

U. PORTO



**FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO**

**AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE CAPTADORA DE
ESPÉCIES REACTIVAS DE OXIGÉNIO E DE AZOTO
POR ANTAGONISTAS β -ADRENÉRGICOS**

Mestrado em Controlo de Qualidade

Ana Maria Carvalhais Mendes Gomes

Março de 2005

U. PORTO



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

**AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE CAPTADORA DE
ESPÉCIES REACTIVAS DE OXIGÉNIO E DE AZOTO
POR ANTAGONISTAS β -ADRENÉRGICOS**

Ana Maria Carvalhais Mendes Gomes

Orientadora:

Professora Doutora Eduarda das Graças Rodrigues Fernandes

Co-orientador:

Professor Doutor José Luís Fontes da Costa Lima

Março de 2005

Dissertação apresentada à Faculdade
de Farmácia da Universidade do Porto
para a obtenção do grau de Mestre em
Controlo de Qualidade.

PUBLICAÇÕES E COMUNICAÇÕES

Da realização deste trabalho resultaram os seguintes artigos originais e comunicações apresentadas em congressos:

Publicações

- Eduarda Fernandes, **Ana Gomes**, David Costa and José L. F. C. Lima (2005) Pindolol is a potent scavenger of reactive nitrogen species. *Life Sciences* (aceite para publicação).
- **Ana Gomes**, Eduarda Fernandes and José L. F. C. Lima (2005) Fluorescence probes used for detection of nitric oxide and peroxynitrite (submetido para publicação).

Comunicações

- **Ana Gomes**, David Costa, Salette Reis, Eduarda Fernandes e José L. F. C. “Implementação de uma metodologia fluorimétrica em leitor de microplacas para a avaliação da actividade sequestrantes de peroxinitrito”, ANALITICA'03, 3º Encontro Nacional de Química Analítica, Porto, 18 a 19 de Novembro, 2003 (comunicação em painel).
- **Ana Gomes**, Eduarda Fernandes and José L. F. C. Lima, “Implementation of two microanalysis methods for the detection of reactive nitrogen species, 3º Encontro Requimte, Fátima, 9 e 10 de Janeiro de 2004 (comunicação em painel).
- **Ana Gomes**, David Costa, José L.F.C. Lima and Eduarda Fernandes, “Pindolol is a potent scavenger of reactive nitrogen species. A possible relevant contribution for the reduction of SSRI antidepressant latency”,

2nd Spanish and Portuguese Congress on Free Radicals, Leioa-Bizkaia
November 25-27, 2004 (comunicação em painel).

AGRADECIMENTOS

- À Professora Doutora Eduarda Fernandes, minha orientadora, pelo rigor e empenho com que conduziu este trabalho e pela disponibilidade, apoio e incentivo permanentes.
- Ao Professor Doutor José Luís Fontes da Costa Lima pela co-orientação deste trabalho e pelo interesse com que sempre o acompanhou.
- Ao Professor Doutor Félix Carvalho, coordenador do Mestrado em Controlo de Qualidade, pela sua disponibilidade durante o período em que decorreu este Mestrado.
- Ao Laboratório de Química-Física da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, na pessoa do Professor Doutor José Luís Fontes da Costa Lima, pelo acolhimento e pelas condições disponibilizadas para a concretização deste trabalho.
- Ao David Costa pelo apoio incansável e indispensável ao longo da parte experimental deste trabalho, bem como pela simpatia, boa disposição e amizade sempre demonstradas.
- Aos restantes colegas do laboratório de Química-Física pela simpatia com que me acolheram e pelo bom ambiente que proporcionam, permitindo a quem chega de novo uma fácil adaptação.

ABREVIATURAS

- AAPH - Dicloridrato de 2,2'-azobis-2-amidinopropano;
- ADN – Ácido desoxirribonucleico;
- AUC – Área sob a curva;
- BH₄ – Tetra-hidrobiopterina;
- CMLV - Células do músculo liso vascular;
- CO₃⁻ - Anião radical carbonato;
- DAF-2 – 4,5-Diaminofluoresceína;
- DAF-2T – Triazolofluoresceína;
- DHR – Di-hidrorodamina 123;
- DMSO – Dimetilsulfóxido;
- ERA - Espécies reactivas de azoto;
- ERO – Espécies reactivas de oxigénio;
- GSH – Glutationa reduzida;
- GSH px – Glutationa peroxidase;
- GSSG – Glutationa oxidada;
- H[•] –Radical hidrogénio;
- H₂O₂ – Peróxido de hidrogénio;
- HOCl – Ácido hipocloroso;
- 5-HT – 5-Hidroxitriptamina;
- HX – Hipoxantina;
- IC₅₀ – Concentração necessária para ocorrer uma inibição de 50%;
- ISRS – Inibidores selectivos da recaptção da serotonina;
- LDL – Lipoproteína de baixa densidade;
- min – Minutos;
- MPO – Mieloperoxidase;
- NADPH – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reduzida);
- NAD⁺ - Nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada);
- ·NO – Óxido nítrico;
- NOC 5 - 3-(2-Hidroxi-1-(1-metiletil)-2-nitroso-hidrazino)-1-propanamina;
- ONOO⁻ - Anião peroxinitrito;

- ONOOCO_2^- - Anião nitrosoperoxicarbonato;
- $\text{O}_2^{\cdot -}$ - Anião radical superóxido;
- $\cdot\text{OH}$ – Radical hidroxilo;
- ONS – Óxido nítrico sintetases;
- cONS – Óxido nítrico sintetases constitutivas;
- iONS - Óxido nítrico sintetases indutíveis;
- ORAC - Capacidade de absorção de radicais de oxigénio;
- $\text{R}\cdot$ – Radical alquilo;
- RH - Rodamina 123;
- $\text{RO}\cdot$ – Radical alcoilo;
- $\text{ROO}\cdot$ – Radical peroxilo;
- SNC – Sistema nervoso central;
- SNP – Sistema nervoso periférico;
- SOD – Superóxido dismutase;
- Trx px – Tiorredoxina peroxidase;
- Trx-(SH)_2 – Tiorredoxina;
- XO – Xantina oxidase.

RESUMO

Nos trabalhos experimentais realizados no âmbito da presente dissertação de mestrado, foram implementadas metodologias com detecção fluorimétrica e quimiluminimétrica, em leitor de microplacas, destinadas a estudos de avaliação da capacidade de captação de espécies reactivas de oxigénio (ERO) e de azoto (ERA). Estas metodologias foram utilizadas para avaliar a capacidade captadora de ERO e ERA de antagonistas β -adrenérgicos, compostos utilizados na terapêutica essencialmente para o tratamento da hipertensão arterial, bem como de outras doenças cardiovasculares como a angina de peito e arritmias cardíacas.

Alguns dos processos patofisiológicos que se desencadeiam nas doenças cardiovasculares têm vindo a ser relacionados com as ERO e ERA. Por outro lado, certos efeitos terapêuticos dos antagonistas β -adrenérgicos têm sido associados às propriedades antioxidantes que alguns compostos pertencentes a este grupo terapêutico já apresentaram. Considerou-se assim relevante proceder à avaliação da capacidade captadora de ERO e ERA de antagonistas β -adrenérgicos utilizados na terapêutica, nomeadamente o atenolol, o carvedilol, o labetalol, o metoprolol, o pindolol, o propranolol, o sotalol e o timolol.

As ERO e ERA sobre as quais se avaliou o efeito captador dos antagonistas β -adrenérgicos foram: o anião radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o radical hidroxilo ($\cdot OH$), o ácido hipocloroso ($HOCl$), o radical peroxilo ($ROO\cdot$), o anião peroxinitrito ($ONOO^-$) e o óxido nítrico ($\cdot NO$).

A avaliação da capacidade de captação do $O_2^{\cdot-}$, gerado pelo sistema HX/xantina oxidase (XO), foi realizada através de uma metodologia com detecção quimiluminimétrica, monitorizando-se a oxidação da lucigenina pelo $O_2^{\cdot-}$. Nenhum dos antagonistas β -adrenérgicos estudados apresentou efeito captador desta espécie reactiva.

O efeito captador de H_2O_2 foi igualmente avaliado por uma metodologia com detecção quimiluminimétrica, monitorizando-se a oxidação da lucigenina pelo H_2O_2 . O labetalol e o timolol foram os únicos antagonistas β -adrenérgicos

que apresentaram efeito captador, tendo-se obtido um valor de IC₅₀ menor para o timolol.

O ·OH foi gerado pelo sistema FeCl₂/EDTA/H₂O₂ e a avaliação da capacidade de captação desta espécie reactiva foi efectuada por monitorização da oxidação do luminol, através de uma metodologia com detecção quimiluminimétrica. Todos os antagonistas β-adrenérgicos, excepto o carvedilol, que não foi testado por esta metodologia, apresentaram efeito captador de ·OH dependente da concentração. O labetalol foi o composto que apresentou o IC₅₀ menor.

A avaliação da capacidade de captação de HOCl, gerado a partir da acidificação de uma solução de NaOCl a 1%, foi igualmente efectuada por monitorização da oxidação do luminol, através de uma metodologia com detecção quimiluminimétrica. Todos os antagonistas β-adrenérgicos apresentaram efeito captador de HOCl, de uma forma dependente da concentração. O propranolol e o metoprolol mostraram-se os compostos mais eficazes na captação desta espécie reactiva, enquanto que o carvedilol foi o composto que apresentou o IC₅₀ maior.

