  $\text{CuHP} > \text{FeHP} > \text{MnHP} > \text{EUK-8}$ .

No entanto, é interessante que os valores de  $\text{IC}_{50}$  obtidos no modelo com homogeneizado de fígado de camundongo foram  $10^3$  vezes inferiores aos observados

nas leveduras, e essa discrepância pode estar relacionada às intrincadas complexidades dos sistemas biológicos em questão. A homogeneização do fígado resultou na completa desestruturação do órgão, o que possivelmente influenciou a maneira como os compostos de coordenação foram absorvidos e distribuídos. Essa alteração na distribuição pode ter consequentemente afetado as concentrações eficazes dos compostos e, por consequência, os valores de  $IC_{50}$  obtidos. Além disso, a composição distinta entre as duas matrizes biológicas pode ter desempenhado um papel no efeito observado nos compostos de coordenação. É relevante destacar que o fígado é um órgão de elevado metabolismo e repleto de enzimas que podem atuar de diferentes formas com os compostos, resultando em uma atividade bioquímica ampliada.

Vários compostos de coordenação têm sido sintetizados com o objetivo de desenvolver novos antioxidantes capazes de eliminar os radicais hidroxil. Recentemente, um novo composto de manganês, contendo o ligante derivado do salen, foi sintetizado e mostrou alta capacidade de neutralizar os radicais hidroxil *in vitro*.<sup>217</sup> Outra investigação indicou que o EUK-8, em concentrações variando de 0,5 a 5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , neutralizou efetivamente os radicais hidroxil gerados pela combinação de 0,1  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{FeCl}_3$ , 0,1  $\text{mmol L}^{-1}$  de ácido ascórbico e 1  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de maneira dose-dependente.<sup>217</sup> Além disso, foi relatado que o complexo polissacarídeo de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (FePS) também atua como neutralizador de radicais hidroxil e  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , com redução nos níveis de peroxidação de lipídios.<sup>218</sup> No entanto, nenhum desses complexos foi testado em modelos celulares expostos a um sistema gerador de radicais hidroxil. De fato, não há dados na literatura relatando a aplicação de antioxidantes sintéticos para promover a sobrevivência celular e atenuação da peroxidação lipídica em um sistema biológico exposto ao estresse do radical hidroxil.

## **5.6 Investigação e propostas de mecanismo de ação antioxidante apresentados pelos compostos de coordenação da série hp**

### **5.6.1. Interação dos compostos de coordenação da série hp e EUK8 com o $\text{O}_2^{\cdot-}$**

Embora tenha sido estabelecido que os compostos de coordenação atuam como antioxidantes em modelos de estresse oxidativo, ainda não exploramos em detalhes os mecanismos pelos quais esses compostos capturam as ERs. Por esse motivo, optamos por direcionar nossa investigação para as ERs mais frequentemente citadas na literatura: o  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o radical hidroxil.

Inicialmente, uma reação teste foi realizada para avaliar as alterações nas soluções e investigar as possibilidades de análises. Soluções isoladas de cada composto foram preparadas em DMSO seco. Em seguida, algumas gotas da solução de superóxido de potássio ( $\text{KO}_2$ ), também preparada em DMSO seco, foram adicionadas em cada tubo. Aquecimento do tubo de ensaio e formação de bolhas foram observados para todos os compostos, mas apenas o composto CuHP sofreu alteração de cor de azul para amarelo esverdeado. Com isso, selecionamos a técnica de EPR para avaliar as possíveis alterações redox que ocorrem no centro de metal e a técnica de espectroscopia eletrônica para avaliar as transições eletrônicas no CuHP, visto que foi o único a apresentar mudança de coloração.

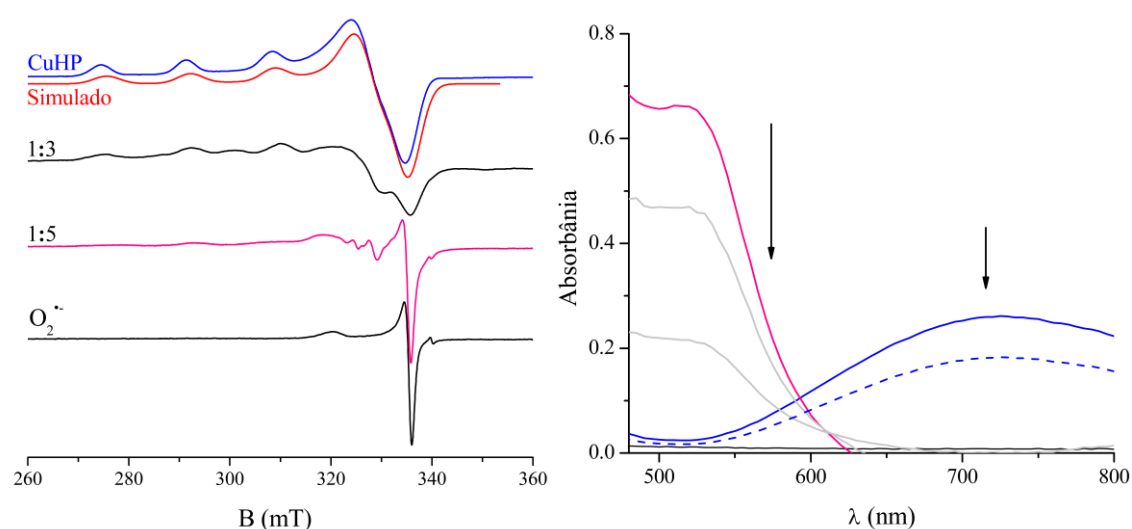
O composto CuHP apresentou espectros de EPR (Figura 29, em azul) característicos de um centro  $\text{Cu}^{\text{II}}$  com simetria axial ( $g_{\perp} = 2,06$ ) e um padrão de hiperfino associado ao quarteto ( $I = 3/2$ ) observado em  $g_{\parallel} = 2,26$ . O espectro do  $\text{O}_2^{\cdot-}$  exibiu o espectro de EPR anisotrópico, característico do mesmo, com valores de  $g$  na ordem  $g_{\perp} > g_{\parallel} > 2.0023$  ( $2,02 > 2,12 > 2.0023$ ). Ambas as soluções foram registradas em DMSO seco com peneira molecular e à uma temperatura de 100 K.

Em seguida, uma alíquota de cada solução com uma estequiometria de 1:1 de  $\text{CuHP}:\text{O}_2^{\cdot-}$  foram misturadas e, após 1 min, congeladas em nitrogênio líquido. O espectro de EPR foi registrado à 100 K e esse procedimento se repetiu com o aumento da estequiometria do  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Decréscimo gradual na intensidade das linhas de  $\text{Cu}^{\text{II}}$ , indicando uma transformação desse centro de metal em  $\text{Cu}^{\text{I}}$ , foi observado de acordo com o aumento da concentração do  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Em uma razão de 1:5, as linhas de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  foram completamente silenciadas e um novo conjunto de linhas central em  $g \sim 2$  apareceram, sugerindo a formação de um intermediário. Após a adição de mais um equivalente de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , o espectro é dominado pelas linhas típicas do  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Figura 29).

No que se refere ao intermediário formado, O'Young e Lippard<sup>219</sup> também observaram um conjunto de linhas similar ao reagir um composto de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  contendo um ligante salicilato com o  $\text{KO}_2$  e a formação do intermediário  $\text{Cu}^{\text{I}}-\text{O}_2^{\cdot-}$  foi sugerida. Para caracterizar esse intermediário na reação do CuHP com o  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , foi realizado um estudo usando a técnica de espectroscopia eletrônica, empregando a proporção estequiométrica 1:6, na qual o intermediário foi observado no EPR.

O espectro eletrônico do CuHP, registrado em DMSO seco (Figura 29), exhibe apenas uma transição eletrônica na faixa do visível em  $\lambda_{\text{max}} = 700 \text{ nm}$  com  $\epsilon = 127 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , sendo característico de uma transição do tipo d-d. Imediatamente após a adição

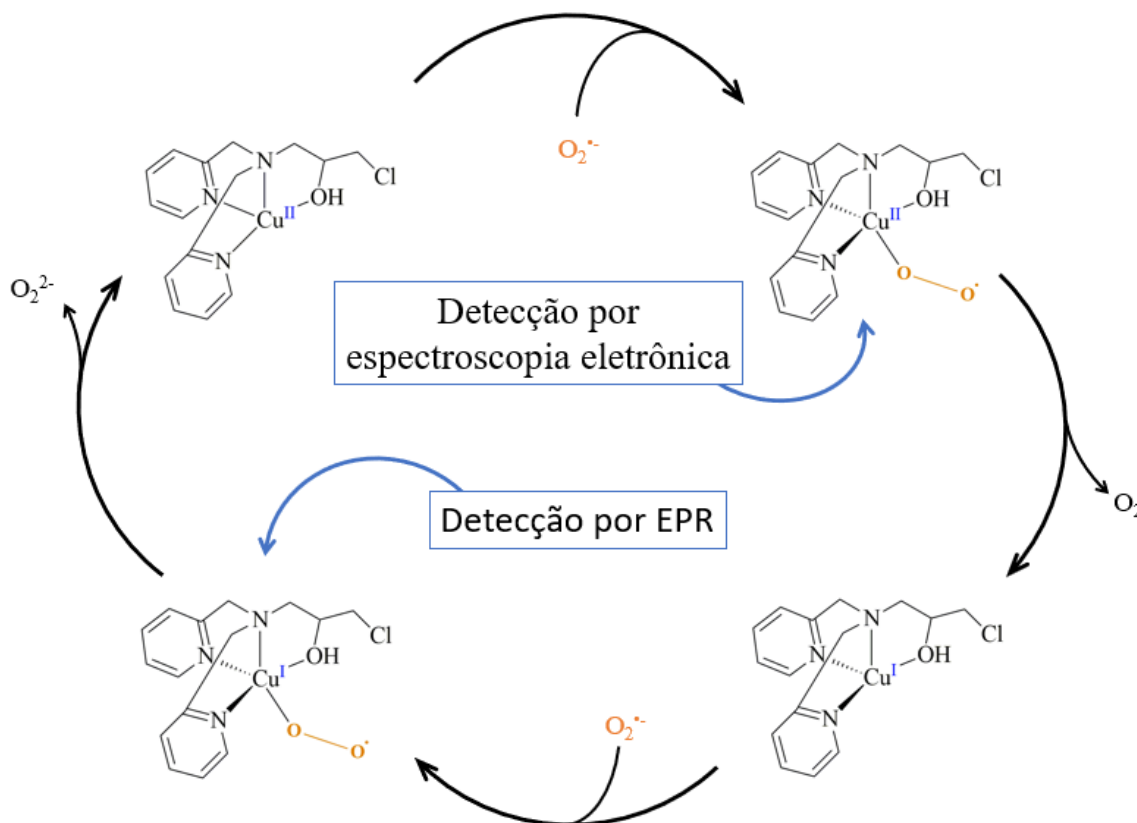
de  $\text{KO}_2$ , a coloração azul da solução muda para amarelo esverdeado. Um novo espectro eletrônico foi registrado à temperatura ambiente após 10 s de interação, mostrando o aparecimento de uma nova transição eletrônica em  $\lambda_{\text{max}} = 440 \text{ nm}$ , concomitante com o desaparecimento da transição d–d, indicando que o cobre(II) foi reduzido a cobre(I). Na literatura, foi descrito que espécies “superóxocobre” exibem bandas intensas (LMCT  $\text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{Cu}^{\text{I}}$ ) nessa faixa.<sup>220–222</sup> No entanto, essa transição eletrônica LMCT decai rapidamente (<60 s) e as transições do tipo d–d apenas retornam após 12 h de reação. Esse comportamento suporta a redução do  $\text{Cu}^{\text{II}}$  para  $\text{Cu}^{\text{I}}$  e a oxidação do  $\text{O}_2^{\cdot-}$  para  $\text{O}_2$ . Assim, é possível sugerir que a nova banda de absorção observada está caracterizando um intermediário  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{--O}_2^{\cdot-}$ .



**Figura 29.** Interação entre o CuHP e o  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , investigado por EPR (esquerda) e espectroscopia eletrônica (direita). O espectro do CuHP é mostrado em linha azul em ambos os espectros (linha pontilhada referente a 24 h após a interação). O intermediário formado “superóxocobre” é mostrado em rosa em ambos os espectros. O  $\text{O}_2^{\cdot-}$  não apresenta nenhuma transição eletrônica na faixa avaliada.

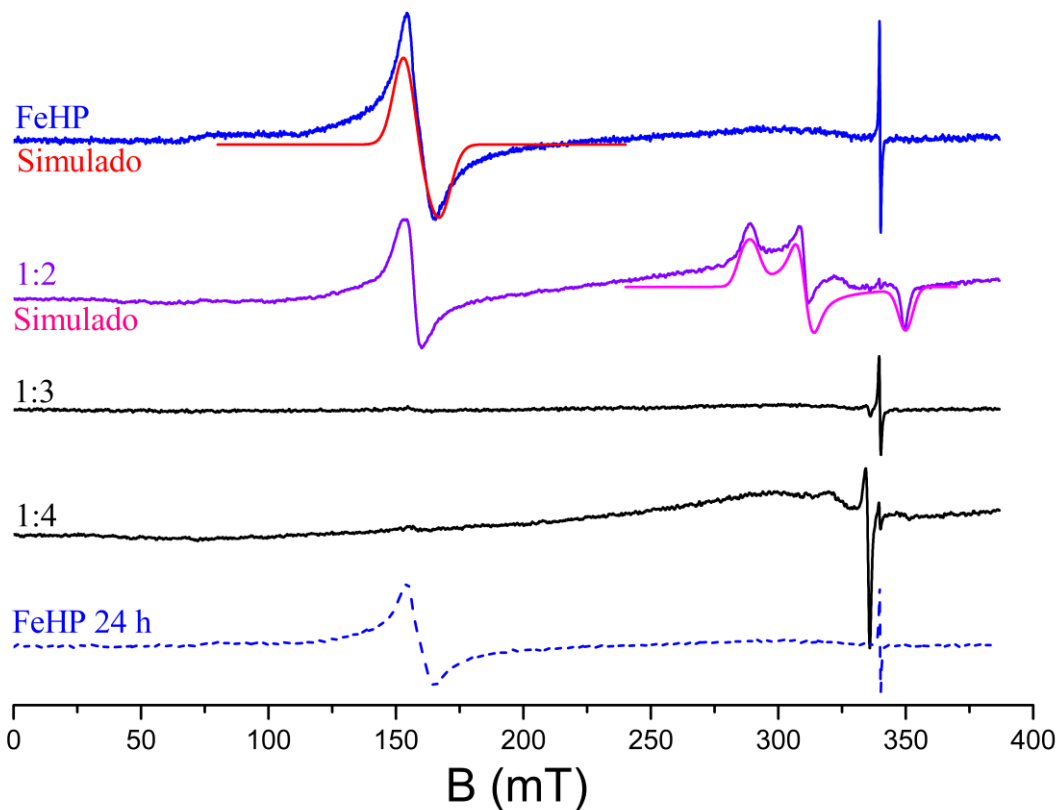
Os espectros EPR das amostras congeladas após 60 s de reação contendo CuHP e  $\text{KO}_2$ , mostram a diminuição do sinal de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  e o surgimento de um novo padrão de linhas, como discutido anteriormente. Neste momento (60 s), nenhuma banda de absorção é vista na faixa visível no espectro eletrônico. Considerando em conjunto os dados de EPR e de absorção eletrônica, o novo padrão de EPR observado em uma proporção CuHP: $\text{O}_2^{\cdot-}$  1:5 caracteriza outro intermediário, provisoriamente atribuído como  $\text{Cu}^{\text{I}}$ -superóxido. Na verdade, esse novo padrão parece estar relacionado ao  $\text{O}_2^{\cdot-}$  com uma simetria menor que a axial, o que pode ser resultado da coordenação do  $\text{O}_2^{\cdot-}$  ao centro de cobre(I). Com base nessa observação, a reatividade dos compostos de cobre com  $\text{O}_2^{\cdot-}$  pode ser representada pelos passos mostrados na Figura 30. É

importante destacar que os espectros eletrônicos medidos após 12 horas mostram que a transição d-d é restaurada, confirmando que o processo é reversível.

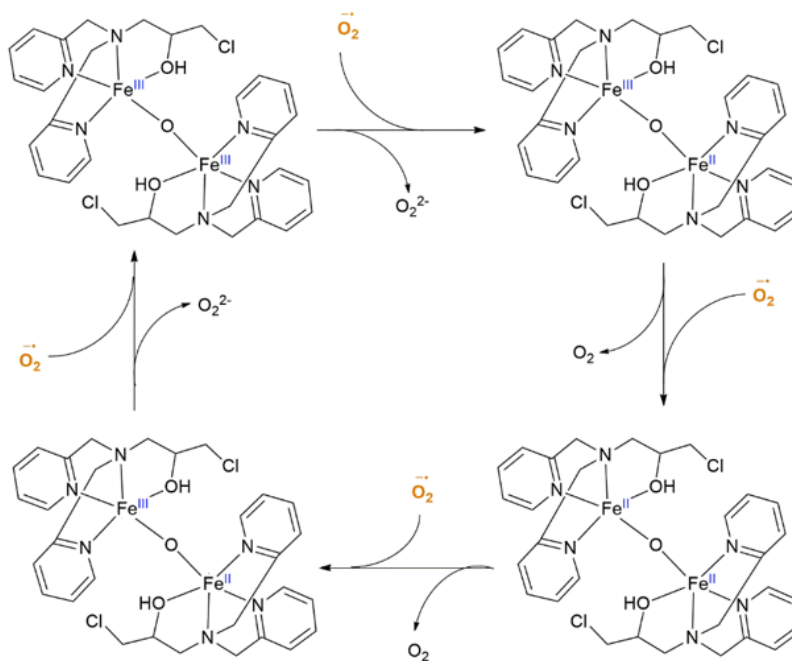


**Figura 30.** Proposta do mecanismo e intermediários formados na reação entre o CuHP e o  $O_2^{\bullet-}$  com base nos resultados obtidos por EPR e espectroscopia eletrônica.

A Figura 31 mostra o espectro de EPR do composto FeHP, registrado em DMSO seco, à 100 K. Neste espectro, observa-se um perfil isotrópico característico de centros de  $Fe^{III}$  ( $I = 1/2$ ), com  $g = 4,33$ . Quando o  $O_2^{\bullet-}$  é adicionado em proporções 1:1 e 1:2 em relação ao FeHP, a linha correspondente ao FeHP diminuem de intensidade. Simultaneamente, aparece um novo conjunto de linhas com perfil rômbo em  $g_x = 2,35$ ,  $g_y = 2,18$ ,  $g_z = 1,94$ . Esses sinais são interpretados como a formação de uma espécie de valência mista  $Fe^{III}-O-Fe^{II}$  com acoplamento antiferromagnético e com estado fundamental  $S = 1/2$ .<sup>223,224</sup> Na proporção 1:4, a linha referente ao composto desaparece completamente, sobrando apenas as linhas correspondentes ao  $O_2^{\bullet-}$ . Após 24 h de reação, um novo espectro de EPR foi registrado a partir dessa solução. Esse novo espectro exhibe novamente o sinal característico do  $Fe^{III}$ , fornecendo confirmação sólida da atividade catalítica intrínseca do composto. Uma proposta de mecanismo é mostrada na Figura 32.



**Figura 31.** Interação entre o composto FeHP e o  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , investigado por EPR. O espectro do composto FeHP é mostrado em azul. (linha pontilhada referente a 24 h após a interação). O intermediário formado em violeta.

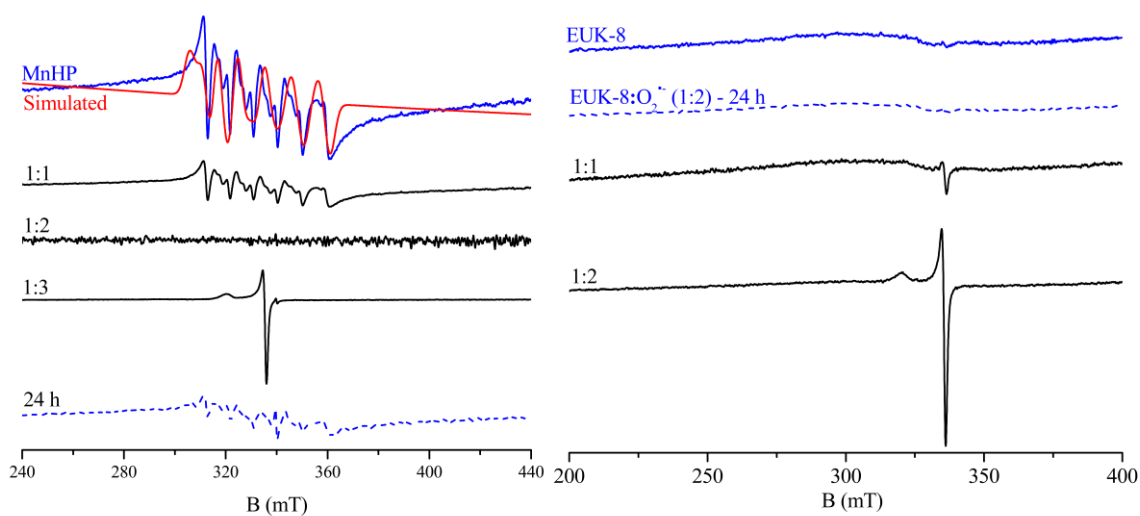


**Figura 32.** Proposta do mecanismo da reação entre o composto FeHP e o  $\text{O}_2^{\cdot-}$  com base nos resultados obtidos por EPR.