O ROO· foi gerado por termodecomposição do dicloridrato de 2,2'-azobis-2-amidinopropano (AAPH). A avaliação da captação desta espécie reactiva foi realizada por monitorização da oxidação da fluoresceína, através uma metodologia com detecção fluorimétrica designada ensaio ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigénio). O pindolol e o propranolol apresentaram efeito captador de ROO·. Os restantes antagonistas β-adrenérgicos estudados não apresentaram o referido efeito.

A capacidade de captação do ONOO⁻ foi avaliada por monitorização da oxidação da di-hidrodamina 123 (DHR) a rodamina 123 (RH) pelo ONOO⁻, por uma metodologia com detecção fluorimétrica. Esta avaliação foi efectuada na ausência e na presença de NaHCO₃ (25 mM). O ONOO⁻ foi sintetizado por injeção simultânea de uma solução de NaNO₂ (0,66 M) e uma solução acidificada de H₂O₂ (0,6 M em HCl 0,7 M) e recolhido num recipiente que continha NaOH 3 M. Na ausência de NaHCO₃, o atenolol, o carvedilol, o metoprolol, o pindolol, o propranolol e o sotalol apresentaram efeito captador de ONOO⁻, destacando-se o sotalol que apresentou o menor IC₅₀. Na presença de NaHCO₃, os mesmos compostos apresentaram igualmente efeito captador

de ONOO^- , tendo-se observado um efeito mais elevado, excepto para o atenolol. O carvedilol, o pindolol e o propranolol apresentaram valores de IC_{50} consideravelmente menores quando testados na presença do NaHCO_3 . O labetalol e o timolol apresentaram interferências com a metodologia.

O $\cdot\text{NO}$ foi gerado a partir do 3-(2-hidroxi-1-(1-metiletil)-2-nitroso-hidrazino)-1-propanamina (NOC-5). A avaliação da capacidade de captação deste radical foi efectuada por monitorização oxidação da DAF-2 (4,5-diaminofluoresceína) a DAF-2T (triazolofluoresceína) pelo $\cdot\text{NO}$, na presença do O_2 , através de uma metodologia com detecção fluorimétrica. O atenolol, o carvedilol, o pindolol e o propranolol apresentaram efeito captador de $\cdot\text{NO}$. O pindolol foi o composto que apresentou o menor IC_{50} . O metoprolol não apresentou efeito captador de $\cdot\text{NO}$ até à concentração de $5000 \mu\text{M}$. O labetalol, o timolol e o sotalol apresentaram interferências com a metodologia.

Em conclusão, no presente estudo, o pindolol e o propranolol mostraram-se captadores de todas as ERO e ERA, excepto de $\text{O}_2^{\cdot-}$, para o qual nenhum dos antagonistas β -adrenérgicos mostrou efeito captador. Dos compostos em estudo, o pindolol mostrou ser o composto com maior actividade captadora de ERA, destacando-se o seu forte efeito captador de ONOO^- . No que diz respeito aos restantes compostos, não se verificou um comportamento homogéneo, variando a actividade captadora de cada um com a espécie reactiva em questão.

ABSTRACT

In this work, fluorescence and chemiluminescence methodologies were adapted to a microplate reader, and applied in the evaluation of the scavenging activity for reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) by β -adrenergic antagonists. β -Adrenergic antagonists comprise a group of drugs that are mostly used to treat cardiovascular disorders such as hypertension, ischemic heart disease or cardiac arrhythmia.

Today, there are evidences that ROS and RNS play an important role in the pathology of cardiovascular diseases. On the other hand, the antioxidant properties shown by some of the β -adrenergic antagonists have already been related to their therapeutic effects. Thus, it seemed relevant to evaluate the scavenging activity for reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) by β -adrenergic antagonists, namely atenolol, carvedilol, labetalol, metoprolol, pindolol, propranolol, sotalol and timolol.

We evaluated the β -adrenergic antagonists's scavenging activity for the following ROS and RNS: superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\cdot OH$), hypochlorous acid ($HOCl$), peroxy radical ($ROO\cdot$), peroxynitrite anion ($ONOO^-$) and nitric oxide ($\cdot NO$).

Superoxide radicals were generated by the hypoxanthine/xanthine oxidase system and the $O_2^{\cdot-}$ scavenging activity was measured using a chemiluminescence methodology, by monitoring the $O_2^{\cdot-}$ -induced oxidation of lucigenin. No scavenging activity against $O_2^{\cdot-}$ was observed for any of the studied β -adrenergic antagonists.

Hydrogen peroxide scavenging activity was also measured using a chemiluminescence methodology, by monitoring the H_2O_2 -induced oxidation of lucigenin. Labetalol and timolol were able to scavenge H_2O_2 , being timolol the most effective one. No H_2O_2 scavenging activity was observed for the other β -adrenergic antagonists.

Hydroxyl radicals were generated by a Fenton system ($FeCl_2/EDTA/H_2O_2$) and the $\cdot OH$ scavenging activity was measured by monitoring the $\cdot OH$ -induced oxidation of luminol, using a chemiluminescence methodology. All the compounds were able to scavenge $\cdot OH$ in a concentration-dependent manner,

except carvedilol, which was not tested by the present methodology. Labetalol was the most effective of the assayed compounds, showing the lowest IC₅₀.

Hypochlorous acid was prepared by acidification of a 1% NaOCl solution. The HOCl scavenging activity was measured by monitoring the HOCl-induced oxidation of luminol, using a chemiluminescence methodology. All the assayed compounds were able to scavenge HOCl in a concentration-dependent manner. Propranolol and metoprolol were the most active compounds, while carvedilol was the less active.

Peroxy radicals were generated by 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) thermodecomposition. ROO[·] scavenging activity was measured by monitoring the ROO[·]-induced oxidation of fluorescein using a fluorescence methodology called ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) assay. Pindolol and propranolol were able to scavenge ROO[·] while no activity was observed for the other β-adrenergic antagonists.

The ONOO⁻ scavenging activity was measured by monitoring ONOO⁻ - induced oxidation of dihydrorhodamine 123 (DHR) to rhodamine 123 (RH), using a fluorescence methodology. The assays were performed in the absence and in the presence of NaHCO₃ (25 mM). ONOO⁻ was generated by simultaneous injection of a NaNO₂ (0.66 M) solution and a H₂O₂ acidified solution (0.6 M in 0.7 M HCl) into an ice-cooled recipient containing NaOH 3M. In the absence of NaHCO₃, atenolol, carvedilol, metoprolol, pindolol, propranolol and sotalol were able to scavenge ONOO⁻, being sotalol the most active compound, with the smallest IC₅₀. In the presence of NaHCO₃, the referred compounds showed a higher ONOO⁻ scavenging activity, except atenolol, which was less active under these circumstances. The IC_{50s} of carvedilol, pindolol and propranolol were much lower in the presence of NaHCO₃ than in its absence. Labetalol and timolol interfered with the present methodology.

Nitric oxide was released by 3-[2-hydroxy-1-(1-methylethyl)-2-nitrosohydrazino]-1-propanamine (NOC-5). The ·NO scavenging activity was measured using a fluorescence methodology, by monitoring ·NO-induced oxidation of 4,5-diaminofluorescein (DAF-2) to the triazolofluorescein (DAF-2T), in the presence of O₂. Atenolol, carvedilol, pindolol and propranolol were able to scavenge ·NO. Pindolol showed to be the most active compound. Metoprolol

showed no effect at concentrations up to 5000 μM . Labetalol, timolol and sotalol interfered with the present methodology.

In conclusion, in the present study, pindolol and propranolol were able to scavenge all of the ROS and RNS, except $\text{O}_2^{\cdot-}$. Indeed, none of the studied β -adrenergic antagonists could scavenge $\text{O}_2^{\cdot-}$. Pindolol showed to be the most effective compound in scavenging ERA. It is noteworthy the potent ONOO^- scavenging effect demonstrated for pindolol. With regard to the other compounds, no homogeneity was found in their scavenging behaviour, depending each one's activity on the reactive species in question.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL.....	4
Considerações gerais.....	5
Objectivos do trabalho e estrutura da dissertação	8
1 INTRODUÇÃO	9
1.1 Espécies reactivas de oxigénio e de azoto presentes no sistema cardiovascular.....	10
1.1.1 Anião radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	10
1.1.2 Peróxido de hidrogénio (H_2O_2)	13
1.1.3 Radical hidroxilo ($\cdot OH$).....	14
1.1.4 Radical peroxilo ($ROO\cdot$) e radical alcoxilo ($RO\cdot$).....	15
1.1.5 Ácido hipocloroso ($HOCl$)	17
1.1.6 Óxido nítrico ($\cdot NO$).....	18
1.1.7 Anião peroxinitrito ($ONOO^-$).....	20
1.2 Funções patofisiológicas das espécies reactivas de oxigénio e de azoto no sistema cardiovascular.....	24
1.2.1 Hipertensão arterial	24
1.2.2 Outras patologias vasculares	27
1.3 Antagonistas β -adrenérgicos	30
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
2.1 Reagentes	36
2.2 Material.....	36
2.3 Avaliação da capacidade de captação do anião radical superóxido.	36
2.3.1 Geração do anião radical superóxido	36
2.3.2 Fundamento do método	37
2.3.3 Ensaio	38
2.4 Avaliação da capacidade de captação do peróxido de hidrogénio.....	40
2.4.1 Preparação da solução de peróxido de hidrogénio	40

2.4.2	Fundamento do método	40
2.4.3	Ensaio	40
2.5	Avaliação da capacidade de captação do radical hidroxilo	41
2.5.1	Geração do radical hidroxilo	41
2.5.2	Fundamento do método	42
2.5.3	Ensaio	43
2.6	Avaliação da capacidade de captação do ácido hipocloroso.....	44
2.6.1	Obtenção do ácido hipocloroso	44
2.6.2	Fundamento do método	44
2.6.3	Ensaio	44
2.7	Avaliação da capacidade de captação do radical peróxido	45
2.7.1	Geração do radical peróxido	45
2.7.2	Fundamento do método	46
2.7.3	Ensaio	47
2.8	Avaliação da capacidade de captação do anião peroxinitrito	48
2.8.1	Síntese do anião peroxinitrito	48
2.8.2	Fundamento do método	48
2.8.3	Ensaio	51
2.9	Avaliação da capacidade de captação do óxido nítrico	53
2.9.1	Geração do óxido nítrico	53
2.9.2	Fundamento do método	53
2.9.3	Ensaio	56
3	RESULTADOS	59
3.1	Captação do anião radical superóxido	60
3.2	Captação do peróxido de hidrogénio	60
3.3	Captação do radical hidroxilo	61
3.4	Captação do ácido hipocloroso	63
3.5	Captação do radical peróxido	65
3.6	Captação do anião peroxinitrito	67
3.7	Captação do óxido nítrico	71
4	DISCUSSÃO	74

5 CONCLUSÕES84

6 BIBLIOGRAFIA.....88

INTRODUÇÃO GERAL

Considerações gerais

As espécies reactivas de oxigénio (ERO) são, como o próprio nome indica, derivados do oxigénio molecular com actividade redox, apresentando maior reactividade do que este (Cheesman e Slater, 1993; Pardini, 1995). O termo ERO engloba não só radicais, tais como o anião radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroperoxilo (HO_2^{\cdot}), o radical hidroxilo ($\cdot OH$), o radical peroxilo (ROO^{\cdot}) e o radical alcóxido (RO^{\cdot}), mas também espécies não radicalares, nomeadamente o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o oxigénio singuleto (1O_2), e o ácido hipocloroso ($HOCl$) (Cheesman e Slater, 1993; Aruoma, 1994; Jaeschke, 1995). De referir que os radicais são espécies que possuem um ou mais electrões desemparelhados e que são capazes de existir de forma independente (Aruoma, 1994). Embora o oxigénio molecular possa ser considerado um di-radical pois, no seu estado fundamental, tem dois electrões desemparelhados com “spins” paralelos (o que o torna um duplo radical paramagnético), a forte ligação O-O presente na molécula associada aos “spins” paralelos torna o O_2 bem menos activo como agente oxidante do que seria de esperar (Cheesman e Slater, 1993; Murrant e Reid, 2001).

As espécies reactivas de azoto (ERA) são derivados do óxido nítrico ($\cdot NO$) com actividade redox. O termo ERA engloba não só radicais, tais como o $\cdot NO$ e o dióxido de azoto ($\cdot NO_2$) mas também espécies não radicalares nomeadamente o anião peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), o ião nitrónio (NO_2^+), o ácido peroxinitroso ($ONOOH$) e o trióxido de diazoto (N_2O_3) (Fink, 2002; Devasagayam *et al.*, 2004).

No sistema cardiovascular, as ERO e ERA desempenham um papel fisiológico essencial na manutenção da integridade vascular e cardíaca e um papel patofisiológico na disfunção cardiovascular associada a doenças como a hipertensão, a diabetes, a aterosclerose, a síndrome de isquémia-reperusão, a doença isquémica cardíaca e a falha cardíaca congestiva. De entre as principais ERO e ERA que intervêm nestes processos encontram-se o $O_2^{\cdot-}$, o H_2O_2 , o $\cdot OH$, o $HOCl$, o ROO^{\cdot} , o $\cdot NO$ e o $ONOO^{\cdot}$ (Mimmic-Oka *et al.*, 1999;

Taniyama e Griendling, 2003; Zhang *et al.*, 2003; Lassègne e Griendling, 2004; Touyz e Schiffrin, 2004). Em condições fisiológicas, estas espécies reactivas são produzidas de uma forma controlada, em baixas concentrações e funcionam como moléculas transmissoras de sinais que regulam o funcionamento e o crescimento das células vasculares (Touyz e Schiffrin, 2004). Em situações patológicas, um aumento da produção de ERO e ERA provoca disfunção endotelial, aumento da contractilidade vascular, crescimento das células do músculo liso vascular, migração de monócitos, peroxidação lipídica, inflamação e deposição de proteínas da matriz extracelular, constituindo processos que contribuem para os danos vasculares nas doenças cardiovasculares (Taniyama e Griendling, 2003; Touyz e Schiffrin, 2004). Pelo exposto, será de prever que a utilização de agentes terapêuticos com actividade antioxidante seja benéfica no tratamento de doenças cardiovasculares.

Existem algumas evidências de que as substâncias antioxidantes podem exercer um efeito benéfico na prevenção e controlo de doenças cardiovasculares (Rique *et al.*, 2002). Várias doenças cardiovasculares como a hipertensão, as arritmias cardíacas e a angina de peito, bem como outro tipo de patologias como a ansiedade e o glaucoma são tratadas com recurso a antagonistas β -adrenérgicos (Borchard, 1998; Garrett *et al.*, 1999; Mehvar e Brocks, 2001). As acções terapêuticas dos antagonistas β -adrenérgicos são essencialmente atribuídas ao bloqueio dos receptores do sistema nervoso autónomo. Contudo, alguns dos efeitos benéficos destes compostos no sistema cardiovascular têm também sido associados às propriedades antioxidantes que alguns deles, nomeadamente o carvedilol, já demonstraram possuir (Aruoma *et al.*, 1991; Yue *et al.*, 1992-a; Anderson *et al.*, 1996; Tadolini e Franconi, 1998; Miura *et al.*, 1999).

Alguns ensaios efectuados em modelos animais mostraram resultados favoráveis de terapias antioxidantes no controlo da hipertensão (Vaziri, 2004). No entanto, outros ensaios clínicos recentemente efectuados mostram resultados pouco animadores no que diz respeito à melhoria de patologias cardiovasculares por acção de antioxidantes. Contudo, estes resultados podem dever-se às características farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos antioxidantes utilizados. Por exemplo, as vitaminas C e E, vulgarmente

utilizadas neste tipo de estudos por serem importantes antioxidantes endógenos, quando ingeridas podem ser parcialmente inactivadas no tubo gastrintestinal, atingindo apenas modestas concentrações ao nível vascular (Wassmann *et al.*, 2004). Por outro lado, a utilização de elevadas quantidades destes antioxidantes devem ser evitadas pois podem gerar desequilíbrios, tornando-se assim, paradoxalmente, pro-oxidantes (Vaziri, 2004). Assim, os compostos já utilizados na terapêutica que mostrem possuir efeito antioxidante poderão constituir uma alternativa mais adequada em situações em que esse efeito seja desejável (Marton *et al.*, 2001).

Um dos objectivos deste trabalho foi o de avaliar *in vitro*, em sistemas não celulares, o efeito captador de ERO e ERA de antagonistas β -adrenérgicos, tendo em conta a possível relevância deste efeito para a acção terapêutica destes compostos.

Objectivos do trabalho e estrutura da dissertação

O trabalho conducente a esta dissertação teve como objectivos a implementação de metodologias, com detecção fluorimétrica e quimiluminimétrica, em leitor de microplacas, para avaliação da capacidade de captação de ERO e ERA, bem como, a avaliação *in vitro*, em sistemas não celulares, da capacidade de captação de ERO e ERA por antagonistas β -adrenérgicos utilizados na terapêutica de doenças cardiovasculares.