O espectro de EPR do composto MnHP, registrado em DMSO seco e à 100 K, é apresentado na Figura 33. Esse espectro exibe perfil rômboico ( $g_x = 2,07$   $g_y = 2,04$   $g_z = 2,01$ ) e contém seis linhas características do centro de manganês(II). Esses sinais são



resultantes da interação dos elétrons com o spin nuclear  $I = 5/2$  do isótopo  $^{55}\text{Mn}$ . Na presença do  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , as linhas referentes a centro de  $\text{Mn}^{\text{II}}$  são suprimidas, indicando oxidação do centro de  $\text{Mn}^{\text{II}}$  para  $\text{Mn}^{\text{III}}$  (diamagnético). O sinal atribuído ao  $\text{O}_2^{\cdot-}$  foi detectado apenas empregando-se a proporção estequiométrica de 1:3 de  $\text{MnHP}:\text{O}_2^{\cdot-}$ . Após 24 h, é possível observar as seis linhas correlacionadas ao centro de  $\text{Mn}^{\text{II}}$ , confirmando a ação catalítica. O mesmo estudo foi realizado com o EUK-8 (Figura 33), o qual possui um centro de  $\text{Mn}^{\text{III}}$  que é silencioso no EPR. Nesse caso, foi possível observar o sinal relacionado ao  $\text{O}_2^{\cdot-}$  em uma proporção de 1:0,5 em comparação com o sinal do composto EUK-8, sendo esse, o composto menos reativo frente ao  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .



**Figura 33.** Interação entre os compostos de manganês (MnHP e EUK-8) e o  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , investigados por EPR. Os espectros em azul são referentes aos compostos isolados e os espectros em azul tracejado são referentes aos espectros provenientes das reações com o  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , após 24 h. Todos os espectros de EPR foram registrados em DMSO seco, a 100 K.

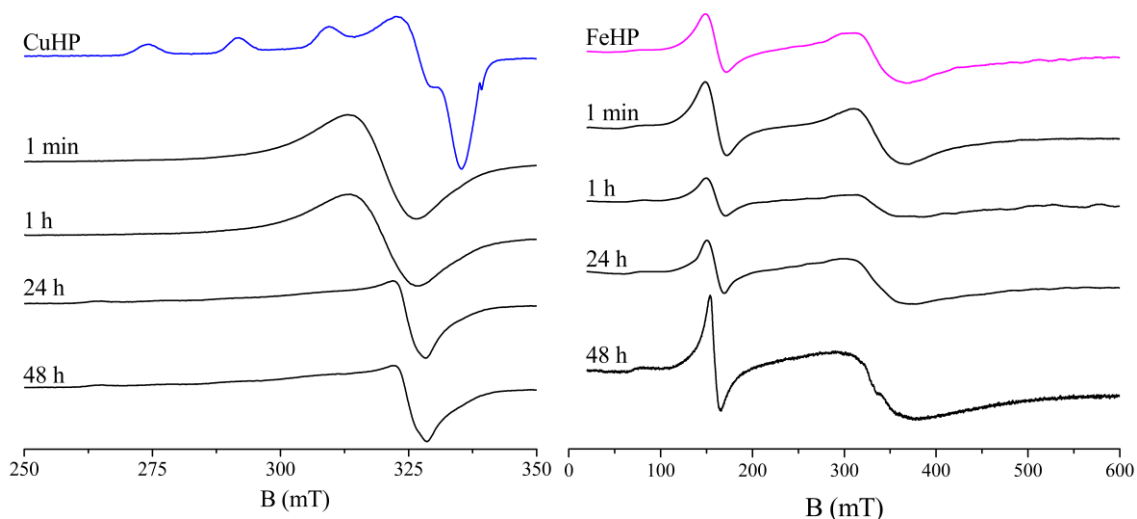
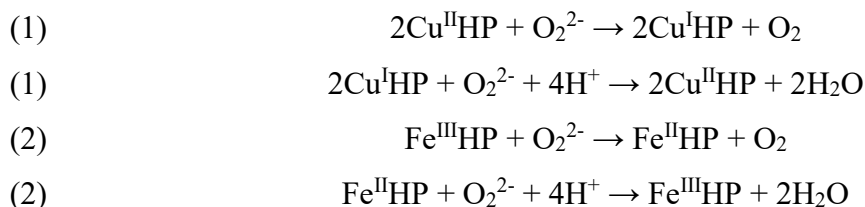
A atividade SOD foi dependente do íon metálico central, sendo o cobre(II) o mais ativo, seguido do ferro(III) e do manganês(II). Além disso, os compostos pertencentes a série hp conseguiram neutralizar mais moléculas do  $\text{O}_2^{\cdot-}$  do que o clássico composto mimético a SOD, o EUK-8.

### 5.6.2. Interação dos compostos de coordenação da série hp e EUK8 com $\text{H}_2\text{O}_2$

Mais uma vez, uma reação teste foi realizada adicionando-se algumas gotas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%) a soluções individuais de cada composto diluído em PBS pH = 7,4. Novamente, intensa formação de bolhas foi observado, sugerindo a oxidação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{O}_2$  na presença dos compostos de coordenação. Apenas a interação entre o MnHP e o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , resultou em mudança de cor da solução, de incolor para solução marrom-escura, possibilitando uma investigação por espectroscopia eletrônica. Tendo em vista

que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é silencioso no EPR, a estratégia foi explorar mudanças ou a redução da intensidade dos sinais relacionados aos centros metálicos na presença do  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Os espectros de EPR referentes ao CuHP e FeHP, obtidos em solução tampão PBS com pH de 7,4 e a uma temperatura de 100 K, são ilustrados na Figura 34. Ambos os espectros exibem as linhas características dos centros paramagnéticos individuais ( $\text{Cu}^{\text{II}}$  e  $\text{Fe}^{\text{III}}$ ), como previamente descrito. Na presença do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , os espectros são parcialmente silenciados, resultando em perda de resolução das linhas associadas aos centros de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  e  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . Isso ocorre devido às reações redox entre o centro de metal e o peróxido, que podem ser representadas conforme as equações (1) e (2), para CuHP e FeHP, respectivamente. Essas equações estão descritas abaixo:

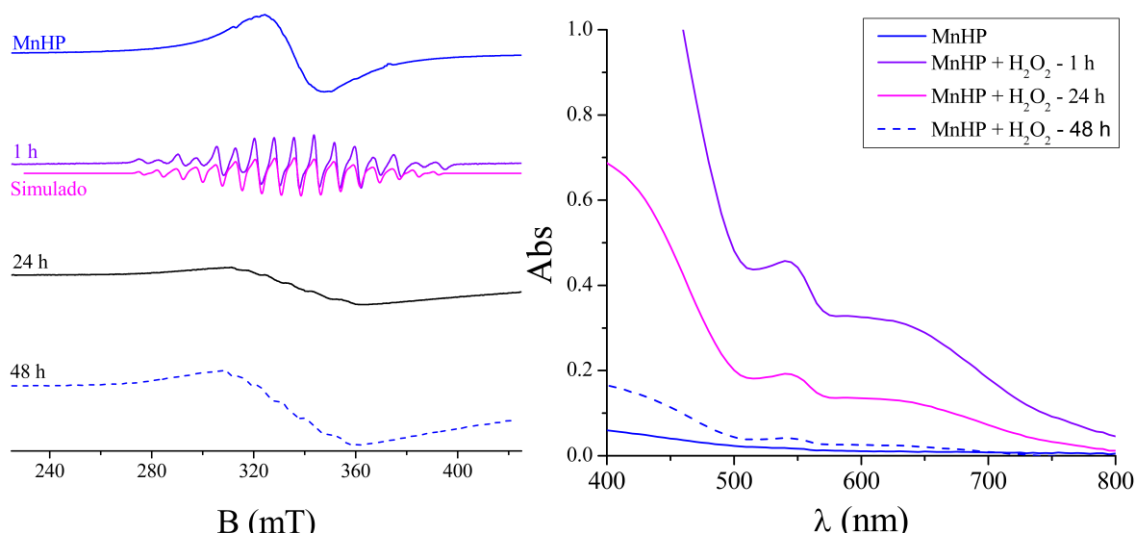


**Figura 34.** Espectros de EPR dos compostos CuHP (esquerda) e FeHP (direita), registrados em PBS pH 7,4 e a 100 K. Os espectros em preto são referentes a interação entre esses compostos de coordenação e a espécie reativa  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

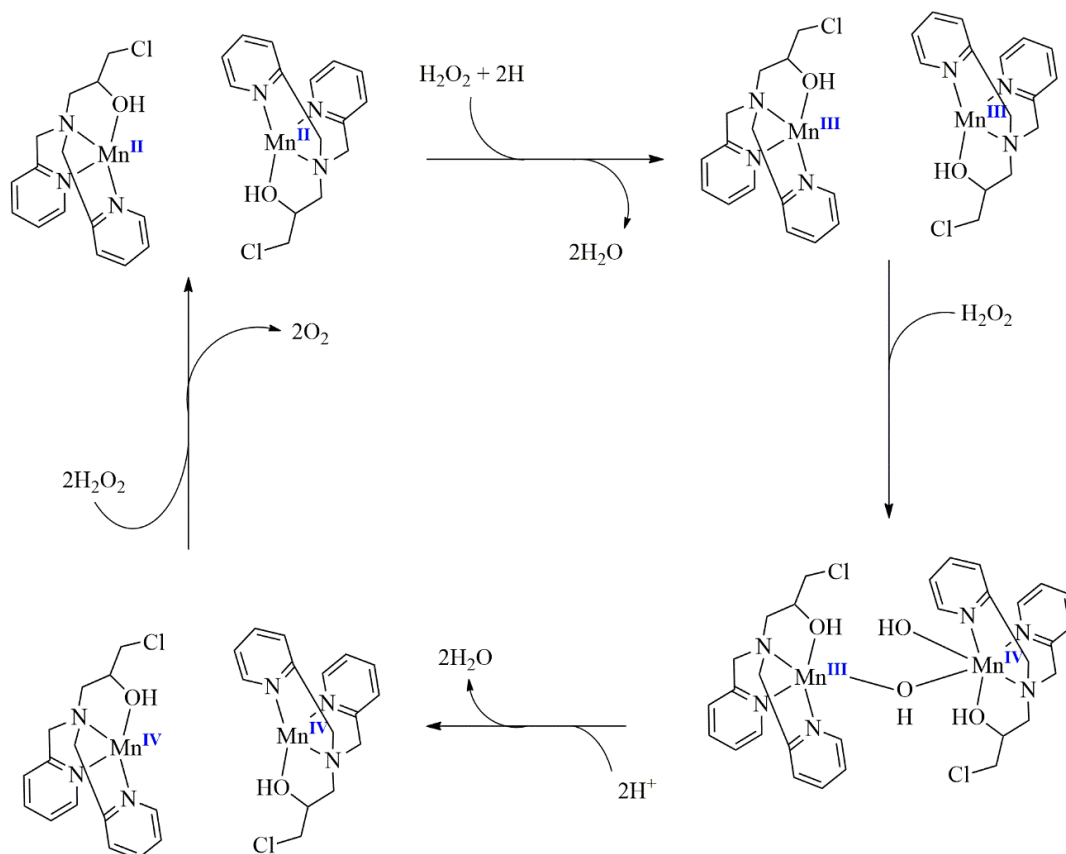
A Figura 35 apresenta o espectro de EPR do MnHP registrado em PBS pH de 7,4 e a 100 K. Neste espectro são exibidas as seis linhas características de  $\text{Mn}^{\text{II}}$ , conforme explicado anteriormente. Entretanto, na presença da espécie reativa  $\text{H}_2\text{O}_2$ , as seis linhas do  $\text{Mn}^{\text{II}}$  são silenciadas e um novo conjunto de 16 linhas aparece em  $g_z = 2,42$ ,  $g_y = 2,17$  e  $g_x = 1,49$ . Esse novo espectro é característico de uma espécie de alta

valência  $\text{Mn}^{\text{III}}-(\mu\text{-O})_2\text{-Mn}^{\text{IV}}$  com  $S = \frac{1}{2}$ . As 16 linhas resultam do acoplamento antiferromagnético entre o  $\text{Mn}^{\text{III}}$  ( $d^4$ ) e  $\text{Mn}^{\text{IV}}$  ( $d^3$ ). Com o tempo, as 16 linhas são silenciadas gradativamente até o reaparecimento das seis linhas características do  $\text{Mn}^{\text{II}}$ , porém com maior resolução quando comparada com o espectro inicial do composto MnHP. Esse comportamento é um indicativo que o mecanismo de interação envolveu a oxidação e redução do centro de metal.

A espectroscopia eletrônica também foi empregada para caracterizar esse intermediário de alta valência detectado por EPR (Figura 35). Inicialmente, um espectro eletrônico do MnHP foi registrado em PBS pH = 7,4 e a temperatura ambiente. Como esperado, nenhuma transição eletrônica na faixa do visível foi observada, visto que se trata de um composto de  $\text{Mn}^{\text{II}}$ . Em seguida, uma nova solução foi preparada em PBS contendo uma proporção MnHP:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1:100 e os espectros foram obtidos a partir dessa solução após 1 minuto, 24 horas e 48 horas. A solução de MnHP em solução de tampão fosfato é incolor, porém na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a cor da solução muda rapidamente para marrom escuro. Na presença do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, novas absorções foram observadas em 412, 542 e 627 nm. Essa característica é semelhante à apresentada pela MnCAT de *T. thermophilus* no estado de oxidação  $\text{Mn}^{\text{II}}\text{Mn}^{\text{II}}$ , que também não apresenta características no espectro de absorção visível. Imediatamente após a adição de 10  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $6,85 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) à solução (3 mL) de MnHP ( $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), bandas de absorção pouco definidas ou ombros próximos a 410, 539 e 620 nm são observados. Essas três bandas de absorção também foram observadas quando os compostos de dimanganês(II/II)  $[\text{Mn}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]$  e  $[\text{Mn}_2(\text{L})(\text{OBz})(\text{H}_2\text{O})]$  foram investigados na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Além disso, um análogo do MnHP também apresentou o mesmo comportamento na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, com o aparecimento de novas transições eletrônicas em 410, 541, e 630 nm. A transferência eletrônica de maior energia (Figura 35) foi atribuída a uma transição de transferência de carga oxo  $\rightarrow \text{Mn}^{\text{IV}}$  (LMCT), enquanto as bandas em 542 e 627 nm são atribuídas as transições eletrônicas do tipo d-d que ocorrem nos centros de  $\text{Mn}^{\text{IV}}/\text{Mn}^{\text{III}}$  do intermediário formado. Com esses dados, é possível sugerir que o MnHP neutraliza do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> passando por um intermediário de alta valência  $[\text{Mn}^{\text{III}}-(\mu\text{-O})_2\text{-Mn}^{\text{IV}}]$  e por um mecanismo catalítico. Uma proposta desse mecanismo é apresentada na Figura 36.



**Figura 35.** Espectro de EPR, à esquerda do composto MnHP, registrado em PBS e a 100 K. Espectro eletrônico, à direita, do composto de MnHP, registrados em PBS pH e a temperatura ambiente. Os espectros em azul são referentes aos compostos isolados e os espectros em azul tracejado são referentes aos espectros provenientes das reações com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  após 24 h.



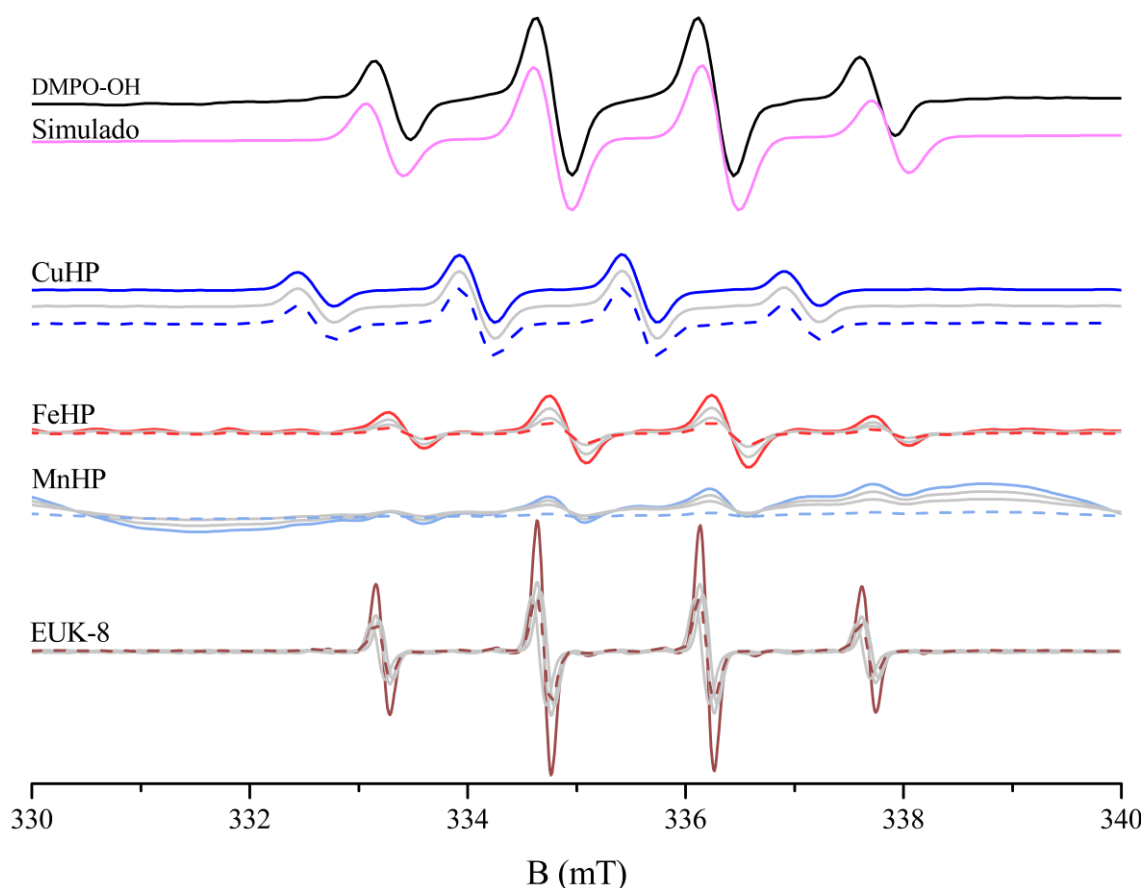
**Figura 36.** Proposta de mecanismo da decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  na presença do MnHP em solução de tampão fosfato pH = 7,4.

### 5.6.3. Interação dos compostos de coordenação da série hp e EUK8 com o $\cdot\text{OH}$

O radical  $\cdot\text{OH}$  é uma ER apresenta com potencial redox de 2,8 V para  $\cdot\text{OH} + e \rightarrow \text{OH}^-$ , conferindo a essa ER alta reatividade e, conseqüentemente, baixa

seletividade.<sup>225</sup> Além disso, não existem enzimas específicas para controlar a geração desse radical no ambiente intracelular. Isso significa que o  $\cdot\text{OH}$ , em excesso, interage de forma descontrolada com várias biomoléculas importantes, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, desencadeando reações em cadeia de radicais. Para entender melhor as reações entre o  $\cdot\text{OH}$  (produzido *in situ* por meio da reação de Fenton) e os compostos de coordenação, essas interações foram estudadas empregando-se a técnica de EPR e o DMPO como um *spin trap*.

A Figura 37 apresenta o espectro característico de EPR do aduto DMPO- $\cdot\text{OH}$  ( $a_N = 14,9$  G,  $a_H = 14,9$  G), que exibe quatro linhas de intensidade de 1:2:2:1. Essas linhas surgem da interação entre um elétron não emparelhado e um átomo de nitrogênio primário, em conjunto com um próton  $\beta$  secundário da molécula DMPO. Na presença dos compostos de coordenação FeHP, MnHP e EUK-8, as linhas atribuídas ao aduto DMPO- $\cdot\text{OH}$  são suprimidas gradualmente conforme a concentração dos compostos aumenta (Figura 37, linhas tracejadas). Curiosamente, o CuHP não foi eficiente na redução dessa ER nesse sistema, mantendo intactas as linhas referentes ao aduto DMPO- $\cdot\text{OH}$ . Isso pode ser um indicativo que a interação entre o  $\cdot\text{OH}$  e o *spin trap* DMPO é mais favorável do que com o composto CuHP. A ordem de atividade dos compostos em relação ao  $\cdot\text{OH}$ , expressa como  $\text{IC}_{50}$ , segue a sequência: EUK-8 > MnHP > FeHP >> CuHP.



**Figura 37.** Interação entre os compostos de coordenação e o  $\cdot\text{OH}$ . Os compostos foram separados em cores. A linha cheia colorida representa o espectro de DMPO-OH na presença do composto na menor concentração e a linha colorida tracejada representa o espectro de DMPO-OH na presença do composto na maior concentração. As linhas em cinza representam as concentrações intermediárias.

**Tabela 4.** Valores de  $\text{IC}_{50}$  obtidos pela equação da reta.

Composto	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )
CuHP	---
FeHP	$61,60 \pm 7,01$
MnHP	$41,35 \pm 1,38$
EUK-8	$29,11 \pm 8,30$

Com base nos dados obtidos, podemos fazer uma comparação direta com os resultados da peroxidação lipídica, a qual foi promovida por meio de um estresse induzido por esse radical. A atividade dos compostos não seguiu a mesma ordem, visto que o CuHP foi mais eficaz e demonstrou uma melhor capacidade de inibir a oxidação induzida pela reação de Fenton em homogenato de fígado de camundongo. Assim, os resultados obtidos por meio do EPR não podem ser extrapolados diretamente para outros desenhos experimentais. Isso pode ser explicado por meio da competição entre o *spin trap* DMPO e os compostos de coordenação para interagir com o  $\cdot\text{OH}$ .

### 5.7. Efeito dos compostos de coordenação na disfunção mitocondrial induzida por rotenona em células C6

O estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial são considerados fatores críticos na fisiopatologia das várias doenças. Para avaliar o efeito dos compostos de coordenação da série hp na disfunção mitocondrial induzida pela rotenona em células C6, o consumo de oxigênio celular foi analisado usando a técnica de Respirimetria de Alta Resolução (HRR), empregando-se células C6. Essa aproximação metodológica permite a obtenção de diversos parâmetros mitocondriais, sendo eles: (i) respiração basal que envolve a oxidação de substratos energéticos, a transferências de elétrons através da cadeia respiratória, e a síntese de ATP; (ii) consumo de oxigênio celular dependente da atividade da ATP sintase, a qual pode ser estimada a partir da respiração basal subtraída da respiração celular, após a inibição da ATP sintase com oligomicina; (iii) a capacidade respiratória máxima induzida pela adição de um desacoplador da cadeia respiratória, como Carbonil cianeto 4-(trifluorometoxi) fenil-hidrazona FCCP. Este parâmetro reflete a atividade máxima de transporte de elétrons pela população de mitocôndrias nas células; <sup>212,226,227</sup> (iv) capacidade de reserva mitocondrial, é a capacidade de reversa respiratória responsiva a condições de uma demanda energética variável. Isto é medido pela diferença entre a capacidade respiratória máxima e a respiração basal.