Esta dissertação divide-se em 6 capítulos principais. O primeiro, designado **Introdução**, consiste num enquadramento teórico em que se caracterizam as ERO e ERA relevantes no sistema cardiovascular e onde são focadas as suas funções patofisiológicas. Também neste capítulo estão resumidas as principais características dos antagonistas β -adrenérgicos. No segundo capítulo são descritos os **Materiais e Métodos** utilizados na fase experimental deste trabalho. Os **Resultados** obtidos são apresentados num terceiro capítulo, a que se segue o quarto capítulo com **Discussão** dos mesmos. As **Conclusões** do trabalho são apresentadas no quinto capítulo. Por último, no sexto capítulo, encontra-se a **Bibliografia** consultada e que sustentou o desenvolvimento deste trabalho.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Espécies reactivas de oxigénio e de azoto presentes no sistema cardiovascular

1.1.1 Anião radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

A transferência de um electrão para o oxigénio molecular dá origem ao $O_2^{\cdot-}$, o qual, para além do electrão desemparelhado, possui também carga negativa, sendo por isso designado várias vezes como anião superóxido (Jaeschke, 1995) ou anião radical superóxido (Ohyashiki *et al.*, 1999). Nas células vasculares, o $O_2^{\cdot-}$ é gerado essencialmente através dos seguintes processos:

- Por acção da NAD(P)H oxidase - Esta enzima constitui a principal fonte de $O_2^{\cdot-}$ no sistema vascular. Ao contrário da NAD(P)H oxidase produzida nas células fagocíticas, que é activada apenas por estimulação e que gera $O_2^{\cdot-}$ no espaço extracelular e em elevadas quantidades, a NAD(P)H oxidase vascular é constitutiva e produz $O_2^{\cdot-}$ intracelularmente de uma forma sustentada e em baixas quantidades (Touyz, 2004). A NAD(P)H oxidase vascular é regulada por vários factores humorais (citoquinas, factores de crescimento, agentes vasoactivos) e factores mecânicos. A angiotensina II, hormona multifuncional com uma forte acção vasoconstritora, estimula a activação da NAD(P)H oxidase vascular, aumenta a expressão das subunidades desta enzima e induz a produção de ERO nos vários tipos de células vasculares (Cai e Harrison, 2000; Touyz, 2004; Touyz e Schiffrin, 2004).
- Por acção da xantina oxidase - *In vivo* a enzima xantina desidrogenase é responsável pelo metabolismo da hipoxantina a xantina e da xantina a ácido úrico, através da transferência de electrões para o NAD^+ . No entanto, a conversão da xantina desidrogenase a xantina oxidase pode ocorrer em tecidos lesados por oxidação ou proteólise parcial. Nestas circunstâncias, a enzima

passa a ter maior afinidade para o oxigénio no processo de cedência de electrões, formando-se assim O_2^- (Cai e Harrison, 2000; Fink, 2002; Touyz, 2004).

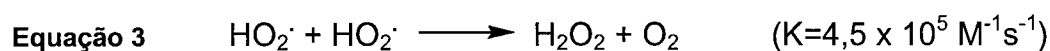
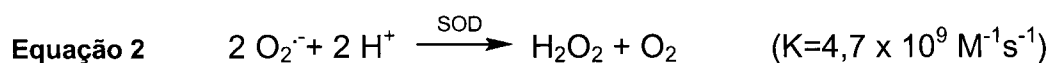
- Através do sistema enzimático citocromo P450 - No que concerne ao sistema enzimático citocromo P450, é bem conhecida a sua acção catalisadora da oxidação de vários compostos endógenos e xenobióticos. Fracções subcelulares contendo retículo endoplasmático de vários tecidos mostraram produzir rapidamente O_2^- e H_2O_2 quando incubadas com NADPH. Este fenómeno deve-se à redução accidental do O_2 a O_2^- e H_2O_2 mediada pelo citocromo P450 em lugar da sua utilização para oxidar os substratos. As isoenzimas do citocromo P450 CYP2B e CYP2E1, indutíveis pelo fenobarbital e etanol respectivamente, apresentam elevadas taxas de formação de O_2^- (Bast *et al.*, 1991; Touyz, 2004).
- A partir da cadeia de transporte de electrões mitocondrial - A saída de electrões da cadeia de transporte de electrões mitocondrial e a sua transferência para o O_2 leva à produção de O_2^- , que em condições normais é rapidamente degradado no local pela enzima superóxido dismutase (SOD). No entanto, mitocôndrias isoladas de ratos hipertensos mostraram uma produção excessiva de O_2^- (El Midaoui *et al.*, 2003). Assim, a mitocôndria poderá ser uma importante fonte de O_2^- na hipertensão (Lassègne e Griendling, 2004; Touyz, 2004).
- A partir das óxido nítrico sintetases (ONS) - As ONS constituem um grupo de enzimas primariamente responsáveis pela produção de $\cdot NO$, que em condições de deficiência de substrato (arginina) ou de co-factor [tetra-hidrobiopterina (BH_4)] podem produzir O_2^- e H_2O_2 . O conhecimento deste fenómeno levou ao conceito de "uncoupling" das ONS, em que há uma diminuição da actividade destas enzimas em relação à produção de $\cdot NO$ ao mesmo tempo que há um aumento da produção de O_2^- pelas mesmas (Cai e Harrison, 2000; Lassègne e Griendling, 2004; Touyz, 2004).

O $O_2^{\cdot-}$ é solúvel em água e não é capaz de permear a membrana celular, atravessando-a via canais aniónicos (Hampton *et al*, 1998). Em comparação com o $\cdot OH$, o $O_2^{\cdot-}$ é bem menos reactivo com espécies não radicalares em solução aquosa. Contudo, esta espécie reage rapidamente com alguns radicais, nomeadamente com o $\cdot NO$ ($K=6,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), originando o $ONOO^-$, o qual possui elevada reactividade (Squadrito e Pryor, 1998).

O HO_2^{\cdot} é a forma protonada do $O_2^{\cdot-}$ (Equação 1). É mais reactivo que o $O_2^{\cdot-}$ e, como não possui carga, atravessa mais facilmente as membranas celulares. Embora a pH fisiológico a razão $[O_2^{\cdot-}]/[HO_2^{\cdot}]$ seja elevada (100/1 a pH=6,8 e 1000/1 a pH=7,8), devido às suas características o HO_2^{\cdot} poderá ter alguma relevância se existirem condições propícias à sua formação, nomeadamente a diminuição dos valores de pH nos locais de geração do $O_2^{\cdot-}$ (Grey, 2002).

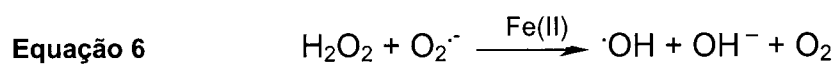
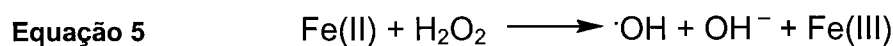
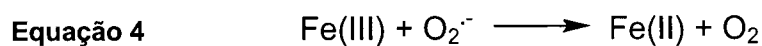


Um aspecto importante do $O_2^{\cdot-}$ reside no facto deste ser uma fonte de H_2O_2 , visto que o $O_2^{\cdot-}$ que se forma *in vivo* é largamente convertido pela SOD (Equação 2) ou por via não enzimática (Equação 3) em H_2O_2 (Cheesman e Slater, 1993). A dismutação do $O_2^{\cdot-}$ catalisada SOD tem uma constante de velocidade (k) muito superior à da dismutação por via não enzimática (Fridovich, 1975; Cadenas, 1989), sendo por isso frequente ver-se referida na literatura apenas a primeira via.



Outra particularidade do $O_2^{\cdot-}$ é a sua capacidade para reduzir metais de transição (Equação 4). As formas reduzidas dos iões dos metais de transição: catião Fe(II) e catião Cu(I) são muito mais reactivas com o H_2O_2 do que as respectivas formas oxidadas: catião Fe(III) e catião Cu(II) (Cheesman e Slater, 1993). Deste modo, o $O_2^{\cdot-}$ pode acelerar a reacção de Fenton, em que há

produção de $\cdot\text{OH}$ a partir do H_2O_2 catalisada por metais de transição (Equação 5). Na verdade, F. Haber e J. Weiss tinham já proposto, em 1934, a formação de $\cdot\text{OH}$ a partir da reacção entre o $\text{O}_2^{\cdot-}$ e o H_2O_2 – reacção de Haber-Weiss. No entanto esta reacção apenas se desencadeia quando catalisada por iões metálicos. Assim, a reacção mais provável corresponde a um somatório das reacções de Fenton e Haber-Weiss (Equação 6) (Cheesman e Slater, 1993; Ohyashiki *et al.*, 1999).



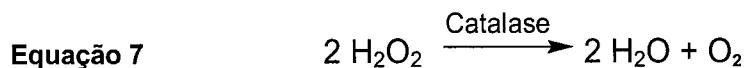
1.1.2 Peróxido de hidrogénio (H_2O_2)

O H_2O_2 é uma ERO que pode funcionar como agente oxidante ou como agente redutor, embora a sua reactividade seja fraca. O H_2O_2 parece ser capaz de inactivar algumas enzimas, normalmente por oxidação dos seus grupos sulfidrilo (-SH) dos locais activos. Apesar da sua fraca reactividade, o H_2O_2 pode ser citotóxico em elevadas concentrações (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Alguns danos celulares provocados pelo H_2O_2 surgem de forma directa (como é o exemplo dos danos directos sobre a enzima da glicólise gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), no entanto a oxidação do ADN, dos lípidos e das proteínas mediada pelo H_2O_2 não se deve à sua acção isolada. O H_2O_2 atravessa rapidamente as membranas e, uma vez dentro da célula, reage provavelmente com iões de ferro (II) ou cobre (I) originando espécies muito mais reactivas como o $\cdot\text{OH}$. Os radicais $\cdot\text{OH}$ são os principais responsáveis pelos danos no ADN de células incubadas na presença de H_2O_2 (Aruoma, 1998).

As enzimas catalase, glutathiona peroxidase e tiorredoxina peroxidase removem o H_2O_2 das células humanas (Halliwell e Gutteridge, 1999;

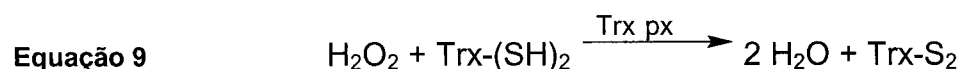
Menéndez, 2001). A catalase promove a dismutação do H_2O_2 em água e oxigénio (Equação 7).