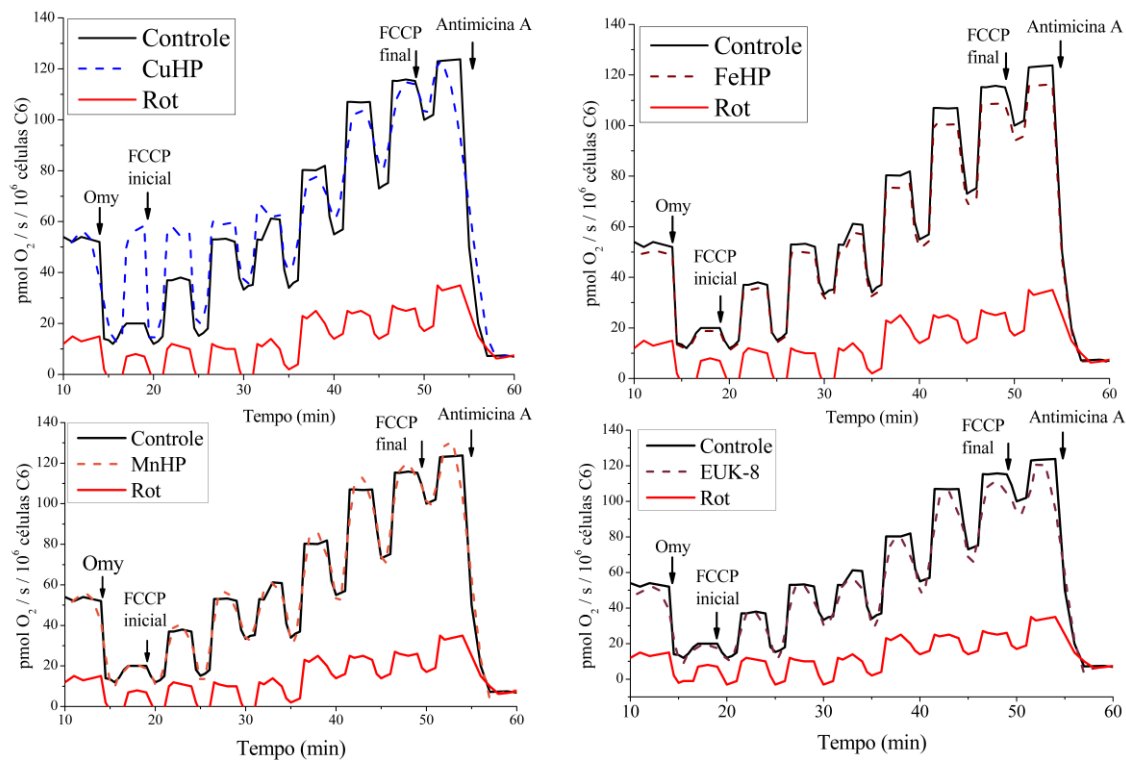
A Figura 38 mostra o padrão de respiração celular das células C6 após tratamento com os compostos de coordenação. O tratamento das células do grupo controle (sem rotenona), com os compostos de coordenação, não alterou o consumo de oxigênio das células C6, mostrando que os compostos não interferem no consumo de oxigênio das células C6. Por outro lado, no grupo que recebeu tratamento com rotenona (Figura 39, linha vermelha) houve diminuição do consumo de oxigênio de 55 para  $14 \pm 7,2$  pmol O<sub>2</sub> s<sup>-1</sup>. O tratamento com os compostos de coordenação recuperou o consumo de oxigênio para valores próximos ao do grupo controle ( $56 \pm 8,9$  para o CuHP;  $50 \pm 7,5$  para o FeHP;  $57 \pm 3,8$  para o MnHP e  $52 \pm 2,8$  para o EUK-8; Figura 39).

O consumo de oxigênio celular dependente da atividade da ATP sintase foi avaliado após a adição da oligomicina (Figura 38, omy). O grupo controle e o grupo tratado com rotenona exibiram um consumo de oxigênio de  $20 \pm 5,2$  e  $7 \pm 3,4$  pmol O<sub>2</sub> s<sup>-1</sup>. Os grupos tratados com os compostos FeHP, MnHP e CuHP exibiram um consumo de oxigênio após a adição de oligomicina de  $32 \pm 4,5$ ,  $22 \pm 6,4$  e  $22 \pm 2,1$  pmol O<sub>2</sub> s<sup>-1</sup> respectivamente. Curiosamente, o grupo tratado com o CuHP não respondeu a adição da

oligomicina, sugerindo que o mesmo pode estar exercendo proteção contra os efeitos da oligomicina. Os valores de consumo de oxigênio relacionados a produção de ATP são mostrados no gráfico de barras na Figura 39.

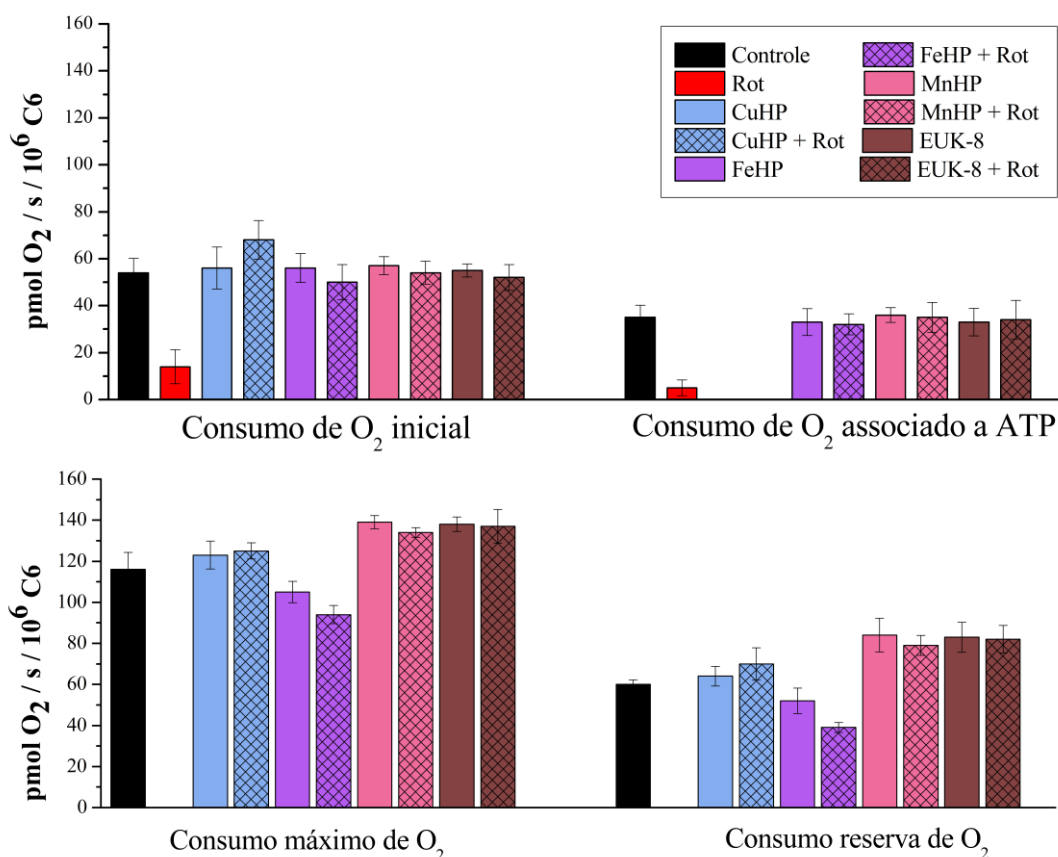
O consumo máximo e o consumo residual de oxigênio (reserva) dessas células foi determinado após a adição de sucessivas alíquotas de FCCP, até o consumo de oxigênio atingir um platô (Figura 39). O grupo controle exibiu o consumo de oxigênio máximo em  $123 \pm 8,2$  pmol  $O_2$   $s^{-1}$  e o grupo tratado com rotenona exibiu o consumo máximo de oxigênio em  $35 \pm 3,5$  pmol  $O_2$   $s^{-1}$ . O tratamento com os compostos de coordenação recuperou o consumo máximo de oxigênio para valores semelhantes ao do grupo controle ( $134 \pm 6,8$  para o CuHP;  $118 \pm 5,2$  para o FeHP;  $152 \pm 3,2$  para o MnHP e  $148 \pm 8,2$  para o EUK-8).

O consumo residual de oxigênio foi obtido após a adição de antimicina A. Todos os grupos avaliados exibiram valores de consumo residual de oxigênio semelhantes, sendo eles:  $8 \pm 0,8$  para o grupo controle;  $7 \pm 1,1$  para o grupo tratado com rotenona;  $7 \pm 0,8$  para o CuHP;  $9 \pm 0,2$  para o FeHP;  $13 \pm 0,8$  para o MnHP e  $11 \pm 0,7$  para o EUK-8.



**Figura 38.** Consumo de oxigênio celular em parâmetros respiratórios mitocondriais, empregando-se células C6. Linha preta: células C6 grupo controle (sem tratamento), linha vermelha (células C6 tratadas com rotenona) e linha tracejada (tratamento com os compostos da série hp).





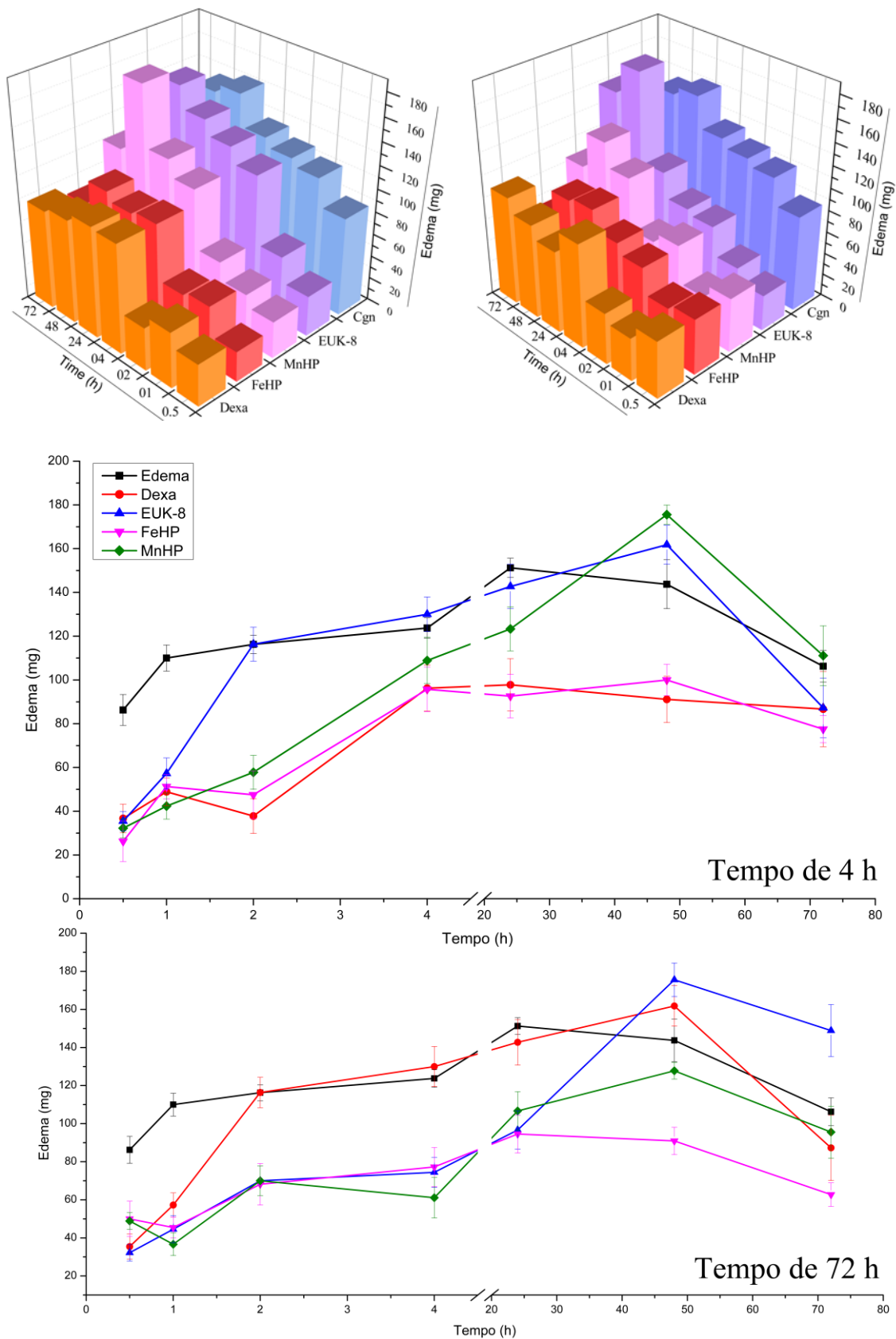
**Figura 39.** Valores de consumo de oxigênio obtidos pela técnica de HRR. Cada grupo contém 300 milhões de células C6. O grupo Rot (barra vermelha), recebeu tratamento de 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de rotenona. Os grupos restantes receberam um pré-tratamento com 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  dos compostos indicados por 1 h. Os grupos contendo a barra texturizada receberam pré-tratamento com os compostos indicados por 1 h, seguido do tratamento com rotenona 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  por mais 1 h.

Esses resultados sugeriram fortemente o tratamento com os compostos da série hp foi eficiente, revertendo a disfunção mitocondrial induzida pela rotenona, em células C6. Considerando que esses compostos de coordenação conseguem inibir a geração de ER (Tópico 5.3) é possível atribuir que o efeito protetor está atrelado a atividade antioxidante intrínseca e catalítica desses compostos frente a ERs.

Na Figura 39 é possível notar grande semelhança entre os resultados de consumo máximo de O<sub>2</sub> obtidos para os compostos MnHP e EUK-8, também um composto de Mn. O composto EUK-8, composto considerado *SOD-mimic* mostrou-se altamente eficiente na inibição da disfunção mitocondrial induzida por rotenona, resultado condizente com a sua grande eficiência na dismutação do radical superóxido, largamente documentada na literatura. Assim, o composto MnHP mostra-se promissor, devido à similaridade dos resultados obtidos via técnica de HRR com o EUK-8.

### **5.8. Efeitos dos compostos de coordenação na inibição da progressão do edema de pata induzida por carragenina em camundongos *swiss***

A Figura 40 mostra inibição da progressão do edema de pata induzido por carragenina em camundongos *swiss* para os compostos de coordenação FeHP, MnHP e EUK-8, em comparação com o grupo controle (carrageina, Cgn) e o controle positivo (dexa). O gráfico a esquerda é referente massa do edema registrado para os animais que receberam um tratamento de 2 mg kg<sup>-1</sup> dos compostos de coordenação ou dexametasona, e o gráfico a direita é referente massa do edema registrado para os animais que receberam um tratamento de 8 mg kg<sup>-1</sup> dos compostos de coordenação ou dexametasona.



**Figura 40.** Efeito dos compostos de coordenação na massa do edema (mg) em função do tempo (h). O gráfico à esquerda é referente aos valores obtidos para os grupos tratados com 2 mg kg<sup>-1</sup>, e o gráfico à direita é referente aos grupos tratados com 8 mg kg<sup>-1</sup>. O gráfico abaixo é uma outra representação das variações do edema de pata ao longo do tempo com o erro padrão da média em cada medida.

A variação da massa do edema (medida em mg) em relação ao tempo (medido em h) para o grupo controle Cgn exibiu um padrão de resposta em duas fases distintas. A primeira fase, caracterizada como inflamação aguda, ocorreu nas primeiras 4 h, durante as quais a massa do edema aumentou gradualmente ao longo do tempo. Já a segunda fase, correspondente à inflamação crônica, foi observada em 12 h, marcada pelo pico do edema atingindo 151,25 mg, seguido por uma leve redução até 72 h, sem que ocorresse uma diminuição completa do edema.

A dexametasona, em ambas as doses, apresentou atividade anti-inflamatória mais satisfatória na fase aguda em relação a fase crônica. Essa atividade é esperada para a dexametasona, pois esse fármaco atua dentro do núcleo celular, inibindo a síntese de citocinas pró inflamatórias (fase aguda). Na fase crônica ocorre a ativação do sistema imune, reduzindo a expressão das citocinas pró-inflamatórias e inicia-se a síntese de autoanticorpos, o que pode dissipar a atividade da dexametasona. O composto FeHP, também em ambas as concentrações, apresentou atividade muito similar ao controle positivo, podendo ser um indicativo de modulador de citocinas pró inflamatórias.

Os compostos de manganês, MnHP e EUK-8, demonstraram atividade de inibição da progressão do edema de pata durante a fase aguda. No entanto, após 24 h, não foi observada uma redução significativa na massa do edema de pata em ambas as doses testadas (2 e 8 mg kg<sup>-1</sup>), resultando em uma massa de edema equivalente à do grupo controle Cgn. Curiosamente, nos períodos de 48 e 72 h, notou-se um aumento na massa do edema na pata dos camundongos em valores superiores aos registrados no grupo controle Cgn.

Embora a redução do edema tenha sido expressa em massa, também foi possível acompanhar visivelmente as variações no volume da pata desses animais, conforme as imagens apresentadas na Figura 41. Além disso, a atividade antioxidante observada no modelo *in vivo* de inflamação, expresso em inibição de NOx, foi extrapolada para esse modelo *in vivo* de inflamação, com o FeHP apresentando a melhor atividade em ambos os modelos.



**Figura 41.** Imagens do edema de pata em 48 h (pico). A imagem A é referente ao grupo controle Cgn no tempo de 48 h após a injeção intradérmica de carragenina. A imagem B é referente ao controle positivo 8 mg kg<sup>-1</sup> no tempo de 48 h após a injeção intradérmica de carragenina. A imagem C é referente ao FeHP 8

mg kg<sup>-1</sup> no tempo de 48 h após a injeção intradérmica de carragenina. A pata direita funciona como uma referência a uma pata sem edema (0 mg de edema).

De modo geral, os compostos de coordenação estudados se mostraram eficientes na redução de edema na pata de camundongos induzida por carragenina na fase aguda. Tendo em vista que é nessa fase em que ocorre a síntese de citocinas pró inflamatórias e o aumento de marcadores de inflamação, pode-se inferir que esses compostos atuaram como anti-inflamatórios. A fase crônica se caracteriza pela ativação do sistema imune, sendo assim, o organismo pode interpretar alguns desses compostos como um “corpo estranho” que deve ser combatido, aumentando a expressão de genes pró inflamatórios.

Nesse contexto, a mieloperoxidase (MPO) é marcador útil para avaliar a eficácia de compostos anti-inflamatórios e sua capacidade de modular a resposta inflamatória. A MPO é uma enzima presente em neutrófilos e macrófagos, desempenhando um papel na resposta inflamatória. Durante a inflamação, os níveis de MPO tendem a aumentar, uma vez que ela está envolvida na produção de ERs e na formação de produtos oxidativos que participam ativamente da resposta imunológica. A administração de compostos anti-inflamatórios pode influenciar os níveis de MPO. Esses compostos podem agir de diferentes maneiras, incluindo a supressão da atividade inflamatória e a redução da produção de ERs, o que leva a uma diminuição na atividade da MPO. Isso pode ser interpretado como uma redução na intensidade da resposta inflamatória, uma vez que a MPO desempenha um papel importante na amplificação da inflamação.

A dexametasona, um corticosteroide amplamente utilizado com propriedades anti-inflamatórias bem estabelecidas, é conhecida por sua capacidade de modular diversos aspectos da resposta imunológica. Ela exerce seu efeito principalmente pela supressão da expressão de genes pró-inflamatórios e pela modulação da atividade de células do sistema imunológico, incluindo neutrófilos e macrófagos. Assim, a redução dos níveis de MPO pela dexametasona pode ser atribuída à sua capacidade de interferir na cascata inflamatória em vários níveis.

A Figura 42 ilustra que os compostos CuHP e FeHP também demonstraram eficácia em diminuir os níveis de MPO. Esses compostos possuem propriedades antioxidantes que podem desempenhar um papel importante na regulação da atividade da MPO. As ERs produzidos durante a inflamação são neutralizados por esses compostos, o que resulta na inibição da atividade da MPO. No entanto, é importante ressaltar que a eficácia desses compostos pode variar dependendo de sua capacidade de

penetrar nos tecidos inflamados e de interagir com os diferentes componentes do microambiente inflamatório.

O EUK-8 se destacou como o composto mais eficaz em diminuir a MPO. Isso pode estar relacionado a uma maior permeabilidade do composto ao sistema, ou ao seu mecanismo anti-inflamatório ser predominantemente relacionado a diminuição da atividade da MPO. Além disso, o EUK-8 pode ter outros efeitos além da neutralização de ERs, como a regulação de vias de sinalização intracelular envolvidas na ativação da MPO.

Em suma, a redução dos níveis de MPO por diferentes compostos anti-inflamatórios reflete a diversidade de mecanismos envolvidos na modulação da resposta inflamatória. Esses resultados destacam a importância de compreender não apenas os efeitos diretos dos compostos sobre a MPO, mas também suas interações com outros componentes do sistema imunológico e do microambiente inflamatório. Essa compreensão mais profunda pode orientar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de condições inflamatórias.

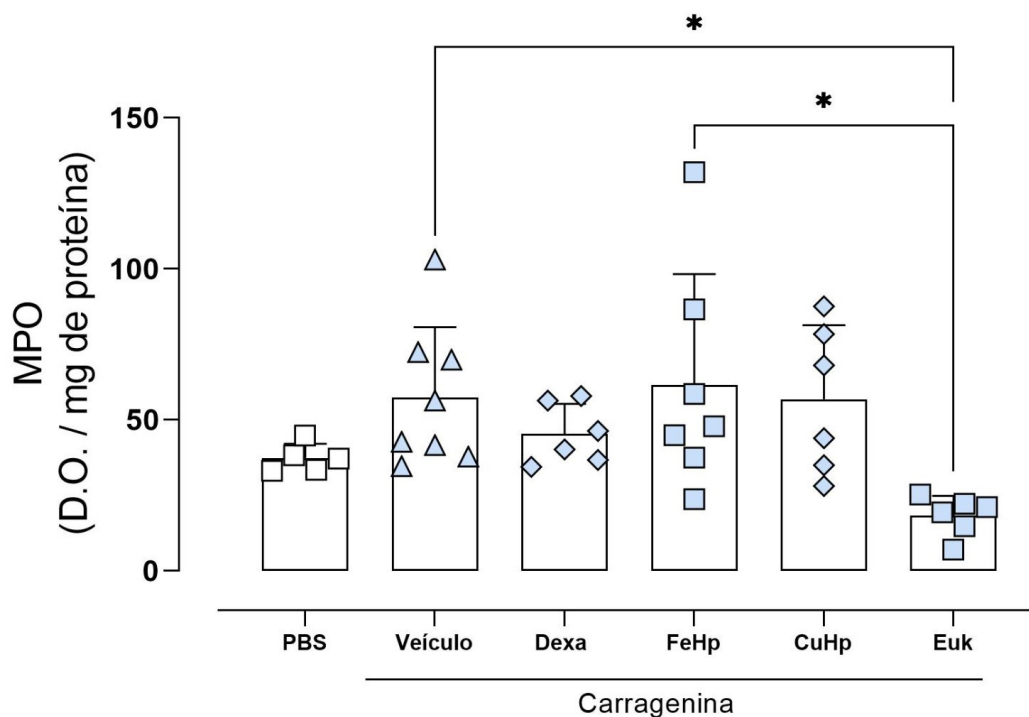


Figura 42. Atividade da enzima MPO no tecido das patas dos camundongos em cada tratamento e no tempo de 4 h.

## 5.9. RESULTADOS ADICIONAIS

Os pré-ligantes bmpa e hpclnol e seus respectivos compostos de coordenação de Cu<sup>II</sup>, Fe<sup>III</sup> e Mn<sup>II</sup> foram sintetizados e caracterizados com diversas técnicas analíticas. Dentre esses, apenas o composto de Mn<sup>II</sup> contendo o ligante bmpa é inédito. Esse composto é uma espécie trinuclear de Mn<sup>II</sup> com fórmula [Cl(bmpa)Mn<sup>II</sup>-(μ-Cl)<sub>2</sub>-Mn<sup>II</sup>(bmpa)-(μ-Cl)-Mn<sup>II</sup>(bmpa)(Cl)<sub>2</sub>] $\cdot$ 5H<sub>2</sub>O. A composição é suportada pela análise elementar e espectrometria de massa ESI-(+)-MS, que confirmam que a identidade trinuclear do composto permanece em solução. A atividade antioxidante da série bmpa também foi avaliada e está disponível em um trabalho publicado no *periódico Journal of Inorganic Biochemistry*.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Inorganic Biochemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jinorgbio](http://www.elsevier.com/locate/jinorgbio)



### ROS scavenging of SOD/CAT mimics probed by EPR and reduction of lipid peroxidation in *S. cerevisiae* and mouse liver, under severe hydroxyl radical stress condition

Lucas B. Menezes<sup>a</sup>, Bruna B. Segat<sup>a</sup>, Hugo Tolentino<sup>b</sup>, Daniele C. Pires<sup>c,d</sup>, Larissa M. de M. Mattos<sup>c,d</sup>, Hyan M. Hottum<sup>c,d</sup>, Marcos D. Pereira<sup>c,d</sup>, Alexandra Latini<sup>b</sup>, Adolfo Horn Jr.<sup>a,\*</sup>, Christiane Fernandes<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil

<sup>b</sup> LABOX, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil

<sup>c</sup> Rede Micologia RJ- FAPERJ

<sup>d</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-909, RJ, Brazil

Os resultados mencionados foram também divulgados durante o evento "XX Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry (XX BMIC)", por meio de apresentação em formato de pôster e exposição oral em sessão de *flash presentation*, tendo sido agraciados com reconhecimento pela *Royal Society of Chemistry* em 12 de setembro de 2022.

Resultados paralelos foram apresentados no evento "XXVII Encontro De Química Da Região Sul - SBQ-Sul", sob o título "Investigação espectroscópica da atividade mimética à metaloenzima Superóxido Dismutase (SOD) de compostos de coordenação de cobre(II)".

Adicionalmente, um estudo que contempla os ligantes hp e bmpa, bem como seus respectivos compostos de Fe<sup>III</sup> (FeBMPA e FeHP), foi exposto em formato de pôster durante a "Conferência Latino-Americana de Físico-Química Orgânica –

CLAFQO", com a título "*Enhanced of ex-vivo antioxidant capacity of amino-pyridine derivates by complexation with iron(III) center*".



## 5. CONCLUSÃO

Esta pesquisa representou um avanço significativo na compreensão dos efeitos dos compostos de coordenação pertencentes à série hp, demonstrados como miméticos funcionais às enzimas antioxidantes SOD e CAT, em modelos *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro* de estresse oxidativo. Os resultados obtidos, consolidados através de uma abordagem abrangente, demonstraram a eficácia desses compostos na regulação do estresse oxidativo, mitigação de danos oxidativos e prevenção da disfunção mitocondrial.

Os resultados dos estudos de inibição da geração de ERs mostrou que a atividade é dependente do íon de metal central, sendo o FeHP mais ativo, seguido do MnHP, EUK-8 e CuHP, que embora tenha inibido as gerações de ERs de forma mais satisfatória que o EUK-8 em um modelo *in vitro* de estresse oxidativo induzido por rotenona, não inibiu a geração de NOx. No entanto, estudos prévios têm demonstrado potencial ação desnitrosilante desse composto. A IC<sub>50</sub> calculada a partir de um modelo *ex vivo* de estresse oxidativo induzido pelo  $\cdot\text{OH}$  mostrou que os compostos evitam o dano oxidativo em concentrações nanomolares. A prevenção da disfunção mitocondrial foi observada para todos os compostos, não mostrando a dependência do centro metálico. No entanto o composto CuHP parece prevenir, também, os efeitos a oligomicina. Esses compostos também foram capazes de inibir a progressão do edema de pata induzido por carragenina em camundongos *swiss*. A atividade foi dependente do íon de metal, sendo o composto FeHP mais ativo, seguido do MnHP e EUK-8.

A interação direta entre os compostos de coordenação da série hp e as ERs foram detectadas e investigadas pelas técnicas de EPR e espectroscopia eletrônica, revelando a formação de espécies como superóxidocobre(I), superóxidocobre(II), espécie de valência-mista  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$  e uma espécie de alta valência  $\text{Mn}^{\text{III}}\text{-oxo-Mn}^{\text{IV}}$ , contribuindo para a proposição de mecanismos de ação frente ao  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Em suma, este estudo fundamentou-se na avaliação abrangente dos compostos de coordenação da série hp como potenciais agentes antioxidantes. Esses resultados não apenas corroboram a hipótese inicial, mas também abrem novas perspectivas para terapias visando a preservação da integridade celular e mitocondrial. Conclui-se que estes compostos, solúveis em água e obtidos com bom rendimento e reprodutibilidade, possuem relevantes propriedades antioxidantes, frente a modelos de complexidades variadas, abrindo perspectivas de investigações e aplicações futuras.

## **6. PERSPECTIVAS FUTURAS**

Os resultados oferecem uma perspectiva promissora para intervenções terapêuticas visando a preservação da integridade de biomoléculas e da mitocôndria. Para avançar na compreensão e aplicação dos compostos de coordenação como moduladores mitocondriais, futuras pesquisas podem ser direcionadas nos efeitos desses compostos da série hp na atividade dos complexos mitocondriais. Além disso, a avaliação da expressão de enzimas antioxidantes por meio de estudos de qPCR também representa uma abordagem interessante para avaliar se esses compostos melhoram o sistema de defesa antioxidante celular ou se a atividade antioxidante é inerente desses compostos. Investigações adicionais no estudo de inibição da progressão do edema de pata também devem ser realizados para elucidar o mecanismo de ação desses compostos.

Ademais, a exploração de formulações e estratégias de administração que otimizem a entrega desses compostos aos tecidos alvo também representa um ponto de interesse para pesquisas futuras. A formulação de sistemas de liberação controlada ou o desenvolvimento de nanopartículas carreadoras podem ser estratégias promissoras para maximizar a atividade antioxidante/anti-inflamatória desses compostos.

## 7. REFERÊNCIAS

- (1) Murphy, M. P.; Bayir, H.; Belousov, V.; Chang, C. J.; Davies, K. J. A.; Davies, M. J.; Dick, T. P.; Finkel, T.; Forman, H. J.; Janssen-Heininger, Y.; Gems, D.; Kagan, V. E.; Kalyanaraman, B.; Larsson, N.-G.; Milne, G. L.; Nyström, T.; Poulsen, H. E.; Radi, R.; Van Remmen, H.; Schumacker, P. T.; Thornalley, P. J.; Toyokuni, S.; Winterbourn, C. C.; Yin, H.; Halliwell, B. Guidelines for Measuring Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Cells and in Vivo. *Nat Metab* **2022**, *4* (6), 651–662. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00591-z>.
- (2) Sies, H.; Belousov, V. V.; Chandel, N. S.; Davies, M. J.; Jones, D. P.; Mann, G. E.; Murphy, M. P.; Yamamoto, M.; Winterbourn, C. Defining Roles of Specific Reactive Oxygen Species (ROS) in Cell Biology and Physiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2022**, *23* (7), 499–515. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00456-z>.
- (3) Sies, H. On the History of Oxidative Stress: Concept and Some Aspects of Current Development. *Curr Opin Toxicol* **2018**, *7*, 122–126. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.01.002>.
- (4) Sies, H.; Jones, D. P. Reactive Oxygen Species (ROS) as Pleiotropic Physiological Signalling Agents. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2020**, *21* (7), 363–383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>.
- (5) D.F., S. Óxido de Nitrogênio(II). In *Química Inorgânica*; Oxford University Press.: Oxford, 2006; pp 387–388.
- (6) Mittler, R. ROS Are Good. *Trends Plant Sci* **2017**, *22* (1), 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>.
- (7) Zuo, L.; Zhou, T.; Pannell, B. K.; Ziegler, A. C.; Best, T. M. Biological and Physiological Role of Reactive Oxygen Species - the Good, the Bad and the Ugly. *Acta Physiologica* **2015**, *214* (3), 329–348. <https://doi.org/10.1111/apha.12515>.
- (8) Monteiro, H. P.; Rodrigues, E. G.; Amorim Reis, A. K. C.; Longo, L. S.; Ogata, F. T.; Moretti, A. I. S.; da Costa, P. E.; Teodoro, A. C. S.; Toledo, M. S.; Stern, A. Nitric Oxide and Interactions with Reactive Oxygen Species in the Development of Melanoma, Breast, and Colon Cancer: A Redox Signaling Perspective. *Nitric Oxide* **2019**, *89*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.04.009>.
- (9) Lennicke, C.; Cochemé, H. M. Redox Metabolism: ROS as Specific Molecular Regulators of Cell Signaling and Function. *Mol Cell* **2021**, *81* (18), 3691–3707. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.08.018>.
- (10) Mazat, J.-P.; Devin, A.; Ransac, S. Modelling Mitochondrial ROS Production by the Respiratory Chain. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2020**, *77* (3), 455–465. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03381-1>.
- (11) Ravera, S.; Colombo, E.; Pasquale, C.; Benedicenti, S.; Solimei, L.; Signore, A.; Amaroli, A. Mitochondrial Bioenergetic, Photobiomodulation and Trigeminal Branches Nerve Damage, What's the Connection? A Review. *Int J Mol Sci* **2021**, *22* (9), 4347. <https://doi.org/10.3390/ijms22094347>.
- (12) Schofield, J. H.; Schafer, Z. T. Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Mitophagy: A Complex and Nuanced Relationship. *Antioxid Redox Signal* **2021**, *34* (7), 517–530. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8058>.
- (13) Mailloux, R. J. An Update on Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *Antioxidants* **2020**, *9* (6), 472. <https://doi.org/10.3390/antiox9060472>.

- (14) Singh, S.; Singh, T. G.; Rehni, A. K.; Sharma, V.; Singh, M.; Kaur, R. Reviving Mitochondrial Bioenergetics: A Relevant Approach in Epilepsy. *Mitochondrion* **2021**, *58*, 213–226. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2021.03.009>.
- (15) Barbato, A.; Scandura, G.; Puglisi, F.; Cambria, D.; La Spina, E.; Palumbo, G. A.; Lazzarino, G.; Tibullo, D.; Di Raimondo, F.; Giallongo, C.; Romano, A. Mitochondrial Bioenergetics at the Onset of Drug Resistance in Hematological Malignancies: An Overview. *Front Oncol* **2020**, *10*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.604143>.
- (16) Marí, M.; de Gregorio, E.; de Dios, C.; Roca-Agüetas, V.; Cucarull, B.; Tutusaus, A.; Morales, A.; Colell, A. Mitochondrial Glutathione: Recent Insights and Role in Disease. *Antioxidants* **2020**, *9* (10), 909. <https://doi.org/10.3390/antiox9100909>.
- (17) Jurcau, A. Insights into the Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases: Focus on Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress. *Int J Mol Sci* **2021**, *22* (21), 11847. <https://doi.org/10.3390/ijms222111847>.
- (18) Elfawy, H. A.; Das, B. Crosstalk between Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress, and Age Related Neurodegenerative Disease: Etiologies and Therapeutic Strategies. *Life Sci* **2019**, *218*, 165–184. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.12.029>.
- (19) Peoples, J. N.; Saraf, A.; Ghazal, N.; Pham, T. T.; Kwong, J. Q. Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Heart Disease. *Exp Mol Med* **2019**, *51* (12), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0355-7>.
- (20) Keshavarz, M.; Xie, K.; Schaaf, K.; Bano, D.; Ehninger, D. Targeting the “Hallmarks of Aging” to Slow Aging and Treat Age-Related Disease: Fact or Fiction? *Mol Psychiatry* **2023**, *28* (1), 242–255. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01680-x>.
- (21) Neha, K.; Haider, M. R.; Pathak, A.; Yar, M. S. Medicinal Prospects of Antioxidants: A Review. *Eur J Med Chem* **2019**, *178*, 687–704. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.010>.
- (22) Forman, H. J.; Zhang, H. Targeting Oxidative Stress in Disease: Promise and Limitations of Antioxidant Therapy. *Nat Rev Drug Discov* **2021**, *20* (9), 689–709. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00233-1>.
- (23) Ionescu-Tucker, A.; Cotman, C. W. Emerging Roles of Oxidative Stress in Brain Aging and Alzheimer’s Disease. *Neurobiol Aging* **2021**, *107*, 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2021.07.014>.
- (24) Sztretye, M.; Dienes, B.; Gönczi, M.; Czirják, T.; Csernoch, L.; Dux, L.; Szentesi, P.; Keller-Pintér, A. Astaxanthin: A Potential Mitochondrial-Targeted Antioxidant Treatment in Diseases and with Aging. *Oxid Med Cell Longev* **2019**, *2019*, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2019/3849692>.
- (25) Tchekalarova, J.; Tzoneva, R. Oxidative Stress and Aging as Risk Factors for Alzheimer’s Disease and Parkinson’s Disease: The Role of the Antioxidant Melatonin. *Int J Mol Sci* **2023**, *24* (3), 3022. <https://doi.org/10.3390/ijms24033022>.
- (26) Deng, L.; Du, C.; Song, P.; Chen, T.; Rui, S.; Armstrong, D. G.; Deng, W. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Diabetic Wound Healing. *Oxid Med Cell Longev* **2021**, *2021*, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2021/8852759>.
- (27) Sharifi-Rad, M.; Anil Kumar, N. V.; Zucca, P.; Varoni, E. M.; Dini, L.; Panzarini, E.; Rajkovic, J.; Tsouh Fokou, P. V.; Azzini, E.; Peluso, I.; Prakash Mishra, A.; Nigam, M.; El Rayess, Y.; Beyrouthy, M. El; Polito, L.; Iriti, M.; Martins, N.; Martorell, M.; Docea, A. O.; Setzer, W. N.; Calina, D.; Cho, W. C.; Sharifi-Rad, J. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Front Physiol* **2020**, *11*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00694>.

- (28) Sies, H. Oxidative Eustress: On Constant Alert for Redox Homeostasis. *Redox Biol* **2021**, *41*, 101867. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101867>.
- (29) Ighodaro, O. M.; Akinloye, O. A. First Line Defence Antioxidants-Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione Peroxidase (GPX): Their Fundamental Role in the Entire Antioxidant Defence Grid. *Alexandria Journal of Medicine* **2018**, *54* (4), 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>.
- (30) Psomas, G. Copper(II) and Zinc(II) Coordination Compounds of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: Structural Features and Antioxidant Activity. *Coord Chem Rev* **2020**, *412*, 213259. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213259>.
- (31) Shahraki, S. Schiff Base Compounds as Artificial Metalloenzymes. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2022**, *218*, 112727. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112727>.
- (32) Jiao, L.; Yan, H.; Wu, Y.; Gu, W.; Zhu, C.; Du, D.; Lin, Y. When Nanozymes Meet Single-Atom Catalysis. *Angewandte Chemie* **2020**, *132* (7), 2585–2596. <https://doi.org/10.1002/ange.201905645>.
- (33) Cao, F.; Zhang, L.; You, Y.; Zheng, L.; Ren, J.; Qu, X. An Enzyme-Mimicking Single-Atom Catalyst as an Efficient Multiple Reactive Oxygen and Nitrogen Species Scavenger for Sepsis Management. *Angewandte Chemie* **2020**, *132* (13), 5146–5153. <https://doi.org/10.1002/ange.201912182>.
- (34) Ribeiro, T. P.; Fernandes, C.; Melo, K. V.; Ferreira, S. S.; Lessa, J. A.; Franco, R. W. A.; Schenk, G.; Pereira, M. D.; Horn, A. Iron, Copper, and Manganese Complexes with in Vitro Superoxide Dismutase and/or Catalase Activities That Keep *Saccharomyces Cerevisiae* Cells Alive under Severe Oxidative Stress. *Free Radic Biol Med* **2015**, *80*, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.12.005>.
- (35) Horn, A.; Parrilha, G. L.; Melo, K. V.; Fernandes, C.; Horner, M.; Visentin, L. do C.; Santos, J. A. S.; Santos, M. S.; Eleutherio, E. C. A.; Pereira, M. D. An Iron-Based Cytosolic Catalase and Superoxide Dismutase Mimic Complex. *Inorg Chem* **2010**, *49* (4), 1274–1276. <https://doi.org/10.1021/ic901904b>.
- (36) Lessa, J. A.; Horn, A.; Bull, É. S.; Rocha, M. R.; Benassi, M.; Catharino, R. R.; Eberlin, M. N.; Casellato, A.; Noble, C. J.; Hanson, G. R.; Schenk, G.; Silva, G. C.; Antunes, O. A. C.; Fernandes, C. Catalase vs Peroxidase Activity of a Manganese(II) Compound: Identification of a Mn(III)–( $\mu$ -O)<sub>2</sub>–Mn(IV) Reaction Intermediate by Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. *Inorg Chem* **2009**, *48* (10), 4569–4579. <https://doi.org/10.1021/ic801969c>.
- (37) Ribeiro, T. de P.; Fonseca, F. L.; de Carvalho, M. D. C.; Godinho, R. M. da C.; de Almeida, F. P.; Saint’Pierre, T. D.; Rey, N. A.; Fernandes, C.; Horn, A.; Pereira, M. D. Metal-Based Superoxide Dismutase and Catalase Mimics Reduce Oxidative Stress Biomarkers and Extend Life Span of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Biochemical Journal* **2017**, *474* (2), 301–315. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160480>.
- (38) Fernandes, C.; Parrilha, G. L.; Lessa, J. A.; Santiago, L. J. M.; Kanashiro, M. M.; Boniolo, F. S.; Bortoluzzi, A. J.; Vugman, N. V.; Herbst, M. H.; Horn, A. Synthesis, Crystal Structure, Nuclease and in Vitro Antitumor Activities of a New Mononuclear Copper(II) Complex Containing a Tripodal N<sub>3</sub>O Ligand. *Inorganica Chim Acta* **2006**, *359* (10), 3167–3176. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2006.04.007>.
- (39) Parrilha, G. L.; Ferreira, S. S.; Fernandes, C.; Silva, G. C.; Carvalho, N. M. F.; Antunes, O. A. C.; Drago, V.; Bortoluzzi, A. J.; Horn Jr., A. Properties of ( $\mu$ -Oxo)Di-Iron Complexes and Catalytic Activity toward Cyclohexane Oxidation. *J Braz Chem Soc* **2010**, *21* (4), 603–613. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532010000400004>.