A glutathiona peroxidase (GSH px) catalisa a redução do H_2O_2 a água com intervenção da glutathiona (GSH) (Equação 8) (Cheesman e Slater, 1993; Halliwell e Gutteridge, 1999; Menéndez, 2001).



A tiorredoxina peroxidase (Trx px) pertence à família das peroxirredoxinas que catalisam a redução do H_2O_2 a água com intervenção da tiorredoxina ($\text{Trx}(\text{SH})_2$) (Equação 9) (Chae *et al.*, 1994 a,b; Kang *et al.*, 1998; Halliwell e Gutteridge, 1999).

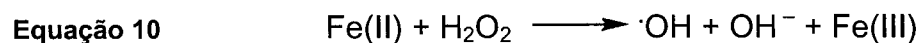


O H_2O_2 é uma ERO mais estável do que as outras e é, por isso, mais facilmente monitorizada (Mohanty *et al.*, 1997).

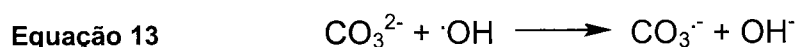
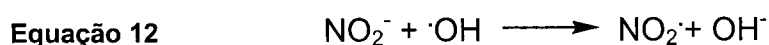
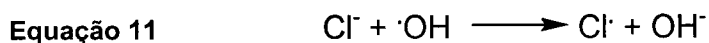
1.1.3 Radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$)

O $\cdot\text{OH}$ é uma espécie oxidante extremamente reactiva com a maior parte das biomoléculas. Tem um tempo de vida muito curto mas é capaz de provocar grandes danos nas moléculas vizinhas a partir do local da sua produção (Cheesman e Slater, 1993; Chen e Schopfer, 1999).

O $\cdot\text{OH}$ é gerado em sistemas biológicos sobretudo pela reacção de Fenton (Equação 10);



As reacções em que o $\cdot\text{OH}$ participa podem ser classificadas em três tipos principais: adição de hidrogénio, remoção de hidrogénio e transferência de electrões. Um exemplo com importância biológica de remoção de hidrogénio radicalar ($\text{H}\cdot$) pelo $\cdot\text{OH}$ é a sua capacidade para desencadear a peroxidação lipídica. As reacções do $\cdot\text{OH}$ com compostos aromáticos procedem-se normalmente por adição, como acontece nas reacções com a guanina e timina no ADN. Assim, quando o $\cdot\text{OH}$ é gerado próximo do ADN, provoca danos nas suas bases (e na desoxirribose) e induz quebras na cadeia. O $\cdot\text{OH}$ participa ainda em reacções de transferência de electrões com iões halogeneto, como é o caso do ião cloreto (Equação 11) bem como com o ião nitrito (NO_2^-) (Equação 12). A reacção do $\cdot\text{OH}$ com o ião carbonato (CO_3^{2-}) produz o anião radical carbonato ($\text{CO}_3^{\cdot-}$) (Equação 13), que é um poderoso agente oxidante (Halliwell e Gutteridge, 1999).



1.1.4 Radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) e radical alcoxilo ($\text{RO}\cdot$)

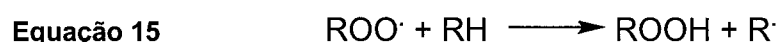
Em geral, os $\text{ROO}\cdot$ e $\text{RO}\cdot$ são fortes agentes oxidantes. Estes radicais têm a capacidade de remover $\text{H}\cdot$ de outras moléculas, constituindo uma reacção importante na peroxidação lipídica (Menéndez, 2001; Spiteller, 2003).

O ataque a compostos orgânicos por parte do $\cdot\text{OH}$, nomeadamente a ácidos gordos polinsaturados como o ácido araquidónico, origina frequentemente radicais alquilo ($\text{R}\cdot$). Estes, em condições aeróbicas, reagem

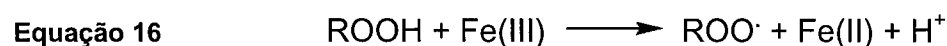
rapidamente com o oxigénio para originar o ROO^\cdot (Equação 14) (Jaeschke, 1995; Menéndez, 2001; Spiteller, 2003).



O ROO^\cdot é suficientemente reactivo para remover outro hidrogénio de um ácido gordo vizinho, gerando-se um hidroperóxido e outro radical de carbono (Equação 15) (Jaeschke, 1995; Menéndez, 2001; Spiteller, 2003).



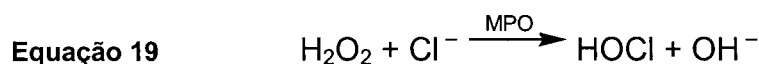
A decomposição dos peróxidos orgânicos pode originar novas espécies radicalares (ROO^\cdot , RO^\cdot e $\cdot\text{OH}$) que irão contribuir para que se iniciem novos processos de peroxidação. Em sistemas biológicos esta decomposição ocorre sobretudo pela acção de metais de transição em reacções do tipo Fenton. (Menéndez, 2001; Spiteller, 2003).



Uma molécula de $\cdot\text{OH}$ pode provocar a conversão de centenas de ácidos gordos em hidroperóxidos lipídicos. A acumulação destes na membrana celular altera a sua função podendo mesmo fazer com que esta colapse, originando morte celular. Os hidroperóxidos lipídicos podem ainda decompor-se, originando uma variedade de compostos citotóxicos entre os quais se destacam os aldeídos, como o malonildialdeído e o 4-hidroxinonenal (Esterbauer *et al.*, 1988; Jaeschke, 1995). Os ROO^\cdot e os aldeídos citotóxicos podem provocar danos nas proteínas de membrana, inactivando receptores, transportadores e enzimas ligadas à membrana (Dean *et al.*, 1986).

1.1.5 Ácido hipocloroso (HOCl)

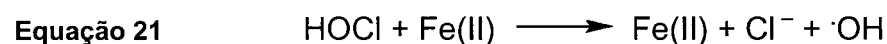
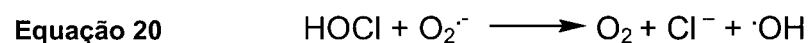
O HOCl é produzido por acção da enzima mieloperoxidase (MPO) em neutrófilos activados, a partir do H_2O_2 e do Cl^- (Equação 19) (Prütz, 1996; Nève *et al.*, 2001; Peskin e Winterbourn, 2001). É um poderoso agente anti-microbiano e, por isso, tem um papel de destaque na defesa imunitária do organismo desencadeada pelos neutrófilos (Prütz, 1996).



In vivo, o HOCl pode atacar vários alvos. Uma das suas principais acções é a inactivação da α_1 -antiproteínase (pelo ataque ao resíduo da metionina), um importante protector das células contra o ataque de enzimas proteolíticas como a elastase (Yan *et al.*, 1996; Nève *et al.*, 2001).

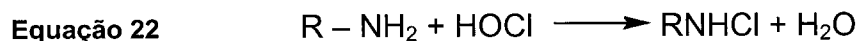
O HOCl oxida grupos sulfidrilo, o ascorbato, o NADPH e promove a cloração das bases do ADN, especialmente as pirimidínicas, e dos resíduos de tirosina nas proteínas. A passagem do HOCl pelas membranas celulares provoca danos nas proteínas das mesmas (especialmente nos grupos SH) e, se conseguir entrar no citoplasma, reage também com constituintes celulares (Prütz, 1996; Yan *et al.*, 1996; Peskin e Winterbourn, 2001).

A reacção do HOCl com o $\text{O}_2^{\cdot-}$ gera $\cdot\text{OH}$ (Equação 20). A geração de $\cdot\text{OH}$ pode também ser desencadeada através da sua reacção com o catião Fe(II) (Equação 21) (Prütz, 1996).



A reacção do HOCl com a taurina, que está presente em níveis elevados em vários tecidos dos mamíferos como produto final do metabolismo de aminoácidos contendo enxofre, gera cloraminas de taurina. Produtos semelhantes podem formar-se a partir da reacção do HOCl com outras aminas (Equação 22). Tanto o HOCl como as cloraminas parecem interferir com os

processos de reparação do ADN (Nève *et al.*, 2001 ; Peskin e Winterbourn, 2001).



1.1.6 Óxido nítrico ($\cdot NO$)

O $\cdot NO$ é um gás incolor, moderadamente solúvel em água e bastante solúvel em solventes orgânicos. Deste modo, o $\cdot NO$ tem tendência a concentrar-se nas membranas *in vivo* e difunde-se facilmente entre as células (Beckman e Koppenol, 1996). O $\cdot NO$ possui um electrão desemparelhado na orbital $\pi 2p$ anti-ligante sendo, por isso, uma molécula paramagnética e um radical (Halliwell e Gutteridge, 1999).

O $\cdot NO$ é sintetizado nos organismos vivos pelas ONS, que convertem o aminoácido L-arginina em $\cdot NO$ e noutro aminoácido, a L-citrulina (Equação 23) (Murphy *et al.*, 1998; Nakatsubo *et al.*, 1998; von Bohlen und Halbach, 2003).