- (40) Menezes, L. B.; Segat, B. B.; Tolentino, H.; Pires, D. C.; Mattos, L. M. de M.; Hottum, H. M.; Pereira, M. D.; Latini, A.; Horn Jr., A.; Fernandes, C. ROS Scavenging of SOD/CAT Mimics Probed by EPR and Reduction of Lipid Peroxidation in *S. Cerevisiae* and Mouse Liver, under Severe Hydroxyl Radical Stress Condition. *J Inorg Biochem* **2023**, *239*, 112062. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.112062>.
- (41) Sies, H. What Is Oxidative Stress?; 2000; pp 1–8. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4649-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4649-8_1).
- (42) Sies, H. Biochemistry of Oxidative Stress. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1986**, *25* (12), 1058–1071. <https://doi.org/10.1002/anie.198610581>.
- (43) Sies, H. Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. *Exp Physiol* **1997**, *82* (2), 291–295. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>.
- (44) Sies, H. Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects. *Antioxidants* **2020**, *9* (9), 852. <https://doi.org/10.3390/antiox9090852>.
- (45) Sies, H. On the History of Oxidative Stress: Concept and Some Aspects of Current Development. *Curr Opin Toxicol* **2018**, *7*, 122–126. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.01.002>.
- (46) Sies, H.; Berndt, C.; Jones, D. P. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem* **2017**, *86* (1), 715–748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>.
- (47) Su, L.-J.; Zhang, J.-H.; Gomez, H.; Murugan, R.; Hong, X.; Xu, D.; Jiang, F.; Peng, Z.-Y. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev* **2019**, *2019*, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2019/5080843>.
- (48) Mas-Bargues, C.; Escrivá, C.; Dromant, M.; Borrás, C.; Viña, J. Lipid Peroxidation as Measured by Chromatographic Determination of Malondialdehyde. Human Plasma Reference Values in Health and Disease. *Arch Biochem Biophys* **2021**, *709*, 108941. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108941>.
- (49) Ito, F.; Sono, Y.; Ito, T. Measurement and Clinical Significance of Lipid Peroxidation as a Biomarker of Oxidative Stress: Oxidative Stress in Diabetes, Atherosclerosis, and Chronic Inflammation. *Antioxidants* **2019**, *8* (3), 72. <https://doi.org/10.3390/antiox8030072>.
- (50) Angelova, P. R.; Esteras, N.; Abramov, A. Y. Mitochondria and Lipid Peroxidation in the Mechanism of Neurodegeneration: Finding Ways for Prevention. *Med Res Rev* **2021**, *41* (2), 770–784. <https://doi.org/10.1002/med.21712>.
- (51) Niki, E.; Yoshida, Y.; Saito, Y.; Noguchi, N. Lipid Peroxidation: Mechanisms, Inhibition, and Biological Effects. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, *338* (1), 668–676. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.072>.
- (52) Girotti, A. W. Mechanisms of Lipid Peroxidation. *J Free Radic Biol Med* **1985**, *1* (2), 87–95. [https://doi.org/10.1016/0748-5514\(85\)90011-X](https://doi.org/10.1016/0748-5514(85)90011-X).
- (53) Cheeseman, K. H. Mechanisms and Effects of Lipid Peroxidation. *Mol Aspects Med* **1993**, *14* (3), 191–197. [https://doi.org/10.1016/0098-2997\(93\)90005-X](https://doi.org/10.1016/0098-2997(93)90005-X).
- (54) Yang, Y. M.; Cho, Y. E.; Hwang, S. Crosstalk between Oxidative Stress and Inflammatory Liver Injury in the Pathogenesis of Alcoholic Liver Disease. *Int J Mol Sci* **2022**, *23* (2), 774. <https://doi.org/10.3390/ijms23020774>.
- (55) Leyane, T. S.; Jere, S. W.; Houreld, N. N. Oxidative Stress in Ageing and Chronic Degenerative Pathologies: Molecular Mechanisms Involved in Counteracting Oxidative Stress and Chronic Inflammation. *Int J Mol Sci* **2022**, *23* (13), 7273. <https://doi.org/10.3390/ijms23137273>.

- (56) Sosa, V.; Moliné, T.; Somoza, R.; Paciucci, R.; Kondoh, H.; Lleonart, M. E. Oxidative Stress and Cancer: An Overview. *Ageing Res Rev* **2013**, *12* (1), 376–390. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.10.004>.
- (57) Galigniana, N. M.; Charó, N. L.; Uranga, R.; Cabanillas, A. M.; Piwien-Pilipuk, G. Oxidative Stress Induces Transcription of Telomeric Repeat-Containing RNA (TERRA) by Engaging PKA Signaling and Cytoskeleton Dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2020**, *1867* (4), 118643. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118643>.
- (58) Ferrari, R. S.; Andrade, C. F. Oxidative Stress and Lung Ischemia-Reperfusion Injury. *Oxid Med Cell Longev* **2015**, *2015*, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2015/590987>.
- (59) Dambrova, M.; Zuurbier, C. J.; Borutaite, V.; Liepinsh, E.; Makrecka-Kuka, M. Energy Substrate Metabolism and Mitochondrial Oxidative Stress in Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury. *Free Radic Biol Med* **2021**, *165*, 24–37. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.01.036>.
- (60) Bardallo, R.; Panisello-Roselló, A.; Sanchez-Nuno, S.; Alva, N.; Roselló-Catafau, J.; Carbonell, T. Nrf2 and Oxidative Stress in Liver Ischemia/Reperfusion Injury. *FEBS J* **2022**, *289* (18), 5463–5479. <https://doi.org/10.1111/febs.16336>.
- (61) Zhao, D.; Yang, J.; Yang, L. Insights for Oxidative Stress and MTOR Signaling in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury under Diabetes. *Oxid Med Cell Longev* **2017**, *2017*, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2017/6437467>.
- (62) Jurk, D.; Wilson, C.; Passos, J. F.; Oakley, F.; Correia-Melo, C.; Greaves, L.; Saretzki, G.; Fox, C.; Lawless, C.; Anderson, R.; Hewitt, G.; Pender, S. L.; Fullard, N.; Nelson, G.; Mann, J.; van de Sluis, B.; Mann, D. A.; von Zglinicki, T. Chronic Inflammation Induces Telomere Dysfunction and Accelerates Ageing in Mice. *Nat Commun* **2014**, *5* (1), 4172. <https://doi.org/10.1038/ncomms5172>.
- (63) Andreadou, I.; Schulz, R.; Papapetropoulos, A.; Turan, B.; Ytrehus, K.; Ferdinandy, P.; Daiber, A.; Di Lisa, F. The Role of Mitochondrial Reactive Oxygen Species, NO and H<sub>2</sub>S in Ischaemia/Reperfusion Injury and Cardioprotection. *J Cell Mol Med* **2020**, *24* (12), 6510–6522. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15279>.
- (64) Chen, W.; Li, D. Reactive Oxygen Species (ROS)-Responsive Nanomedicine for Solving Ischemia-Reperfusion Injury. *Front Chem* **2020**, *8*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00732>.
- (65) Zhao, T.; Wu, W.; Sui, L.; Huang, Q.; Nan, Y.; Liu, J.; Ai, K. Reactive Oxygen Species-Based Nanomaterials for the Treatment of Myocardial Ischemia Reperfusion Injuries. *Bioact Mater* **2022**, *7*, 47–72. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.06.006>.
- (66) Sharma, C.; Kim, S. R. Linking Oxidative Stress and Proteinopathy in Alzheimer's Disease. *Antioxidants* **2021**, *10* (8), 1231. <https://doi.org/10.3390/antiox10081231>.
- (67) Misrani, A.; Tabassum, S.; Yang, L. Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* **2021**, *13*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.617588>.
- (68) Ionescu-Tucker, A.; Cotman, C. W. Emerging Roles of Oxidative Stress in Brain Aging and Alzheimer's Disease. *Neurobiol Aging* **2021**, *107*, 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2021.07.014>.
- (69) Dorszewska, J.; Kowalska, M.; Prendecki, M.; Piekut, T.; Kozłowska, J.; Kozubski, W. Oxidative Stress Factors in Parkinson's Disease. *Neural Regen Res* **2021**, *16* (7), 1383. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.300980>.
- (70) Aborode, A. T.; Pustake, M.; Awuah, W. A.; Alwerdani, M.; Shah, P.; Yarlagadda, R.; Ahmad, S.; Silva Correia, I. F.; Chandra, A.; Nansubuga, E. P.; Abdul-Rahman, T.; Mehta,

- A.; Ali, O.; Amaka, S. O.; Zuñiga, Y. M. H.; Shkodina, A. D.; Inya, O. C.; Shen, B.; Alexiou, A. Targeting Oxidative Stress Mechanisms to Treat Alzheimer's and Parkinson's Disease: A Critical Review. *Oxid Med Cell Longev* **2022**, *2022*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2022/7934442>.
- (71) Dionísio, P. A.; Amaral, J. D.; Rodrigues, C. M. P. Oxidative Stress and Regulated Cell Death in Parkinson's Disease. *Ageing Res Rev* **2021**, *67*, 101263. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101263>.
- (72) Percário, S.; da Silva Barbosa, A.; Varela, E. L. P.; Gomes, A. R. Q.; Ferreira, M. E. S.; de Nazaré Araújo Moreira, T.; Dolabela, M. F. Oxidative Stress in Parkinson's Disease: Potential Benefits of Antioxidant Supplementation. *Oxid Med Cell Longev* **2020**, *2020*, 1–23. <https://doi.org/10.1155/2020/2360872>.
- (73) Trist, B. G.; Hare, D. J.; Double, K. L. Oxidative Stress in the Aging Substantia Nigra and the Etiology of Parkinson's Disease. *Aging Cell* **2019**, *18* (6). <https://doi.org/10.1111/acel.13031>.
- (74) Zhang, P.; Li, T.; Wu, X.; Nice, E. C.; Huang, C.; Zhang, Y. Oxidative Stress and Diabetes: Antioxidative Strategies. *Front Med* **2020**, *14* (5), 583–600. <https://doi.org/10.1007/s11684-019-0729-1>.
- (75) Valle, M. S.; Russo, C.; Malaguarnera, L. Protective Role of Vitamin D against Oxidative Stress in Diabetic Retinopathy. *Diabetes Metab Res Rev* **2021**, *37* (8). <https://doi.org/10.1002/dmrr.3447>.
- (76) Meng, T.; Qin, W.; Liu, B. SIRT1 Antagonizes Oxidative Stress in Diabetic Vascular Complication. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2020**, *11*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.568861>.
- (77) Yarbeygi, H.; Sathyapalan, T.; Atkin, S. L.; Sahebkar, A. Molecular Mechanisms Linking Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. *Oxid Med Cell Longev* **2020**, *2020*, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2020/8609213>.
- (78) Banks, W. A.; Rhea, E. M. The Blood–Brain Barrier, Oxidative Stress, and Insulin Resistance. *Antioxidants* **2021**, *10* (11), 1695. <https://doi.org/10.3390/antiox10111695>.
- (79) Fonseca, L. J. S. da; Nunes-Souza, V.; Goulart, M. O. F.; Rabelo, L. A. Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis: What the Future Might Hold Regarding Novel Biomarkers and Add-On Therapies. *Oxid Med Cell Longev* **2019**, *2019*, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2019/7536805>.
- (80) Behl, T.; Upadhyay, T.; Singh, S.; Chigurupati, S.; Alsubayiel, A. M.; Mani, V.; Vargas-De-La-Cruz, C.; Uivarosan, D.; Bustea, C.; Sava, C.; Stoicescu, M.; Radu, A.-F.; Bungau, S. G. Polyphenols Targeting MAPK Mediated Oxidative Stress and Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *Molecules* **2021**, *26* (21), 6570. <https://doi.org/10.3390/molecules26216570>.
- (81) Ferreira, H. B.; Melo, T.; Paiva, A.; Domingues, M. do R. Insights in the Role of Lipids, Oxidative Stress and Inflammation in Rheumatoid Arthritis Unveiled by New Trends in Lipidomic Investigations. *Antioxidants* **2021**, *10* (1), 45. <https://doi.org/10.3390/antiox10010045>.
- (82) Krata, N.; Zagożdżon, R.; Foroniewicz, B.; Mucha, K. Oxidative Stress in Kidney Diseases: The Cause or the Consequence? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **2018**, *66* (3), 211–220. <https://doi.org/10.1007/s00005-017-0496-0>.
- (83) Rapa, S. F.; Di Iorio, B. R.; Campiglia, P.; Heidland, A.; Marzocco, S. Inflammation and Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease—Potential Therapeutic Role of Minerals, Vitamins and Plant-Derived Metabolites. *Int J Mol Sci* **2019**, *21* (1), 263. <https://doi.org/10.3390/ijms21010263>.



- (84) Ho, H.-J.; Shirakawa, H. Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Chronic Kidney Disease. *Cells* **2022**, *12* (1), 88. <https://doi.org/10.3390/cells12010088>.
- (85) Gyurászová, M.; Gurecká, R.; Bábíčková, J.; Tóthová, Ľ. Oxidative Stress in the Pathophysiology of Kidney Disease: Implications for Noninvasive Monitoring and Identification of Biomarkers. *Oxid Med Cell Longev* **2020**, *2020*, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2020/5478708>.
- (86) Podkowińska, A.; Formanowicz, D. Chronic Kidney Disease as Oxidative Stress- and Inflammatory-Mediated Cardiovascular Disease. *Antioxidants* **2020**, *9* (8), 752. <https://doi.org/10.3390/antiox9080752>.
- (87) Gulcin, İ. Antioxidants and Antioxidant Methods: An Updated Overview. *Arch Toxicol* **2020**, *94* (3), 651–715. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>.
- (88) Hunyadi, A. The Mechanism(s) of Action of Antioxidants: From Scavenging Reactive Oxygen/Nitrogen Species to Redox Signaling and the Generation of Bioactive Secondary Metabolites. *Med Res Rev* **2019**, *39* (6), 2505–2533. <https://doi.org/10.1002/med.21592>.
- (89) Zhang, Y.; Roh, Y. J.; Han, S.-J.; Park, I.; Lee, H. M.; Ok, Y. S.; Lee, B. C.; Lee, S.-R. Role of Selenoproteins in Redox Regulation of Signaling and the Antioxidant System: A Review. *Antioxidants* **2020**, *9* (5), 383. <https://doi.org/10.3390/antiox9050383>.
- (90) Matés, J. M.; Pérez-Gómez, C.; De Castro, I. N. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clin Biochem* **1999**, *32* (8), 595–603. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(99\)00075-2](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(99)00075-2).
- (91) Neha, K.; Haider, M. R.; Pathak, A.; Yar, M. S. Medicinal Prospects of Antioxidants: A Review. *Eur J Med Chem* **2019**, *178*, 687–704. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.010>.
- (92) Pisoschi, A. M.; Pop, A.; Iordache, F.; Stanca, L.; Predoi, G.; Serban, A. I. Oxidative Stress Mitigation by Antioxidants - An Overview on Their Chemistry and Influences on Health Status. *Eur J Med Chem* **2021**, *209*, 112891. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112891>.
- (93) Brillo, V.; Chieragato, L.; Leanza, L.; Muccioli, S.; Costa, R. Mitochondrial Dynamics, ROS, and Cell Signaling: A Blended Overview. *Life* **2021**, *11* (4), 332. <https://doi.org/10.3390/life11040332>.
- (94) Zorov, D. B.; Juhaszova, M.; Sollott, S. J. Mitochondrial ROS-Induced ROS Release: An Update and Review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2006**, *1757* (5–6), 509–517. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.04.029>.
- (95) Zorov, D. B.; Juhaszova, M.; Sollott, S. J. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiol Rev* **2014**, *94* (3), 909–950. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013>.
- (96) Wittenberg, B. A.; Wittenberg, J. B. Transport of Oxygen in Muscle. *Annu Rev Physiol* **1989**, *51* (1), 857–878. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.51.030189.004233>.
- (97) Pias, S. C. How Does Oxygen Diffuse from Capillaries to Tissue Mitochondria? Barriers and Pathways. *J Physiol* **2021**, *599* (6), 1769–1782. <https://doi.org/10.1113/JP278815>.
- (98) Mori, M. P.; Penjweini, R.; Knutson, J. R.; Wang, P.; Hwang, P. M. Mitochondria and Oxygen Homeostasis. *FEBS J* **2022**, *289* (22), 6959–6968. <https://doi.org/10.1111/febs.16115>.
- (99) Papa, S.; Martino, P. L.; Capitanio, G.; Gaballo, A.; De Rasmio, D.; Signorile, A.; Petruzzella, V. The Oxidative Phosphorylation System in Mammalian Mitochondria; 2012; pp 3–37. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-2869-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-007-2869-1_1).

- (100) Kadenbach, B. Introduction to Mitochondrial Oxidative Phosphorylation; 2012; pp 1–11. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3573-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3573-0_1).
- (101) Wang, J. H. The Molecular Mechanism of Oxidative Phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1967**, *58* (1), 37–44. <https://doi.org/10.1073/pnas.58.1.37>.
- (102) Prebble, J. N. Successful Theory Development in Biology: A Consideration of the Theories of Oxidative Phosphorylation Proposed by Davies and Krebs, Williams and Mitchell. *Biosci Rep* **1996**, *16* (3), 207–215. <https://doi.org/10.1007/BF01207335>.
- (103) Inoue, M.; Sato, E. F.; Nishikawa, M.; Park, A.-M.; Kira, Y.; Imada, I.; Utsumi, K. Mitochondrial Generation of Reactive Oxygen Species and Its Role in Aerobic Life. *Curr Med Chem* **2003**, *10* (23), 2495–2505. <https://doi.org/10.2174/0929867033456477>.
- (104) Guo, R.; Gu, J.; Zong, S.; Wu, M.; Yang, M. Structure and Mechanism of Mitochondrial Electron Transport Chain. *Biomed J* **2018**, *41* (1), 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2017.12.001>.
- (105) Nolfi-Donagan, D.; Braganza, A.; Shiva, S. Mitochondrial Electron Transport Chain: Oxidative Phosphorylation, Oxidant Production, and Methods of Measurement. *Redox Biol* **2020**, *37*, 101674. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101674>.
- (106) Li, L.; Dong, X.; Shu, B.; Wang, Z.; Hu, Q.; Zhong, G. Iron–Sulfur Protein in Mitochondrial Complexes of *Spodoptera litura* as Potential Site for ROS Generation. *J Insect Physiol* **2014**, *71*, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.08.009>.
- (107) Veatch, J. R.; McMurray, M. A.; Nelson, Z. W.; Gottschling, D. E. Mitochondrial Dysfunction Leads to Nuclear Genome Instability via an Iron-Sulfur Cluster Defect. *Cell* **2009**, *137* (7), 1247–1258. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.014>.
- (108) Hirst, J.; King, M. S.; Pryde, K. R. The Production of Reactive Oxygen Species by Complex I. *Biochem Soc Trans* **2008**, *36* (5), 976–980. <https://doi.org/10.1042/BST0360976>.
- (109) Grivennikova, V. G.; Vinogradov, A. D. Generation of Superoxide by the Mitochondrial Complex I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2006**, *1757* (5–6), 553–561. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.03.013>.
- (110) de Souza, W. R.; Vessicchi, R.; Dorta, D. J.; Uyemura, S. A.; Curti, C.; Vargas-Rechia, C. G. Characterization of *Rubus fruticosus* Mitochondria and Salicylic Acid Inhibition of Reactive Oxygen Species Generation at Complex III/Q Cycle: Potential Implications for Hypersensitive Response in Plants. *J Bioenerg Biomembr* **2011**, *43* (3), 237–246. <https://doi.org/10.1007/s10863-011-9357-4>.
- (111) Nolfi-Donagan, D.; Braganza, A.; Shiva, S. Mitochondrial Electron Transport Chain: Oxidative Phosphorylation, Oxidant Production, and Methods of Measurement. *Redox Biol* **2020**, *37*, 101674. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101674>.
- (112) Bleier, L.; Dröse, S. Superoxide Generation by Complex III: From Mechanistic Rationales to Functional Consequences. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2013**, *1827* (11–12), 1320–1331. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.12.002>.
- (113) Purushothaman, S.; Nair, R. R. Mitoprotective Antioxidant EUK-134 Stimulates Fatty Acid Oxidation and Prevents Hypertrophy in H9C2 Cells. *Mol Cell Biochem* **2016**, *420* (1–2), 185–194. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2788-9>.
- (114) Melov, S.; Doctrow, S. R.; Schneider, J. A.; Haberson, J.; Patel, M.; Coskun, P. E.; Huffman, K.; Wallace, D. C.; Malfroy, B. Lifespan Extension and Rescue of Spongiform Encephalopathy in Superoxide Dismutase 2 Nullizygous Mice Treated with Superoxide Dismutase–Catalase Mimetics. *The Journal of Neuroscience* **2001**, *21* (21), 8348–8353. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-21-08348.2001>.

- (115) Jung, C.; Rong, Y.; Doctrow, S.; Baudry, M.; Malfroy, B.; Xu, Z. Synthetic Superoxide Dismutase/Catalase Mimetics Reduce Oxidative Stress and Prolong Survival in a Mouse Amyotrophic Lateral Sclerosis Model. *Neurosci Lett* **2001**, *304* (3), 157–160. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)01784-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)01784-0).
- (116) Melov, S.; Ravenscroft, J.; Malik, S.; Gill, M. S.; Walker, D. W.; Clayton, P. E.; Wallace, D. C.; Malfroy, B.; Doctrow, S. R.; Lithgow, G. J. Extension of Life-Span with Superoxide Dismutase/Catalase Mimetics. *Science (1979)* **2000**, *289* (5484), 1567–1569. <https://doi.org/10.1126/science.289.5484.1567>.
- (117) Melov, S.; Ravenscroft, J.; Malik, S.; Gill, M. S.; Walker, D. W.; Clayton, P. E.; Wallace, D. C.; Malfroy, B.; Doctrow, S. R.; Lithgow, G. J. Extension of Life-Span with Superoxide Dismutase/Catalase Mimetics. *Science (1979)* **2000**, *289* (5484), 1567–1569. <https://doi.org/10.1126/science.289.5484.1567>.
- (118) Rong, Y.; Doctrow, S. R.; Tocco, G.; Baudry, M. EUK-134, a Synthetic Superoxide Dismutase and Catalase Mimetic, Prevents Oxidative Stress and Attenuates Kainate-Induced Neuropathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, *96* (17), 9897–9902. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.17.9897>.
- (119) Bruce, A. J.; Malfroy, B.; Baudry, M. Beta-Amyloid Toxicity in Organotypic Hippocampal Cultures: Protection by EUK-8, a Synthetic Catalytic Free Radical Scavenger. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1996**, *93* (6), 2312–2316. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.6.2312>.
- (120) Meyerstein, D. Re-Examining Fenton and Fenton-like Reactions. *Nat Rev Chem* **2021**, *5* (9), 595–597. <https://doi.org/10.1038/s41570-021-00310-4>.
- (121) Stefan I. Liochev. The Mechanism of “Fenton-Like” Reactions and Their Importance for Biological Systems. A Biologist’s View. In *Metal Ions in Biological Systems*; 1999; p 39.
- (122) Winterbourn, C. C. The Biological Chemistry of Hydrogen Peroxide; 2013; pp 3–25. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405881-1.00001-X>.
- (123) Gaetani, G.; Galiano, S.; Canepa, L.; Ferraris, A.; Kirkman, H. Catalase and Glutathione Peroxidase Are Equally Active in Detoxification of Hydrogen Peroxide in Human Erythrocytes. *Blood* **1989**, *73* (1), 334–339. <https://doi.org/10.1182/blood.V73.1.334.334>.
- (124) Galijasevic, S. The Development of Myeloperoxidase Inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2019**, *29* (1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.11.031>.
- (125) Davies, M. J. Myeloperoxidase: Mechanisms, Reactions and Inhibition as a Therapeutic Strategy in Inflammatory Diseases. *Pharmacol Ther* **2021**, *218*, 107685. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107685>.
- (126) Furtmüller, P. G.; Obinger, C.; Hsuanyu, Y.; Dunford, H. B. Mechanism of Reaction of Myeloperoxidase with Hydrogen Peroxide and Chloride Ion. *Eur J Biochem* **2000**, *267* (19), 5858–5864. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01491.x>.
- (127) Jankovic, A.; Korac, A.; Buzadzic, B.; Stancic, A.; Otasevic, V.; Ferdinandy, P.; Daiber, A.; Korac, B. Targeting the NO/Superoxide Ratio in Adipose Tissue: Relevance to Obesity and Diabetes Management. *Br J Pharmacol* **2017**, *174* (12), 1570–1590. <https://doi.org/10.1111/bph.13498>.
- (128) Miles, A. M.; Bohle, D. S.; Glassbrenner, P. A.; Hansert, B.; Wink, D. A.; Grisham, M. B. Modulation of Superoxide-Dependent Oxidation and Hydroxylation Reactions by Nitric Oxide. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271* (1), 40–47. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.1.40>.

- (129) Sies, H.; Jones, D. P. Reactive Oxygen Species (ROS) as Pleiotropic Physiological Signalling Agents. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2020**, *21* (7), 363–383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>.
- (130) Chance, B.; Sies, H.; Boveris, A. Hydroperoxide Metabolism in Mammalian Organs. *Physiol Rev* **1979**, *59* (3), 527–605. <https://doi.org/10.1152/physrev.1979.59.3.527>.
- (131) Giorgio, M.; Trinei, M.; Migliaccio, E.; Pelicci, P. G. Hydrogen Peroxide: A Metabolic by-Product or a Common Mediator of Ageing Signals? *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**, *8* (9), 722–728. <https://doi.org/10.1038/nrm2240>.
- (132) Green, D. R.; Galluzzi, L.; Kroemer, G. Mitochondria and the Autophagy–Inflammation–Cell Death Axis in Organismal Aging. *Science (1979)* **2011**, *333* (6046), 1109–1112. <https://doi.org/10.1126/science.1201940>.
- (133) Bratic, I.; Trifunovic, A. Mitochondrial Energy Metabolism and Ageing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2010**, *1797* (6–7), 961–967. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.01.004>.
- (134) SHARPE, M. A.; OLLOSSON, R.; STEWART, V. C.; CLARK, J. B. Oxidation of Nitric Oxide by Oxomanganese–Salen Complexes: A New Mechanism for Cellular Protection by Superoxide Dismutase/Catalase Mimetics. *Biochemical Journal* **2002**, *366* (1), 97–107. <https://doi.org/10.1042/bj20020154>.
- (135) Shahraki, S. Schiff Base Compounds as Artificial Metalloenzymes. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2022**, *218*, 112727. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112727>.
- (136) Doctrow, S. R.; Huffman, K.; Marcus, C. B.; Tocco, G.; Malfroy, E.; Adinolfi, C. A.; Kruk, H.; Baker, K.; Lazarowych, N.; Mascarenhas, J.; Malfroy, B. Salen–Manganese Complexes as Catalytic Scavengers of Hydrogen Peroxide and Cytoprotective Agents: Structure–Activity Relationship Studies. *J Med Chem* **2002**, *45* (20), 4549–4558. <https://doi.org/10.1021/jm020207y>.
- (137) Rosa, A. C.; Corsi, D.; Cavi, N.; Bruni, N.; Dosio, F. Superoxide Dismutase Administration: A Review of Proposed Human Uses. *Molecules* **2021**, *26* (7), 1844. <https://doi.org/10.3390/molecules26071844>.
- (138) Rouco, L.; Maneiro, M. Neuroprotective Effects of Metalosalen Complexes against Oxidative Stress. *Neural Regen Res* **2021**, *16* (1), 121. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.286966>.
- (139) Santos, A. C. F.; Monteiro, L. P. G.; Gomes, A. C. C.; Martel, F.; Santos, T. M.; Ferreira, B. J. M. L. NSAID-Based Coordination Compounds for Biomedical Applications: Recent Advances and Developments. *Int J Mol Sci* **2022**, *23* (5), 2855. <https://doi.org/10.3390/ijms23052855>.
- (140) Psomas, G. Copper(II) and Zinc(II) Coordination Compounds of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: Structural Features and Antioxidant Activity. *Coord Chem Rev* **2020**, *412*, 213259. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213259>.
- (141) Dimiza, F.; Fountoulaki, S.; Papadopoulos, A. N.; Kontogiorgis, C. A.; Tangoulis, V.; Raptopoulou, C. P.; Psycharis, V.; Terzis, A.; Kessissoglou, D. P.; Psomas, G. Non-Steroidal Antiinflammatory Drug–Copper(II) Complexes: Structure and Biological Perspectives. *Dalton Transactions* **2011**, *40* (34), 8555. <https://doi.org/10.1039/c1dt10714c>.
- (142) Tarushi, A.; Raptopoulou, C. P.; Psycharis, V.; Kessissoglou, D. P.; Papadopoulos, A. N.; Psomas, G. Structure and Biological Perspectives of Cu(II)–Indomethacin Complexes. *J Inorg Biochem* **2014**, *140*, 185–198. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.07.006>.

- (143) Perontsis, S.; Hatzidimitriou, A. G.; Begou, O.-A.; Papadopoulos, A. N.; Psomas, G. Characterization and Biological Properties of Copper(II)-Ketoprofen Complexes. *J Inorg Biochem* **2016**, *162*, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.06.001>.
- (144) Tarushi, A.; Karafidou, Z.; Kljun, J.; Turel, I.; Psomas, G.; Papadopoulos, A. N.; Kessissoglou, D. P. Antioxidant Capacity and DNA-Interaction Studies of Zinc Complexes with a Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug, Mefenamic Acid. *J Inorg Biochem* **2013**, *128*, 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.07.013>.
- (145) Tarushi, A.; Totta, X.; Papadopoulos, A.; Kljun, J.; Turel, I.; Kessissoglou, D. P.; Psomas, G. Antioxidant Activity and Interaction with DNA and Albumins of Zinc–Tolfenamate Complexes. Crystal Structure of [Zn(Tolfenamate)<sub>2</sub>(2,2'-Dipyridylketoneoxime)<sub>2</sub>]. *Eur J Med Chem* **2014**, *74*, 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.12.019>.
- (146) Halliwell, B.; Adhikary, A.; Dingfelder, M.; Dizdaroglu, M. Hydroxyl Radical Is a Significant Player in Oxidative DNA Damage *in Vivo*. *Chem Soc Rev* **2021**, *50* (15), 8355–8360. <https://doi.org/10.1039/D1CS00044F>.
- (147) Pham, A. N.; Xing, G.; Miller, C. J.; Waite, T. D. Fenton-like Copper Redox Chemistry Revisited: Hydrogen Peroxide and Superoxide Mediation of Copper-Catalyzed Oxidant Production. *J Catal* **2013**, *301*, 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.jcat.2013.01.025>.
- (148) Winterbourn, C. C. Toxicity of Iron and Hydrogen Peroxide: The Fenton Reaction. *Toxicol Lett* **1995**, *82–83*, 969–974. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(95\)03532-X](https://doi.org/10.1016/0378-4274(95)03532-X).
- (149) Biliński, T.; Krawiec, Z.; Liczmański, A.; Litwińska, J. Is Hydroxyl Radical Generated by the Fenton Reaction *in Vivo*? *Biochem Biophys Res Commun* **1985**, *130* (2), 533–539. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(85\)90449-8](https://doi.org/10.1016/0006-291X(85)90449-8).
- (150) Tvrdá, E.; Benko, F. Free Radicals: What They Are and What They Do. In *Pathology*; Elsevier, 2020; pp 3–13. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815972-9.00001-9>.
- (151) Huang, X.; He, D.; Pan, Z.; Luo, G.; Deng, J. Reactive-Oxygen-Species-Scavenging Nanomaterials for Resolving Inflammation. *Mater Today Bio* **2021**, *11*, 100124. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2021.100124>.
- (152) Victória, H. F. V.; Ferreira, D. C.; Filho, J. B. G.; Martins, D. C. S.; Pinheiro, M. V. B.; Sáfar, G. de A. M.; Krambrock, K. Detection of Singlet Oxygen by EPR: The Instability of the Nitroxyl Radicals. *Free Radic Biol Med* **2022**, *180*, 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.12.303>.
- (153) Scheinok, S.; Capeloa, T.; Porporato, P. E.; Sonveaux, P.; Gallez, B. An EPR Study Using Cyclic Hydroxylamines To Assess The Level of Mitochondrial ROS in Superinvasive Cancer Cells. *Cell Biochem Biophys* **2020**, *78* (3), 249–254. <https://doi.org/10.1007/s12013-020-00921-6>.
- (154) Jonas, M. Concepts and Methods of ESR Dating. *Radiat Meas* **1997**, *27* (5–6), 943–973. [https://doi.org/10.1016/S1350-4487\(97\)00202-3](https://doi.org/10.1016/S1350-4487(97)00202-3).
- (155) Roessler, M. M.; Salvadori, E. Principles and Applications of EPR Spectroscopy in the Chemical Sciences. *Chem Soc Rev* **2018**, *47* (8), 2534–2553. <https://doi.org/10.1039/C6CS00565A>.
- (156) Pieper, G. M.; Felix, C. C.; Kalyanaraman, B.; Turk, M.; Roza, A. M. Detection by ESR of DMPO Hydroxyl Adduct Formation from Islets of Langerhans. *Free Radic Biol Med* **1995**, *19* (2), 219–225. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)00018-S](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)00018-S).
- (157) Walger, E.; Marlin, N.; Mortha, G.; Molton, F.; Duboc, C. Hydroxyl Radical Generation by the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Cull/Phenanthroline System under Both Neutral and Alkaline Conditions: An EPR/Spin-Trapping Investigation. *Applied Sciences* **2021**, *11* (2), 687. <https://doi.org/10.3390/app11020687>.

- (158) Segat, B. B.; Menezes, L. B.; Cervo, R.; Cargnelutti, R.; Tolentino, H.; Latini, A.; Horn Jr., A.; Fernandes, C. Scavenging of Reactive Species Probed by EPR and Ex-Vivo Nanomolar Reduction of Lipid Peroxidation of Manganese Complexes. *J Inorg Biochem* **2023**, *239*, 112060. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.112060>.
- (159) Jaganjac, M.; Cindrić, M.; Jakovčević, A.; Žarković, K.; Žarković, N. Lipid Peroxidation in Brain Tumors. *Neurochem Int* **2021**, *149*, 105118. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105118>.
- (160) Peoples, J. N.; Saraf, A.; Ghazal, N.; Pham, T. T.; Kwong, J. Q. Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Heart Disease. *Exp Mol Med* **2019**, *51* (12), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0355-7>.
- (161) Huang, M. L.-H.; Chiang, S.; Kalinowski, D. S.; Bae, D.-H.; Sahni, S.; Richardson, D. R. The Role of the Antioxidant Response in Mitochondrial Dysfunction in Degenerative Diseases: Cross-Talk between Antioxidant Defense, Autophagy, and Apoptosis. *Oxid Med Cell Longev* **2019**, *2019*, 1–26. <https://doi.org/10.1155/2019/6392763>.
- (162) Jiang, Q.; Yin, J.; Chen, J.; Ma, X.; Wu, M.; Liu, G.; Yao, K.; Tan, B.; Yin, Y. Mitochondria-Targeted Antioxidants: A Step towards Disease Treatment. *Oxid Med Cell Longev* **2020**, *2020*, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2020/8837893>.
- (163) Jong, C. J.; Sandal, P.; Schaffer, S. W. The Role of Taurine in Mitochondria Health: More Than Just an Antioxidant. *Molecules* **2021**, *26* (16), 4913. <https://doi.org/10.3390/molecules26164913>.
- (164) Meza-Buendia, A. K.; Aparicio-Trejo, O. E.; Díaz, F.; Caamal-Monsreal, C.; Pedraza-Chaverri, J.; Álvarez-Delgado, C.; Paschke, K.; Rosas, C. High Resolution Respirometry of Isolated Mitochondria from Adult Octopus Maya (Class: Cephalopoda) Systemic Heart. *PLoS One* **2022**, *17* (8), e0273554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273554>.
- (165) Meza-Buendia, A. K.; Aparicio-Trejo, O. E.; Díaz, F.; Caamal-Monsreal, C.; Pedraza-Chaverri, J.; Álvarez-Delgado, C.; Paschke, K.; Rosas, C. High Resolution Respirometry of Isolated Mitochondria from Adult Octopus Maya (Class: Cephalopoda) Systemic Heart. *PLoS One* **2022**, *17* (8), e0273554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273554>.
- (166) Meza-Buendia, A. K.; Aparicio-Trejo, O. E.; Díaz, F.; Caamal-Monsreal, C.; Pedraza-Chaverri, J.; Álvarez-Delgado, C.; Paschke, K.; Rosas, C. High Resolution Respirometry of Isolated Mitochondria from Adult Octopus Maya (Class: Cephalopoda) Systemic Heart. *PLoS One* **2022**, *17* (8), e0273554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273554>.
- (167) Krajčová, A.; Urban, T.; Megvint, D.; Waldauf, P.; Balík, M.; Hlavička, J.; Budera, P.; Janoušek, L.; Pokorná, E.; Duška, F. High Resolution Respirometry to Assess Function of Mitochondria in Native Homogenates of Human Heart Muscle. *PLoS One* **2020**, *15* (1), e0226142. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226142>.
- (168) Risiglione, P.; Leggio, L.; Cubisino, S. A. M.; Reina, S.; Paternò, G.; Marchetti, B.; Magri, A.; Iraci, N.; Messina, A. High-Resolution Respirometry Reveals MPP+ Mitochondrial Toxicity Mechanism in a Cellular Model of Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci* **2020**, *21* (21), 7809. <https://doi.org/10.3390/ijms21217809>.
- (169) Mislov, D.; Cifrek, M.; Krois, I.; Dzapov, H. Measurement of Dissolved Hydrogen Concentration with Clark Electrode. In *2015 IEEE Sensors Applications Symposium (SAS)*; IEEE, 2015; pp 1–5. <https://doi.org/10.1109/SAS.2015.7133656>.
- (170) Li, Z.; Graham, B. H. Measurement of Mitochondrial Oxygen Consumption Using a Clark Electrode; 2012; pp 63–72. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-504-6\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-504-6_5).
- (171) Quispe, R. L.; Jaramillo, M. L.; Galant, L. S.; Engel, D.; Dafre, A. L.; Teixeira da Rocha, J. B.; Radi, R.; Farina, M.; de Bem, A. F. Diphenyl Diselenide Protects Neuronal Cells against Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction: Involvement of the

- Glutathione-Dependent Antioxidant System. *Redox Biol* **2019**, *20*, 118–129. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.09.014>.
- (172) Vringer, E.; Tait, S. W. G. Mitochondria and Inflammation: Cell Death Heats Up. *Front Cell Dev Biol* **2019**, *7*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00100>.
- (173) Missiroli, S.; Genovese, I.; Perrone, M.; Vezzani, B.; Vitto, V. A. M.; Giorgi, C. The Role of Mitochondria in Inflammation: From Cancer to Neurodegenerative Disorders. *J Clin Med* **2020**, *9* (3), 740. <https://doi.org/10.3390/jcm9030740>.
- (174) Marchi, S.; Guilbaud, E.; Tait, S. W. G.; Yamazaki, T.; Galluzzi, L. Mitochondrial Control of Inflammation. *Nat Rev Immunol* **2023**, *23* (3), 159–173. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00760-x>.
- (175) Wu, X.-X.; Huang, X.-L.; Chen, R.-R.; Li, T.; Ye, H.-J.; Xie, W.; Huang, Z.-M.; Cao, G.-Z. Paeoniflorin Prevents Intestinal Barrier Disruption and Inhibits Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammation in Caco-2 Cell Monolayers. *Inflammation* **2019**, *42* (6), 2215–2225. <https://doi.org/10.1007/s10753-019-01085-z>.
- (176) Dong, N.; Li, X.; Xue, C.; Zhang, L.; Wang, C.; Xu, X.; Shan, A. *Astragalus Polysaccharides* Alleviates LPS-induced Inflammation via the NF- $\kappa$ B/MAPK Signaling Pathway. *J Cell Physiol* **2020**, *235* (7–8), 5525–5540. <https://doi.org/10.1002/jcp.29452>.
- (177) Page, M. J.; Kell, D. B.; Pretorius, E. The Role of Lipopolysaccharide-Induced Cell Signalling in Chronic Inflammation. *Chronic Stress* **2022**, *6*, 247054702210763. <https://doi.org/10.1177/24705470221076390>.
- (178) Di Lorenzo, F.; Duda, K. A.; Lanzetta, R.; Silipo, A.; De Castro, C.; Molinaro, A. A Journey from Structure to Function of Bacterial Lipopolysaccharides. *Chem Rev* **2022**, *122* (20), 15767–15821. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c01321>.
- (179) Miller, S. I.; Ernst, R. K.; Bader, M. W. LPS, TLR4 and Infectious Disease Diversity. *Nat Rev Microbiol* **2005**, *3* (1), 36–46. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1068>.
- (180) JERALA, R. Structural Biology of the LPS Recognition. *International Journal of Medical Microbiology* **2007**, *297* (5), 353–363. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.04.001>.
- (181) Fenton, M. J.; Golenbock, D. T. LPS-Binding Proteins and Receptors. *J Leukoc Biol* **1998**, *64* (1), 25–32. <https://doi.org/10.1002/jlb.64.1.25>.
- (182) García-Valdivia, A. A.; Jannus, F.; García-García, A.; Choquesillo-Lazarte, D.; Fernández, B.; Medina-O'donnell, M.; Lupiáñez, J. A.; Cepeda, J.; Reyes-Zurita, F. J.; Rodríguez-Diéguez, A. Anti-Cancer and Anti-Inflammatory Activities of a New Family of Coordination Compounds Based on Divalent Transition Metal Ions and Indazole-3-Carboxylic Acid. *J Inorg Biochem* **2021**, *215*, 111308. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111308>.
- (183) McCleverty, J. A. Chemistry of Nitric Oxide Relevant to Biology. *Chem Rev* **2004**, *104* (2), 403–418. <https://doi.org/10.1021/cr020623q>.
- (184) Butler, A. R.; Williams, D. L. H. The Physiological Role of Nitric Oxide. *Chem Soc Rev* **1993**, *22* (4), 233. <https://doi.org/10.1039/cs9932200233>.
- (185) Stream, J. O.; Grissom, C. K. Update on High-Altitude Pulmonary Edema: Pathogenesis, Prevention, and Treatment. *Wilderness Environ Med* **2008**, *19* (4), 293. <https://doi.org/10.1580/07-WEME-REV-173.1>.
- (186) DUPLAIN, H.; SARTORI, C.; LEPORI, M.; EGLI, M.; ALLEMANN, Y.; NICOD, P.; SCHERRER, U. Exhaled Nitric Oxide in High-Altitude Pulmonary Edema. *Am J Respir Crit Care Med* **2000**, *162* (1), 221–224. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.162.1.9908039>.
- (187) Stream, J. O.; Grissom, C. K. Update on High-Altitude Pulmonary Edema: Pathogenesis, Prevention, and Treatment. *Wilderness Environ Med* **2008**, *19* (4), 293. <https://doi.org/10.1580/07-WEME-REV-173.1>.

- (188) Maiorana, A.; O'??Driscoll, G.; Taylor, R.; Green, D. Exercise and the Nitric Oxide Vasodilator System. *Sports Medicine* **2003**, *33* (14), 1013–1035. <https://doi.org/10.2165/00007256-200333140-00001>.
- (189) Shukla, S.; Mishra, A. P. Metal Complexes Used as Anti-Inflammatory Agents: Synthesis, Characterization and Anti-Inflammatory Action of VO(II)-Complexes. *Arabian Journal of Chemistry* **2019**, *12* (7), 1715–1721. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.08.020>.
- (190) Horn, A.; Fernandes, C.; Bortoluzzi, A. J.; Vugman, N. V.; Herbst, M. H. Coordination Chemistry of the New Ligand 1-(Bis-Pyridin-2-Ylmethyl-Amino)-3-Chloropropan-2-OL (HPCINOL) with Copper(II). X-Ray Crystal Structure, Spectroscopic and Electrochemical Properties of the Complex [Cu(HPCINOL)(CH<sub>3</sub>CN)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. *J Mol Struct* **2005**, *749* (1–3), 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2005.03.045>.
- (191) Deawati, Y.; Onggo, D.; Mulyani, I.; Hastiawan, I.; Utami, R. A.; Kurnia, D. Synthesis of [Mn(Salen)Cl] Complex Compound and Superoxide Dismutase Activity Determination through Non-Enzymatic Method. *Key Eng Mater* **2019**, *811*, 22–27. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.811.22>.
- (192) Batista, L. C.; de Souza, F. S.; de Assis, V. M.; Seabra, S. H.; Bortoluzzi, A. J.; Rennó, M. N.; Horn, A.; DaMatta, R. A.; Fernandes, C. Antiproliferative Activity and Conversion of Tachyzoite to Bradyzoite of *Toxoplasma Gondii* Promoted by New Zinc Complexes Containing Sulfadiazine. *RSC Adv* **2015**, *5* (122), 100606–100617. <https://doi.org/10.1039/C5RA17690E>.
- (193) Katila, N.; Bhurtel, S.; Park, P.-H.; Choi, D.-Y. Metformin Attenuates Rotenone-Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Damage via the AKT/Nrf2 Pathway. *Neurochem Int* **2021**, *148*, 105120. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105120>.
- (194) Wu, H.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Xu, F.; Chen, J.; Duan, L.; Zhang, T.; Wang, J.; Zhang, F. Breaking the Vicious Loop between Inflammation, Oxidative Stress and Coagulation, a Novel Anti-Thrombus Insight of Nattokinase by Inhibiting LPS-Induced Inflammation and Oxidative Stress. *Redox Biol* **2020**, *32*, 101500. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101500>.
- (195) Jayachandra, K.; Gowda, M. D. M.; Rudresha, G. V.; Manjuprasanna, V. N.; Urs, A. P.; Nandana, M. B.; Bharatha, M.; Jameel, N. M.; Vishwanath, B. S. Inhibition of SPLA<sub>2</sub> Enzyme Activity by Cell-permeable Antioxidant EUK-8 and Downregulation of P38, Akt, and P65 Signals Induced by SPLA<sub>2</sub> in Inflammatory Mouse Paw Edema Model. *J Cell Biochem* **2023**, *124* (2), 294–307. <https://doi.org/10.1002/jcb.30366>.
- (196) Rouco, L.; González-Noya, A. M.; Pedrido, R.; Maneiro, M. Pursuing the Elixir of Life: In Vivo Antioxidative Effects of Manganosalen Complexes. *Antioxidants* **2020**, *9* (8), 727. <https://doi.org/10.3390/antiox9080727>.
- (197) Myhre, O.; Andersen, J. M.; Aarnes, H.; Fonnum, F. Evaluation of the Probes 2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate, Luminol, and Lucigenin as Indicators of Reactive Species Formation. *Biochem Pharmacol* **2003**, *65* (10), 1575–1582. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00083-2](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00083-2).
- (198) Yu, D.; Zha, Y.; Zhong, Z.; Ruan, Y.; Li, Z.; Sun, L.; Hou, S. Improved Detection of Reactive Oxygen Species by DCFH-DA: New Insight into Self-Amplification of Fluorescence Signal by Light Irradiation. *Sens Actuators B Chem* **2021**, *339*, 129878. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.129878>.
- (199) Guevara, I.; Iwanejko, J.; Dembińska-Kieć, A.; Pankiewicz, J.; Wanat, A.; Anna, P.; Gołąbek, I.; Bartuś, S.; Malczewska-Malec, M.; Szczudlik, A. Determination of Nitrite/Nitrate in Human Biological Material by the Simple Griess Reaction. *Clinica Chimica Acta* **1998**, *274* (2), 177–188. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(98\)00060-6](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(98)00060-6).