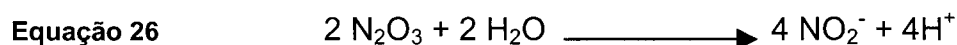
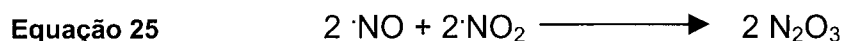
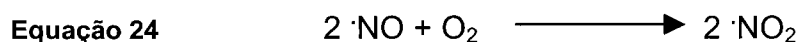


As ONS podem ser classificadas em constitutivas (cONS) e indutíveis (iONS). As formas constitutivas estão presentes no endotélio vascular, nas plaquetas e em alguns neurónios do sistema nervoso central (SNC) e do sistema nervoso periférico (SNP). As cONS produzem quantidades relativamente baixas de $\cdot NO$, da ordem dos nanomolar, e a sua actividade é regulada pelos níveis intracelulares de iões cálcio. As iONS, geram uma maior quantidade de $\cdot NO$ (próxima do micromolar) comparativamente às cONS. A expressão de iONS requer a exposição das células a endotoxinas bacterianas ou a certas citoquinas. Nas iONS, a síntese de $\cdot NO$ é independente dos níveis intracelulares de cálcio. As iONS são produzidas nos macrófagos e neutrófilos activados mas também noutros tipos de células como as do músculo liso,

hepatócitos, astrócitos, células β do pâncreas e vários tipos de células tumorais (Kostka, 1995; Nakatsubo *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2002). Quando as iONS são expressas em grandes quantidades, os elevados níveis de $\cdot\text{NO}$ gerados podem causar danos nos tecidos. Na verdade, esta espécie reactiva está envolvida em situações patológicas como o choque por endotoxinas e a inflamação. As iONS possuem também actividade antimicrobiana e tumoricida na defesa do organismo e na resposta imunitária (Nussler e Billar, 1993; Miyasaka e Hirata, 1997; Nagano, 1999; Esch *et al.*, 2002).

O $\cdot\text{NO}$, quando produzido pelas cONS, desempenha um papel de mensageiro molecular, estando envolvido na regulação de diversos processos fisiológicos tais como a transdução de sinais, a neurotransmissão, o relaxamento do músculo liso, o peristaltismo, a inibição da agregação plaquetária, a regulação da pressão arterial, o controlo do sistema imunitário, a aprendizagem e a memória (Moncada *et al.*, 1991; Nagano, 1999).

O $\cdot\text{NO}$ possui uma elevada afinidade para o ferro do grupos heme, o O_2^- e para o O_2 (Stamler *et al.*, 1992; Padgett e Whorton, 1995). Como o $\cdot\text{NO}$ reage rapidamente com estes alvos, o seu tempo de vida é curto, da ordem dos segundos. Na presença do oxigénio, o $\cdot\text{NO}$ autoxida-se rapidamente para formar $\cdot\text{NO}_2$ (Equação 24). A reacção do $\cdot\text{NO}_2$ com outro $\cdot\text{NO}$ produz N_2O_3 (Equação 25), um potente agente nitrosante. Na fase aquosa, o N_2O_3 hidroliza-se rapidamente para formar o NO_2^- (Equação 26) (Wink e Mitchell, 1998; O'Donnell *et al.*, 1999; Augusto *et al.*, 2002; Espey *et al.*, 2002). Assim, o NO_2^- é o principal produto de decomposição do $\cdot\text{NO}$ em soluções tampão (O'Donnell *et al.*, 1999). *In vivo*, a via predominante de remoção do $\cdot\text{NO}$ dos vasos sanguíneos é pela reacção com a oxi-hemoglobina para formar meta-hemoglobina e ião nitrato (NO_3^-) (O'Donnell *et al.*, 1999).

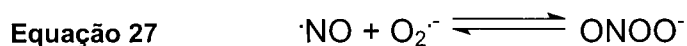


A autooxidação do $\cdot\text{NO}$ na presença do O_2 é fisiologicamente importante em ambientes hidrofóbicos como as membranas biológicas (Liu *et al.*, 1998) e no interior hidrofóbico de proteínas devido à elevada solubilidade do $\cdot\text{NO}$ e do O_2 nestes ambientes (Nedospasov *et al.*, 2000). Isto leva a um aumento local de N_2O_3 e conseqüentemente a reacções de nitrosação, como foi recentemente demonstrado no centro hidrofóbico da albumina do soro de bovinos (Liu *et al.*, 1998; Nedospasov *et al.*, 2000).

Alguns dos efeitos tóxicos observados em células expostas a um excesso de $\cdot\text{NO}$ não se devem directamente à acção deste, mas sim à acção dos seus produtos de oxidação (N_2O_3 , ONOO^- , entre outros) (Eiserich *et al.*, 1996; Koppenol, 1998).

1.1.7 Anião peroxinitrito (ONOO^-)

O ONOO^- é uma ERA que se forma pela reacção do $\cdot\text{NO}$ com o O_2^- , a qual não requer catálise enzimática (Equação 27) (Huie e Padmaja, 1993; Goldstein e Czapski, 1995; Kissner *et al.*, 1997; Radi *et al.*, 2002). Embora esta reacção seja normalmente referida pela literatura apenas no sentido da formação do ONOO^- , a reacção inversa é também possível, embora ocorra muito mais lentamente (Coddington *et al.*, 1999).

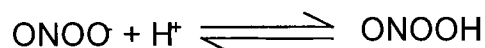


A reacção entre o $\cdot\text{NO}$ e o O_2^- é extremamente rápida, mais rápida inclusivamente do que a dismutação do O_2^- pela SOD, e é biologicamente significativa por dois motivos. Primeiro, porque cada uma das espécies pode antagonizar as acções biológicas da outra. Segundo, porque esta reacção transforma dois radicais relativamente pouco reactivos numa das espécies mais reactivas, o ONOO^- (Squadrito e Pryor, 1998). O ONOO^- é produzido *in vivo* por macrófagos activados, neutrófilos e células endoteliais (Kooy e Royall, 1994; Romero *et al.*, 1999).

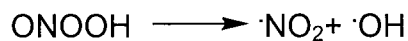
Como o $\cdot\text{NO}$ é neutro e hidrofóbico, logo capaz de atravessar membranas, enquanto que o $\text{O}_2^{\cdot-}$ é aniónico a pH neutro ($\text{pK}_a = 4,8$), a formação de ONOO^- vai ocorrer predominantemente perto dos locais de geração do $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Alvarez e Radi, 2003). Por sua vez, o ONOO^- atravessa as membranas por difusão passiva, sob a forma do seu ácido conjugado, o ácido peroxinitroso (ONOOH , $\text{pK}_a = 6,8$) ou através de canais aniónicos, quando na sua forma aniónica (Denicola *et al.*, 1998).

O ONOO^- , em condições fisiológicas, tem um tempo de vida de cerca de 1 segundo e origina a sua forma protonada, o ONOOH (Equação 28) (Ketsawatsakul *et al.*, 2000), que é altamente reactivo e origina espécies oxidantes e nitrantes. Na verdade, diferentes produtos de decomposição do ONOO^- assumem um papel na sua actividade biológica. Pela fissão homolítica do ONOOH , são produzidos os radicais $\cdot\text{OH}$ e $\cdot\text{NO}_2$ (Equação 29) (Beckman *et al.*, 1990; Sharov *et al.*, 1998; Coddington *et al.*, 1999). Os produtos do ONOOH levam, por último, à formação de NO_3^- (Equação 30).

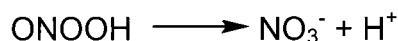
Equação 28



Equação 29

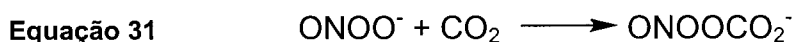


Equação 30

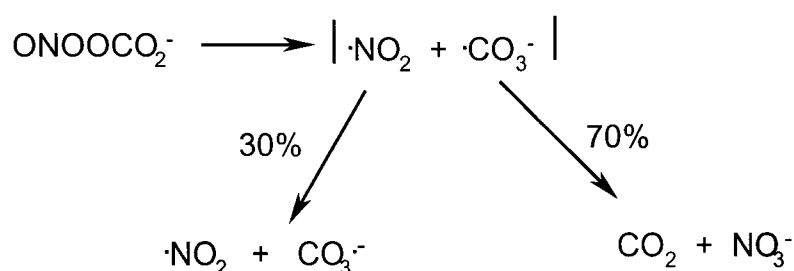


Normalmente as reacções com ONOOH são muito mais rápidas do que aquelas com o ONOO^- , a pH fisiológico (Squadrito e Pryor, 1998). Uma excepção consiste na reacção do ONOO^- com o CO_2 . A maior parte do CO_2 que se encontra dissolvido no plasma (numa concentração de aproximadamente 1,3 mM) está em equilíbrio com o HCO_3^- , sendo o sistema $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ um dos principais sistemas tampão do sangue. O HCO_3^- é um dos constituintes dos fluidos extracelulares mais abundante, estando presente numa concentração de aproximadamente 25 mM no plasma e 12 mM nos

fluidos intracelulares (Zhu *et al.*, 1992). Foi notada pela primeira vez em 1969 a instabilidade do ONOO^- em tampões carbonato (Keith e Powell, 1969). A partir daí, estudos sugeriram que o ONOO^- reagia com o CO_2 pela formação de um novo aducto, o nitrosoperoxycarbonato (ONOOCO_2^-) (Raid *et al.*, 1993). Mais recentemente este aducto mostrou formar-se através da reacção do ONOO^- com o CO_2 a uma constante de velocidade de $3.5,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, a 37°C (Equação 31) (Raid *et al.*, 1993; Lymar e Hurst, 1995). A decomposição do ONOOCO_2^- leva à formação de CO_2 e NO_3^- (cerca de 70%) e também dos radicais $\cdot\text{NO}_2$ e $\cdot\text{CO}_3^-$ (cerca de 30%) (Equação 32) (Denicola *et al.*, 1996; Lymar e Hurst, 1996; Sharov *et al.*, 1998; Squadrito e Pryor, 1998; Bonini *et al.*, 1999; Espey *et al.*, 2002; Kohnen *et al.*, 2003). Tendo em conta as elevadas concentrações de CO_2 em condições fisiológicas, é mais provável que muitos dos efeitos do ONOO^- *in vivo* sejam mediados por intermediários reactivos resultantes da reacção $\text{ONOO}^-/\text{CO}_2$ e não pelo próprio ONOO^- (Squadrito e Pryor, 1998; Jourd'heuil, 1999).