- (200) Tian, Y.; Zhou, S.; Takeda, R.; Okazaki, K.; Sekita, M.; Sakamoto, K. Anti-Inflammatory Activities of Amber Extract in Lipopolysaccharide-Induced RAW 264.7 Macrophages. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2021**, *141*, 111854. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111854>.
- (201) Shen, Y.; Zhang, Q.; Qian, X.; Yang, Y. Practical Assay for Nitrite and Nitrosothiol as an Alternative to the Griess Assay or the 2,3-Diaminonaphthalene Assay. *Anal Chem* **2015**, *87* (2), 1274–1280. <https://doi.org/10.1021/ac5039779>.
- (202) Latini, A.; Scussiato, K.; Leipnitz, G.; Gibson, K. M.; Wajner, M. Evidence for Oxidative Stress in Tissues Derived from Succinate Semialdehyde Dehydrogenase-deficient Mice. *J Inherit Metab Dis* **2007**, *30* (5), 800–810. <https://doi.org/10.1007/s10545-007-0599-6>.
- (203) HRN, S.; MN, de M.; AC, K. Status of Hydrogen Peroxide Solution 10 V in Commercialized Samples. *Pharm Anal Acta* **2017**, *8* (10). <https://doi.org/10.4172/2153-2435.1000567>.
- (204) Hyland, K.; Auclair, C. The Formation of Superoxide Radical Anions by a Reaction between O<sub>2</sub>, OH<sup>-</sup> and Dimethyl Sulfoxide. *Biochem Biophys Res Commun* **1981**, *102* (1), 531–537. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(81\)91552-7](https://doi.org/10.1016/0006-291X(81)91552-7).
- (205) Majiene, D.; Kuseliauskyte, J.; Stimbirys, A.; Jekabsone, A. Comparison of the Effect of Native 1,4-Naphthoquinones Plumbagin, Menadione, and Lawsone on Viability, Redox Status, and Mitochondrial Functions of C6 Glioblastoma Cells. *Nutrients* **2019**, *11* (6), 1294. <https://doi.org/10.3390/nu11061294>.
- (206) Sidlauskas, K.; Sidlauskiene, R.; Li, N.; Liobikas, J. 5-Hydroxy-1,4-Naphthalenedione Exerts Anticancer Effects on Glioma Cells through Interaction with the Mitochondrial Electron Transport Chain. *Neurosci Lett* **2017**, *639*, 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.01.007>.
- (207) Brock, S. C.; Tonussi, C. R. Intrathecally Injected Morphine Inhibits Inflammatory Paw Edema: The Involvement of Nitric Oxide and Cyclic-Guanosine Monophosphate. *Anesth Analg* **2008**, *106* (3), 965–971. <https://doi.org/10.1213/ane.0b013e318162cebf>.
- (208) Tyagi, N.; Viji, M.; Ramaiah, D.  $\mu$ -Oxo-Bridged Iron(III) Complexes for the Selective Reduction of Aromatic Ketones Catalyzed through Base Promoted *in Situ* Nanoparticle Formation. *New Journal of Chemistry* **2022**, *46* (23), 11202–11211. <https://doi.org/10.1039/D2NJ01053D>.
- (209) Xue, J.; Hangun-Balkir, Y.; Mullaney, M.; Nadir, S.; Lewis, J. C.; Henry-Smith, C.; Jayaratna, N. B.; Kawshalya Kumarihami, C. A. U.; Norman, R. E. Syntheses and Structures of [Fe(TPA)<sub>2</sub>](ClO<sub>4</sub>) and [Fe(TPA)<sub>2</sub>Y<sub>2</sub>](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> Where TPA = Tris-(2-Pyridylmethyl)Amine, X = N<sub>3</sub>, or Br, and Y = N<sub>3</sub>, Br, NCO, or NCS. *J Chem Crystallogr* **2023**, *53* (1), 50–65. <https://doi.org/10.1007/s10870-022-00941-5>.
- (210) Geary, W. J. The Use of Conductivity Measurements in Organic Solvents for the Characterisation of Coordination Compounds. *Coord Chem Rev* **1971**, *7* (1), 81–122. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(00\)80009-0](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(00)80009-0).
- (211) Portes, J. A.; Souza, T. G.; dos Santos, T. A. T.; da Silva, L. L. R.; Ribeiro, T. P.; Pereira, M. D.; Horn, A.; Fernandes, C.; DaMatta, R. A.; de Souza, W.; Seabra, S. H. Reduction of Toxoplasma Gondii Development Due to Inhibition of Parasite Antioxidant Enzymes by a Dinuclear Iron(III) Compound. *Antimicrob Agents Chemother* **2015**, *59* (12), 7374–7386. <https://doi.org/10.1128/AAC.00057-15>.
- (212) Connolly, N. M. C.; Theurey, P.; Adam-Vizi, V.; Bazan, N. G.; Bernardi, P.; Bolaños, J. P.; Culmsee, C.; Dawson, V. L.; Deshmukh, M.; Duchen, M. R.; Düsselmann, H.; Fiskum, G.; Galindo, M. F.; Hardingham, G. E.; Hardwick, J. M.; Jekabsons, M. B.; Jonas, E. A.; Jordán, J.; Lipton, S. A.; Manfredi, G.; Mattson, M. P.; McLaughlin, B.; Methner, A.;

- Murphy, A. N.; Murphy, M. P.; Nicholls, D. G.; Polster, B. M.; Pozzan, T.; Rizzuto, R.; Satrustegui, J.; Slack, R. S.; Swanson, R. A.; Swerdlow, R. H.; Will, Y.; Ying, Z.; Joselin, A.; Gioran, A.; Moreira Pinho, C.; Watters, O.; Salvucci, M.; Llorente-Folch, I.; Park, D. S.; Bano, D.; Ankarcona, M.; Pizzo, P.; Prehn, J. H. M. Guidelines on Experimental Methods to Assess Mitochondrial Dysfunction in Cellular Models of Neurodegenerative Diseases. *Cell Death Differ* **2018**, *25* (3), 542–572. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0020-4>.
- (213) Abu-Elala, N. M.; Younis, N. A.; AbuBakr, H. O.; Ragaa, N. M.; Borges, L. L.; Bonato, M. A. Influence of Dietary Fermented *Saccharomyces Cerevisiae* on Growth Performance, Oxidative Stress Parameters, and Immune Response of Cultured *Oreochromis Niloticus*. *Fish Physiol Biochem* **2020**, *46* (2), 533–545. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00711-9>.
- (214) Alves, L. de F.; Bortolucci, J.; Reginatto, V.; Guazzaroni, M.-E.; Mussatto, S. I. Improving *Saccharomyces Cerevisiae* Acid and Oxidative Stress Resistance Using a Prokaryotic Gene Identified by Functional Metagenomics. *Heliyon* **2023**, *9* (4), e14838. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14838>.
- (215) Alves, L. de F.; Bortolucci, J.; Reginatto, V.; Guazzaroni, M.-E.; Mussatto, S. I. Improving *Saccharomyces Cerevisiae* Acid and Oxidative Stress Resistance Using a Prokaryotic Gene Identified by Functional Metagenomics. *Heliyon* **2023**, *9* (4), e14838. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14838>.
- (216) Kocafe-Özşen, N.; Yilmaz, B.; Alkim, C.; Arslan, M.; Topaloğlu, A.; Kısakesen, H. İbrahim; Gülsev, E.; Çakar, Z. P. Physiological and Molecular Characterization of an Oxidative Stress-Resistant *Saccharomyces Cerevisiae* Strain Obtained by Evolutionary Engineering. *Front Microbiol* **2022**, *13*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.822864>.
- (217) Meftah, S.; Sajadimajd, S.; Yazdanparast, R. Structure-Activity Relationship of 15 Different Mn-Salen Derivatives against Free Radicals. *Drug Chem Toxicol* **2013**, *36* (1), 9–18. <https://doi.org/10.3109/01480545.2011.644560>.
- (218) Li, M.; Yan, Y.-X.; Yu, Q.-T.; Deng, Y.; Wu, D.-T.; Wang, Y.; Ge, Y.-Z.; Li, S.-P.; Zhao, J. Comparison of Immunomodulatory Effects of Fresh Garlic and Black Garlic Polysaccharides on RAW 264.7 Macrophages. *J Food Sci* **2017**, *82* (3), 765–771. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13589>.
- (219) O'Young, C.-L.; Lippard, S. J. Reactions of Superoxide Anion with Copper(II) Salicylate Complexes. *J Am Chem Soc* **1980**, *102* (15), 4920–4924. <https://doi.org/10.1021/ja00535a015>.
- (220) Czaikowski, M. E.; McNeece, A. J.; Boyn, J.-N.; Jesse, K. A.; Anferov, S. W.; Filatov, A. S.; Mazziotti, D. A.; Anderson, J. S. Generation and Aerobic Oxidative Catalysis of a Cu(II) Superoxo Complex Supported by a Redox-Active Ligand. *J Am Chem Soc* **2022**, *144* (34), 15569–15580. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c04630>.
- (221) Abe, T.; Hori, Y.; Shiota, Y.; Ohta, T.; Morimoto, Y.; Sugimoto, H.; Ogura, T.; Yoshizawa, K.; Itoh, S. Cupric-Superoxide Complex That Induces a Catalytic Aldol Reaction-Type C–C Bond Formation. *Commun Chem* **2019**, *2* (1), 12. <https://doi.org/10.1038/s42004-019-0115-6>.
- (222) Quek, S. Y.; Debnath, S.; Laxmi, S.; van Gastel, M.; Krämer, T.; England, J. Sterically Stabilized End-On Superoxocopper(II) Complexes and Mechanistic Insights into Their Reactivity with O–H, N–H, and C–H Substrates. *J Am Chem Soc* **2021**, *143* (47), 19731–19747. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c07837>.
- (223) Park, Y. J.; Jodts, R. J.; Slater, J. W.; Reyes, R. M.; Winton, V. J.; Montaser, R. A.; Thomas, P. M.; Dowdle, W. B.; Ruiz, A.; Kelleher, N. L.; Bollinger, J. M.; Krebs, C.; Hoffman, B. M.; Rosenzweig, A. C. A Mixed-Valent Fe(II)Fe(III) Species Converts Cysteine to an

- Oxazolone/Thioamide Pair in Methanobactin Biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2022**, *119* (13). <https://doi.org/10.1073/pnas.2123566119>.
- (224) Beck, J. L.; De Jersey, John.; Zerner, Burt.; Hendrich, M. P.; Debrunner, P. G. Properties of the Fe(II)-Fe(III) Derivative of Red Kidney Bean Purple Phosphatase. Evidence for a Binuclear Zinc-Iron Center in the Native Enzyme. *J Am Chem Soc* **1988**, *110* (10), 3317–3318. <https://doi.org/10.1021/ja00218a061>.
- (225) Poznyak, S. K.; Talapin, D. V.; Shevchenko, E. V.; Weller, H. Quantum Dot Chemiluminescence. *Nano Lett* **2004**, *4* (4), 693–698. <https://doi.org/10.1021/nl049713w>.
- (226) Souders, C. L.; Liang, X.; Wang, X.; Ector, N.; Zhao, Y. H.; Martyniuk, C. J. High-Throughput Assessment of Oxidative Respiration in Fish Embryos: Advancing Adverse Outcome Pathways for Mitochondrial Dysfunction. *Aquatic Toxicology* **2018**, *199*, 162–173. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.03.031>.
- (227) Souders, C. L.; Liang, X.; Wang, X.; Ector, N.; Zhao, Y. H.; Martyniuk, C. J. High-Throughput Assessment of Oxidative Respiration in Fish Embryos: Advancing Adverse Outcome Pathways for Mitochondrial Dysfunction. *Aquatic Toxicology* **2018**, *199*, 162–173. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.03.031>.

## 8. APÊNDICES

**Tabela 5.** Tabela de caracterização dos pré-ligantes hpcInol e salen

Ligante	$\delta$ (ppm); m	Atribuição
hpcInol	8,44 – 8,30 m	1
	7,77 – 7,66; m	3
	7,65; t	2
	7,46; d	2
	7,41; dd	4
	7,18; dt	4
	3,85; q	6, 8
	3,75; m	6
	3,51; dd	7
	3,39; dd	7
	2,69; dd	9
2,60; dd	9	
salen	8,38; s	7, 12
	7,35 - 7,21; m	2, 6, 16, 18
	6,96; d	3, 15
	6,87; t	1, 17
	3,96; s	9, 10

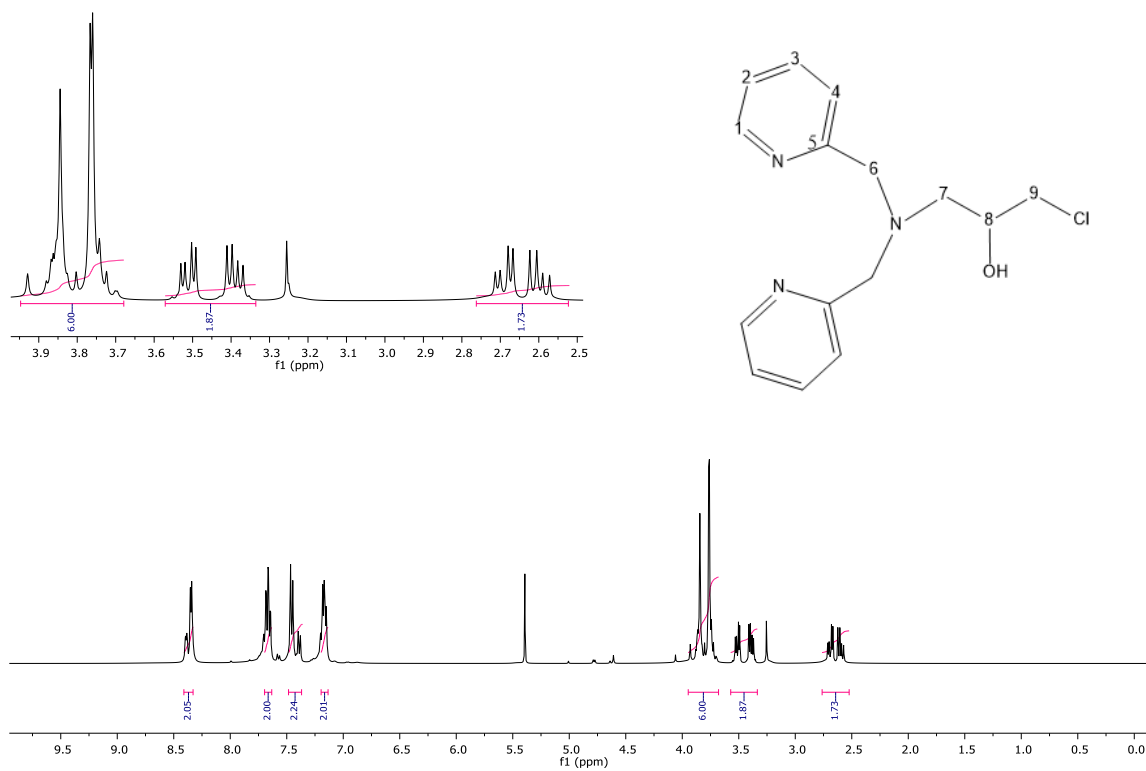


Figura 1A. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do hpcinol registrado em  $\text{CD}_3\text{Cl}$

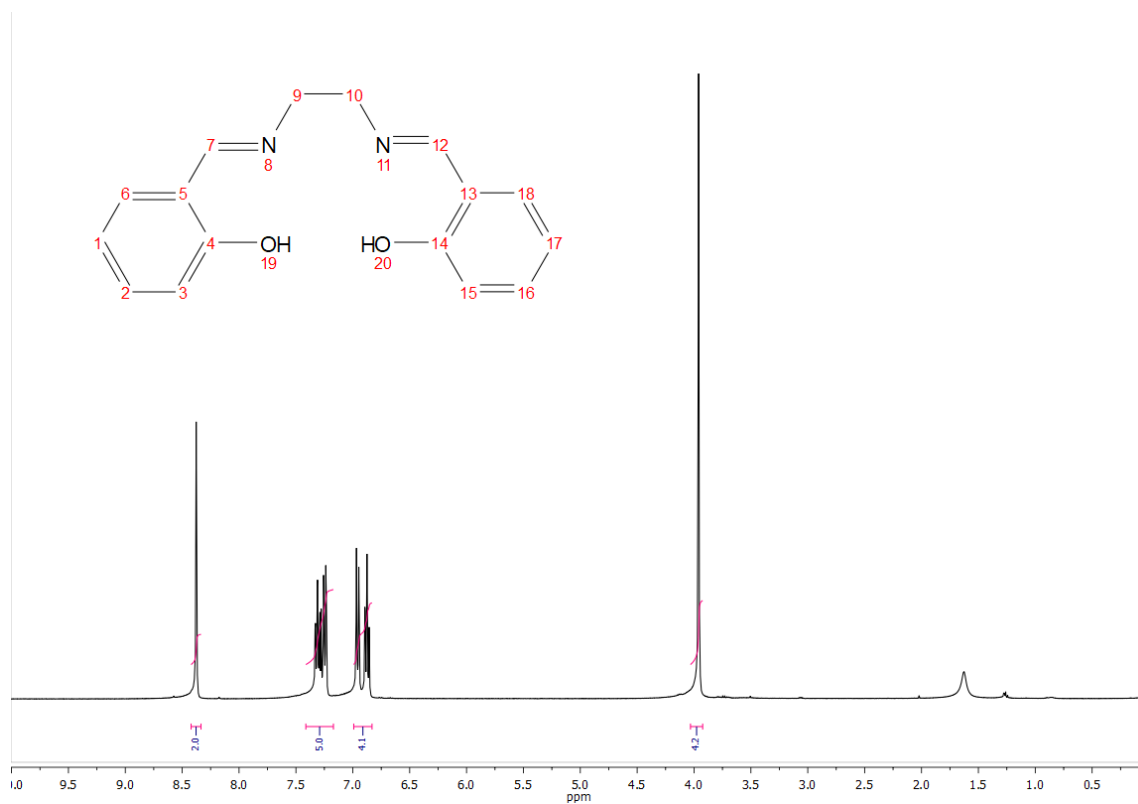
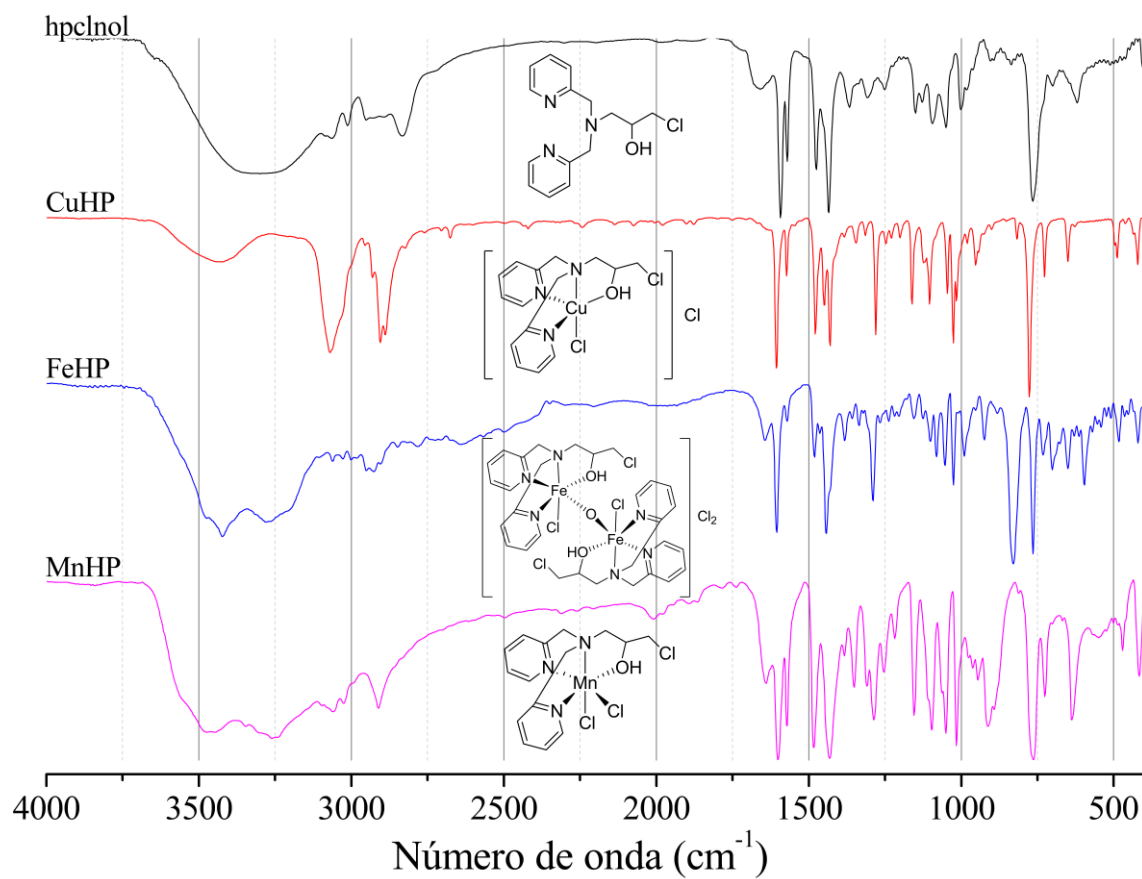
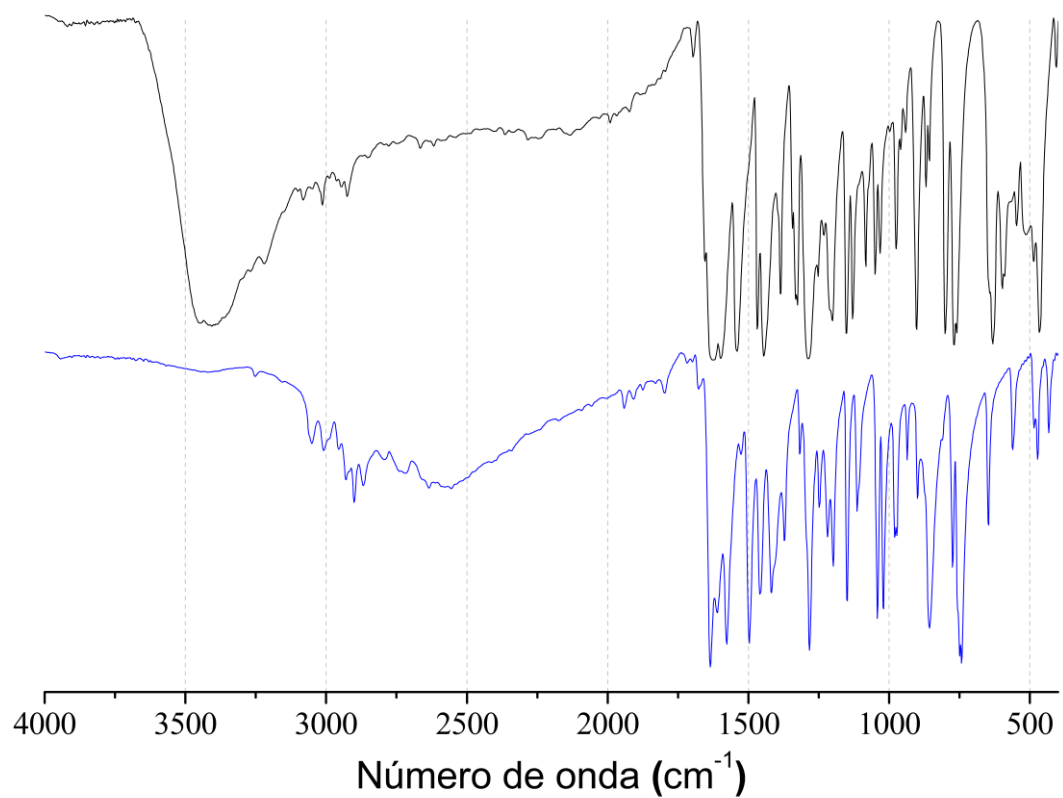