Equação 32



O ONOO^- e seus derivados envolvem-se em variadas reacções de oxidação e nitração, provocando danos a nível celular de que são exemplo: a oxidação dos grupos sulfidrido e de outros antioxidantes, a oxidação de lípidos, a quebra da cadeia de ADN, a nitração e desaminação das bases de ADN (especialmente a guanina) e a nitração dos resíduos de aminoácidos aromáticos em proteínas (Denicola *et al.*, 1996; Murphy *et al.*, 1998). A reacção

mais estudada em proteínas tem sido a conversão da tirosina em 3-nitrotirosina, mas também o triptofano e a fenilalanina podem sofrer nitração. A 3-nitrotirosina tem sido detectada em várias situações patológicas, incluindo lesões de aterosclerose nas artérias coronárias humanas. Por sua vez, a metionina é oxidada pelo ONOO^- no seu sulfóxido. Logo, o ONOO^- (tal como o HOCl) pode provocar a inativação da α_1 -antiproteínase (Murphy *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2002; Zou *et al.*, 2002). O ONOO^- tem, por isso, sido implicado em várias patologias como as doenças cardiovasculares, a inflamação, a isquemia-reperfusão, o choque séptico, o cancro, a diabetes, a asma e as desordens neurodegenerativas como as doenças de Alzheimer e Parkinson (Beckman, 1996; Hashjin *et al.*, 1998; Squadrito e Pryor, 1998; Bonini *et al.*, 1999; Digerness *et al.*, 1999; Estévez *et al.*, 1999; Halliwell *et al.*, 1999; Wattanapitayakul *et al.*, 2000; Alvarez e Radi, 2003).

1.2 Funções patofisiológicas das espécies reactivas de oxigénio e de azoto no sistema cardiovascular

1.2.1 Hipertensão arterial

As ERO são produzidas no sistema cardiovascular, nomeadamente pelas células endoteliais, pelas células do músculo liso vascular (CMLV) e pelos fibroblastos (Taniyama e Griendling, 2003; Touyz e Schiffrin, 2004), por diferentes vias (ver 1.1.1) das quais se destaca a NAD(P)H oxidase, considerada a principal fonte geradora de $O_2^{\cdot-}$ no sistema cardiovascular (Cai e Harrison, 2000; Kyaw *et al.*, 2004; Touyz e Schiffrin, 2004). O $O_2^{\cdot-}$, por acção da SOD, é convertido em H_2O_2 , que por sua vez é metabolizado pelas enzimas catalase, GSH px e Trx px em H_2O . Por outro lado, o $O_2^{\cdot-}$ reage rapidamente com o $\cdot NO$, produzido nas células do endotélio vascular pelas cONS, originando o $ONOO^{\cdot-}$. Este, além de ser uma espécie fortemente reactiva, poderá contribuir para o fenómeno de “uncoupling” das ONS, isto é, o $ONOO^{\cdot-}$ provoca uma diminuição dos níveis de arginina e de BH_4 diminuindo a actividade das ONS em relação à produção de $\cdot NO$ e aumentando a produção de $O_2^{\cdot-}$ pelas mesmas. Além disso, o $ONOO^{\cdot-}$ é também responsável pela inibição da SOD. O $O_2^{\cdot-}$ e os seus metabolitos, quer directamente, quer por redução dos níveis de $\cdot NO$, induzem a vasoconstrição, a hipertrofia vascular e do miocárdio, a diminuição da função renal e o aumento da actividade simpática do sistema nervoso autónomo. Todos estes efeitos contribuem para o desenvolvimento da hipertensão arterial (Figura 1) (Lassègne e Griendling, 2004).

A deficiente vasodilatação mediada pelo endotélio que se observa em situações de hipertensão arterial tem vindo a ser relacionada com um decréscimo de $\cdot NO$. Este decréscimo pode resultar de uma síntese diminuída de $\cdot NO$, quer por diminuição da expressão das cONS endoteliais, quer por ausência de substrato ou de cofactores para as ONS, ou de um aumento do seu consumo por reacção com o $O_2^{\cdot-}$ com consequente formação de $ONOO^{\cdot-}$

(Halliwell e Gutteridge, 1999; Cai e Harrison, 2000; Wattanapitayakul *et al.*, 2000; Touyz e Schiffrin, 2004). Existem evidências de que o equilíbrio $\cdot\text{NO}/\text{O}_2\cdot^-$ é um factor importante na manutenção da função cardíaca (Lassègne e Griending, 2004). O ONOO^- é um fraco vasodilatador quando comparado com o $\cdot\text{NO}$ e, além disso, possui propriedades pro-inflamatórias (Halliwell e Gutteridge, 1999; Touyz e Schiffrin, 2004).

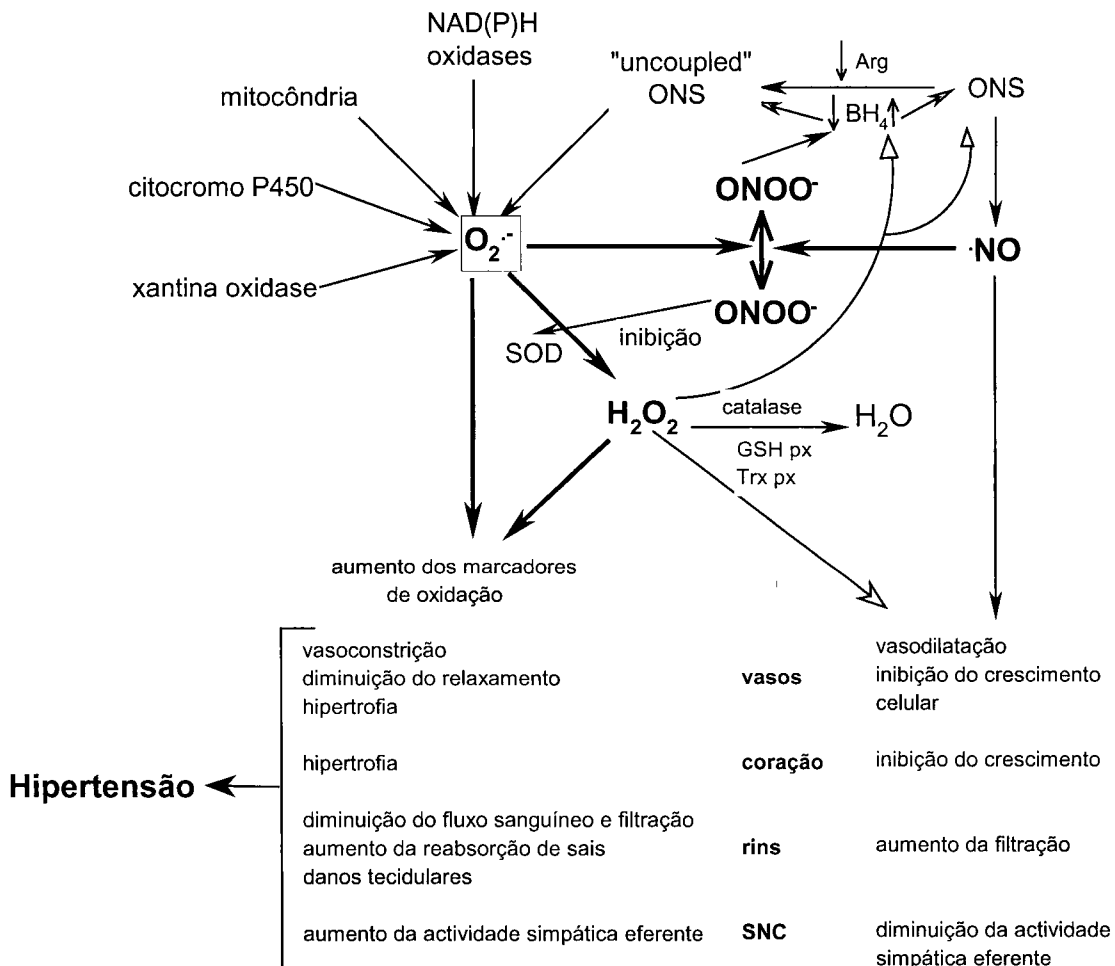


Figura 1 – Principais mecanismos pelos quais as ERO conduzem à hipertensão (adaptado de Lassègne e Griending, 2004).