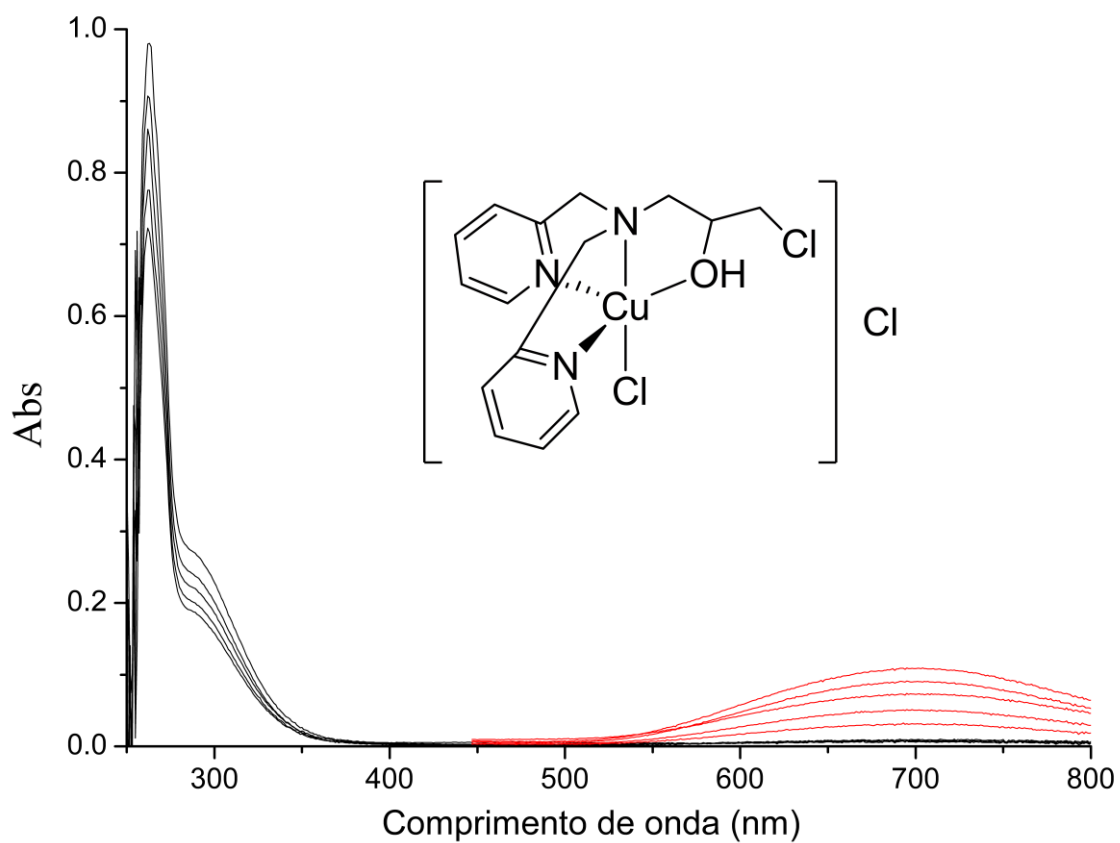
Figura 2A. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do salen registrado em  $\text{CD}_3\text{CL}$



**Figura 3A.** Sobreposição dos espectros de infravermelho do hpcInol e seus respectivos compostos de  $\text{Cu}^{\text{II}}$ ,  $\text{Fe}^{\text{III}}$  e  $\text{Mn}^{\text{II}}$ . O espectro do ligante e dos compostos de coordenação foram obtidos em filme e pastilha de KBr, respectivamente.

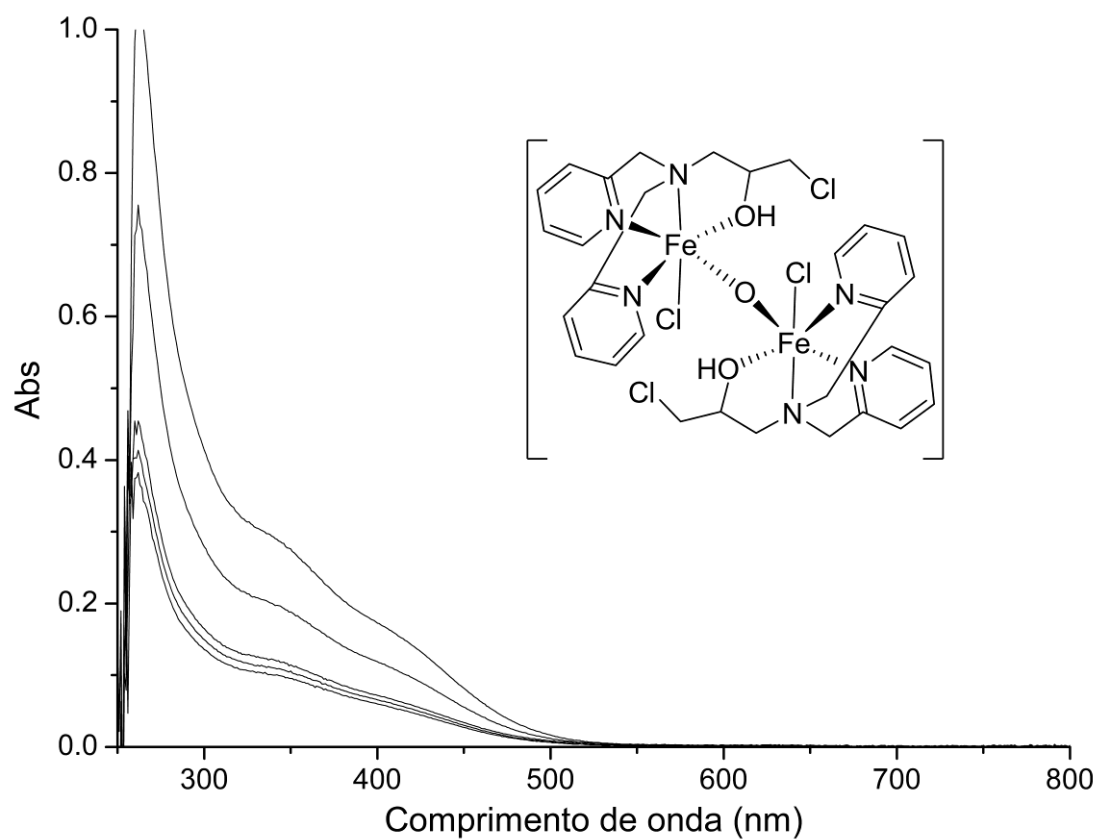


**Figura 4A.** Sobreposição dos espectros de infravermelho do ligante salen (preto) e do composto de manganês (III) EUK-8 (azul).

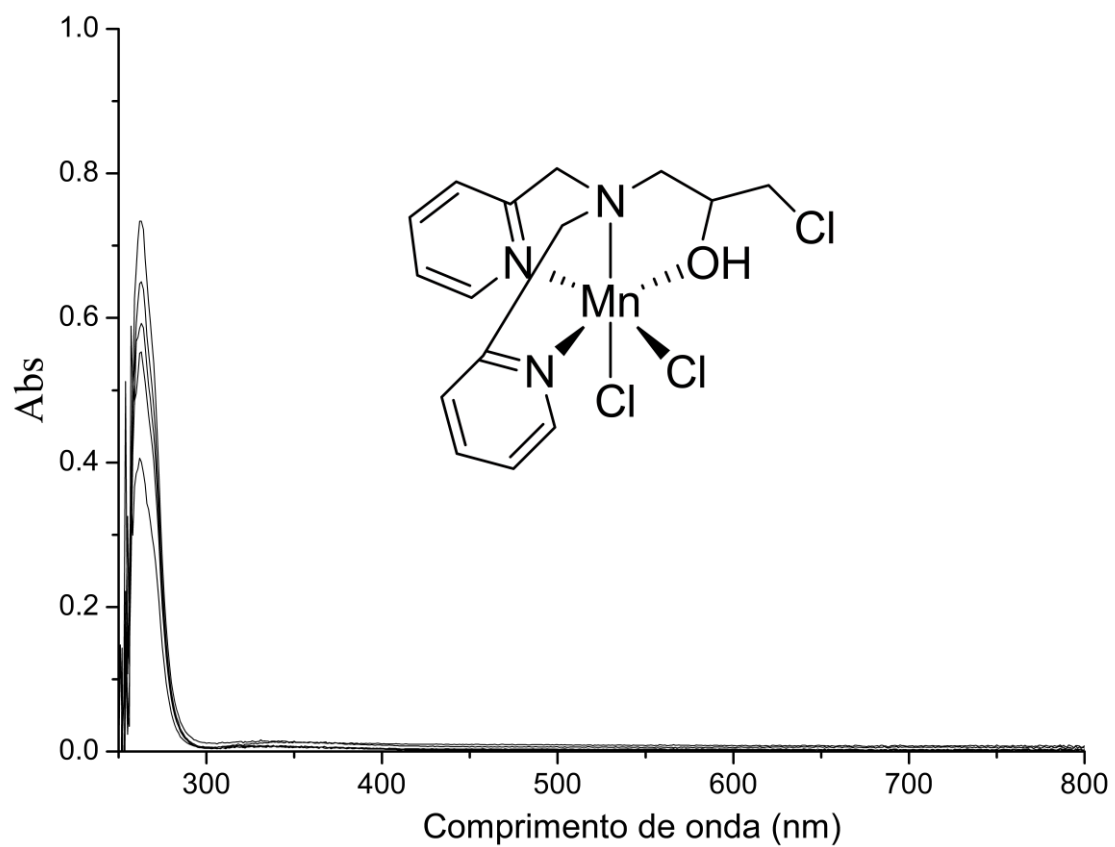


**Figura 5A.** Sobreposição dos espectros eletrônicos do composto CuHP em diferentes concentrações para o cálculo de coeficiente de absorção molar, registrados em DMSO. Os espectros em preto foram registrados em concentrações micromolares e os espectros em vermelho foram registrados em concentração milimolares.

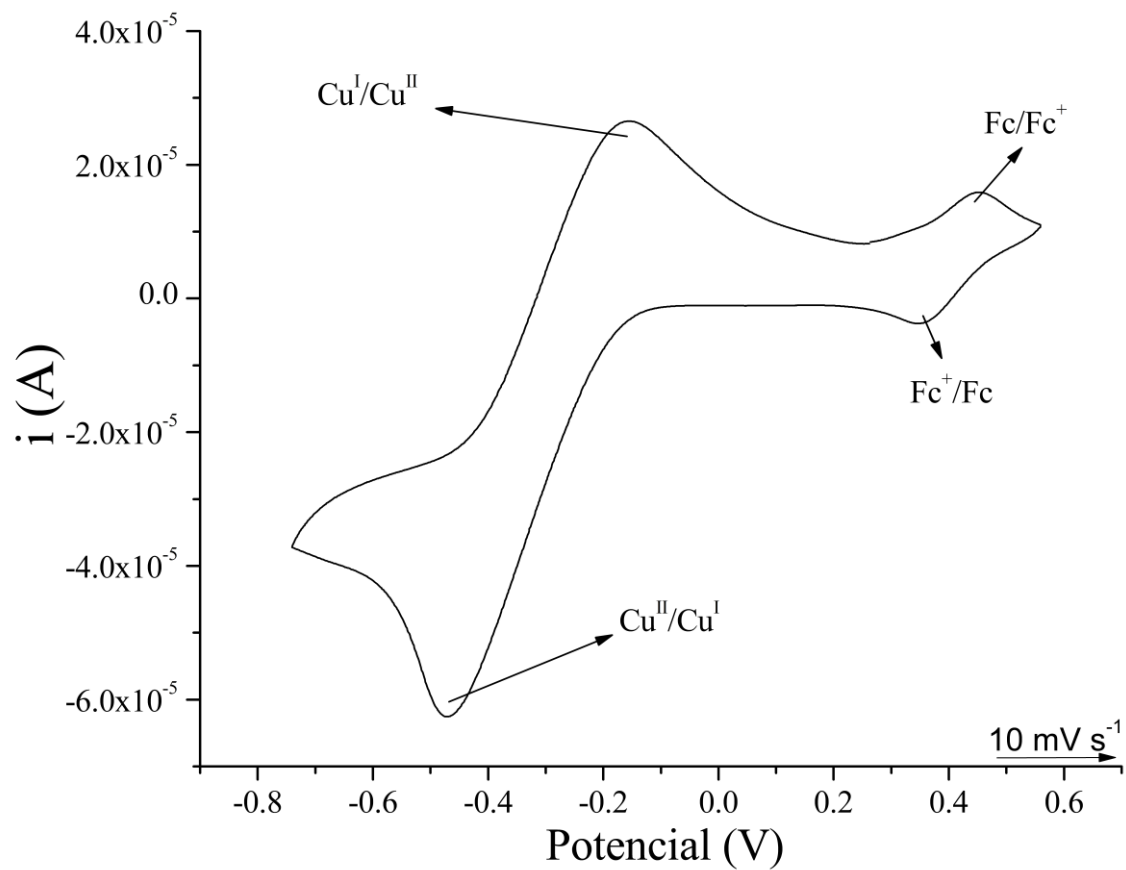




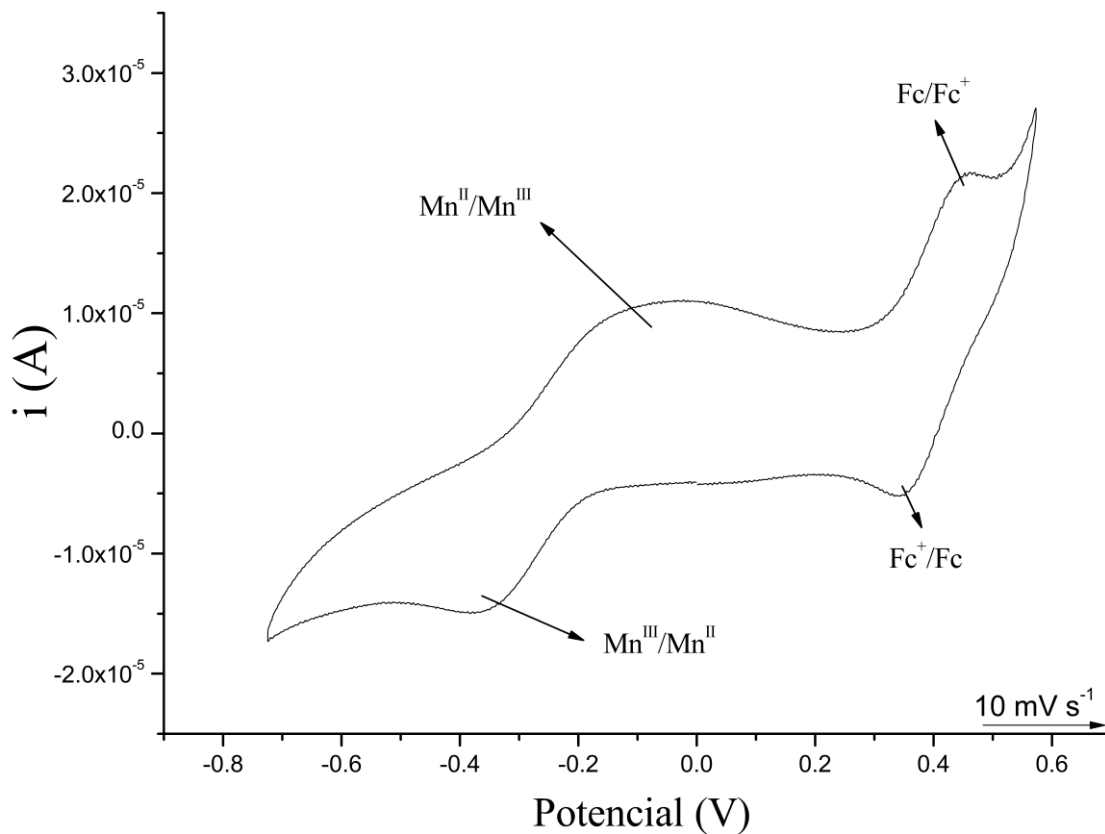
**Figura 6A** Sobreposição dos espectros eletrônicos do FeHP em diferentes concentrações, registrado em DMSO.



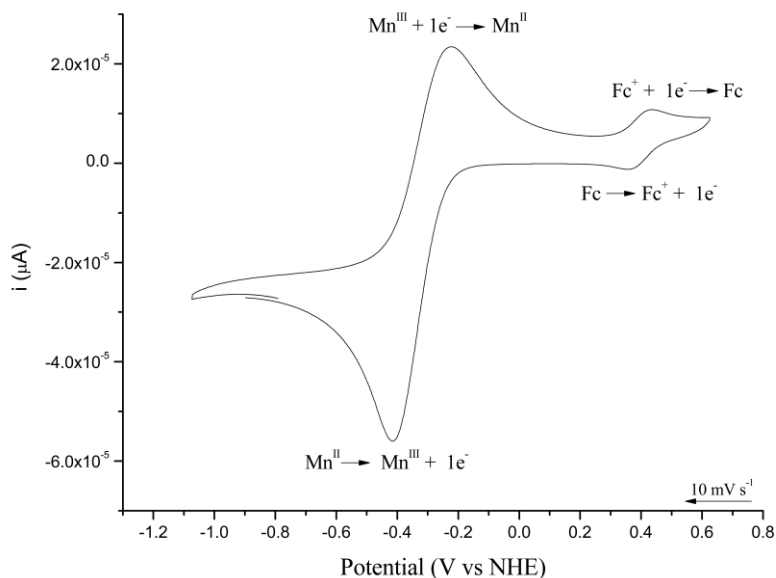
**Figura 7A.** Sobreposição dos espectros eletrônicos do MnHP em diferentes concentrações, registados em DMSO.



**Figura 8A.** Voltamograma cíclico do composto CuHP registrado em DMSO seco no sentido catódico e com velocidade  $10 \text{ mV s}^{-1}$ . Foi empregado um sistema de três eletrodos de platina conforme descrito em Materiais e Métodos.



**Figura 9A.** Voltamograma cíclico do composto MnHP registrado em DMSO seco no sentido anódico e com velocidade  $10 \text{ mV s}^{-1}$ . Foi empregado um sistema de três eletrodos de platina conforme descrito em Materiais e Métodos.



**Figura 10A.** Voltamograma cíclico do composto EUK-8 registrado em DMSO seco no sentido anódico e com velocidade  $10 \text{ mV s}^{-1}$ . Foi empregado um sistema de três eletrodos de platina conforme descrito em Materiais e Métodos.