O tónus vasomotor pode também ser regulado pelos efeitos directos das ERO. Estas parecem provocar vasodilatação ou vasoconstrição, dependendo do tipo de espécies geradas e do local onde são geradas. Existem indicações de que o H_2O_2 poderá ter uma acção vasodilatadora. Na verdade, pensa-se que o H_2O_2 serve como factor de relaxamento na hipertensão quando há

depleção de $\cdot\text{NO}$. Um outro mecanismo através do qual o H_2O_2 induz relaxamento vascular é a activação das ONS endoteliais, quer directamente quer por aumento da síntese de BH_4 com consequente aumento da libertação de $\cdot\text{NO}$ (Lassègne e Griendling, 2004; Touyz e Schiffrin, 2004) (Figura 1).

A hipertrofia vascular observada na hipertensão está também relacionada com as ERO devido à sua acção sobre o crescimento das CMLV. Embora as ERO possam, em elevadas concentrações, conduzir à apoptose celular, em situações de hipertensão são geradas em quantidades moderadas, promovendo o crescimento das CMLV e a hipertrofia vascular (Irani, 2000; Lassègne e Griendling, 2004; Touyz e Schiffrin, 2004). Aliás, a angiotensina II, uma hormona multifuncional, com uma potente acção vasoconstritora, envolvida em vários processos celulares importantes na regulação da função vascular, induz uma resposta hipertrófica das CMLV por produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e de H_2O_2 (Touyz, 2004). A supressão das ERO inibe a hipertrofia induzida pela angiotensina II (Irani, 2000; Taniyama e Griendling, 2003).

As ERO induzem o aumento da permeabilidade endotelial, com extravasamento de proteínas plasmáticas e outras macromoléculas e recrutamento de proteínas e células inflamatórias, que prejudicam a função endotelial e agravam os danos vasculares. A coexistência de uma reacção inflamatória com o stresse oxidativo induz a disfunção endotelial. Várias alterações vasculares, dependentes de mecanismos redox, que ocorrem na hipertensão existem também em situações de aterosclerose (Taniyama e Griendling, 2003; Touyz e Schiffrin, 2004).

Os rins são importantes órgãos na regulação da pressão arterial, logo alterações no funcionamento renal provocadas pelas ERO tais como a diminuição do fluxo urinário e sanguíneo provocada pelo H_2O_2 e o aumento do consumo de $\cdot\text{NO}$ por um excesso de $\text{O}_2^{\cdot-}$, podem provocar um aumento da pressão arterial (Lassègne e Griendling, 2004).

1.2.2 Outras patologias vasculares

Um dos efeitos mais nefastos das ERO e ERA é a peroxidação lipídica, a qual pode levar à formação de lipoproteínas da baixa densidade (LDL) oxidadas. Estas lipoproteínas oxidadas estão envolvidas em vários passos da aterosclerose. O $\cdot\text{OH}$ pode iniciar a peroxidação de ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa presentes nas LDL, originando $\text{ROO}\cdot$. Estes radicais podem atacar ácidos gordos adjacentes até ocorrer uma completa fragmentação das cadeias de ácidos gordos. Consequentemente, um número de produtos altamente reactivos, incluindo o malonildialdeído, acumulam-se nas LDL. Estes produtos interagem com as cadeias laterais de aminoácidos da apoproteína B, modificando-a de forma a que esta deixa de ser reconhecida pelos receptores das LDL (Mimic-Oka *et al.*, 1999). As LDL oxidadas passam assim a ser reconhecidas e captadas pelos macrófagos na parede dos vasos sanguíneos. A acumulação destas partículas nos macrófagos origina as “foam cells” que contribuem para a formação das placas ateroscleróticas. Estas placas originam um bloqueio total ou parcial da circulação sanguínea, o que leva ao aparecimento de zonas isquémicas (Marton *et al.*, 2001).

Vários estudos demonstram que o ONOO^- poderá ser outra das espécies responsáveis pela oxidação das LDL podendo, por isso, exercer um papel fundamental no desenvolvimento de lesões ateroscleróticas (Ma *et al.*, 1997; Eiserich *et al.*, 1998). A nitrosação de proteínas por esta espécie reactiva parece estar também envolvida no desenvolvimento da aterosclerose (Kyaw *et al.*, 2004).

Por outro lado, o HOCl parece também intervir na oxidação das LDL. Esta espécie reactiva é gerada pela MPO, existente nos neutrófilos, monócitos e macrófagos, na presença de H_2O_2 . Verificou-se já a elevada presença de MPO e de LDL modificadas pelo HOCl em lesões ateroscleróticas humanas (Malle *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003). Aliás, existem evidências do envolvimento da MPO em várias doenças cardiovasculares. Segundo vários investigadores, há pelo menos três mecanismos pelos quais a MPO provoca danos vasculares: a) consumo do $\cdot\text{NO}$, b) oxidação das LDL, que faz com que estas sejam captadas pelos macrófagos de uma forma descontrolada e c) reacções com a L-arginina

e proteínas com a produção de inibidores da síntese de $\cdot\text{NO}$ (por exemplo a Cl-L-arginina). Todos estes mecanismos são dependentes do H_2O_2 (Zhang *et al.*, 2003). Como já foi anteriormente referido, a NAD(P)H oxidase vascular, não leucocitária, é a principal fonte de ERO no tecido vascular. Por este motivo, Zhang *et al.* (2003) efectuaram um estudo com o objectivo de verificar se a MPO, presente quer em fagócitos activados infiltrados nos vasos sanguíneos, quer na circulação, seria capaz de utilizar o H_2O_2 produzido pela NAD(P)H oxidase vascular e se isso se traduziria em alterações vasculares danosas. Estas situações verificaram-se, confirmando-se, assim, que o mecanismo envolvido nos danos provocados pela MPO ao nível vascular consiste na sua utilização de H_2O_2 para produzir HOCl e os seus derivados clorados (Zhang *et al.*, 2003).

A apoptose das células endoteliais parece ser um factor preponderante na patogénese da aterosclerose humana (Irani, 2000; Taniyama e Griendling, 2003). Por outro lado, pensa-se que a proliferação das células endoteliais beneficia os processos de reparação após danos na parede das artérias, enquanto que a proliferação das CMLV resulta em reestenose. Aparentemente, as ERO induzem os danos nas células endoteliais e o crescimento das CMLV, o que conduz a situações patológicas como a hipertensão arterial, a aterosclerose, a falha cardíaca e a reestenose (Taniyama e Griendling, 2003; Kyaw *et al.*, 2004).

Os glóbulos vermelhos são células sanguíneas muito susceptíveis à acção de espécies reactivas porque estão expostas a elevadas tensões de oxigénio e são muito ricas em ferro, um metal de transição que promove a formação de ERO. Em condições normais as ERO são geradas continuamente, contudo, os mecanismos antioxidantes previnem os seus efeitos deletérios. Quando há um desequilíbrio que altera o balanço entre a produção de ERO e a sua eliminação, os glóbulos vermelho sofrem lesões oxidativas por parte destas, o que se manifesta quer a nível estrutural, quer a nível funcional. Os danos estruturais dos glóbulos vermelhos levam a alterações das suas características, nomeadamente da sua deformabilidade. Uma diminuição da deformabilidade dos glóbulos vermelhos pode tornar mais lento ou mesmo bloquear o fluxo sanguíneo, dado que estas células têm que sofrer

deformações quando atravessam pequenos vasos sanguíneos cujo diâmetro é menor do que elas próprias (Marton *et al.*, 2001).

O fenómeno conhecido como isquémia-reperfusão está também intimamente ligado à formação de excessivas quantidades de ERO resultantes da reoxigenação de um tecido que esteve durante um certo tempo privado de O₂. Pensa-se que a enzima xantina oxidase e os metais de transição que são libertados para a corrente sanguínea pelos tecidos afectados possam ser os principais responsáveis pela formação de ERO durante o processo de perfusão. A geração de HOCl pela enzima MPO em neutrófilos activados que se infiltram no tecido reoxigenado também é responsável por danos associados à isquémia-reperfusão. O ONOO⁻ tem também sido implicado na patogénese desta situação clínica (Arouma *et al.*, 1991; Halliwell e Gutteridge, 1999; Persad *et al.*, 1999).

1.3 Antagonistas β -adrenérgicos

Os antagonistas β -adrenérgicos são compostos amplamente utilizados no tratamento de doenças cardiovasculares como a hipertensão, as arritmias cardíacas e a angina de peito, bem como noutras patologias como a ansiedade e o glaucoma (Borchard, 1998; Garrett *et al.*, 1999; Mehvar e Brocks, 2001).

O mecanismo de acção dos antagonistas β -adrenérgicos consiste na formação de complexos com os receptores β do sistema nervoso autónomo simpático, impedindo assim a ligação da noradrenalina e adrenalina (Figura 2), principais aminas simpaticomiméticas responsáveis pelas respostas fisiológicas à estimulação dos nervos simpáticos. Isto leva a um antagonismo competitivo que é caracterizado por um desvio para a direita da curva concentração-resposta do agonista (Borchard, 1998).

Em muitos órgãos há uma coexistência de receptores adrenérgicos dos subtipos β_1 e β_2 (Tabela 1). Por exemplo, em condições normais, dos receptores β presentes no coração humano, cerca de 80 % pertencem ao subtipo β_1 e apenas os restantes 20 % pertencem ao subtipo β_2 . As acções fisiológicas e terapêuticas dos antagonistas β -adrenérgicos dependem da densidade de receptores β_1 e β_2 nos diferentes órgãos, da afinidade do composto e da sua concentração no local de acção (Borchard, 1998).

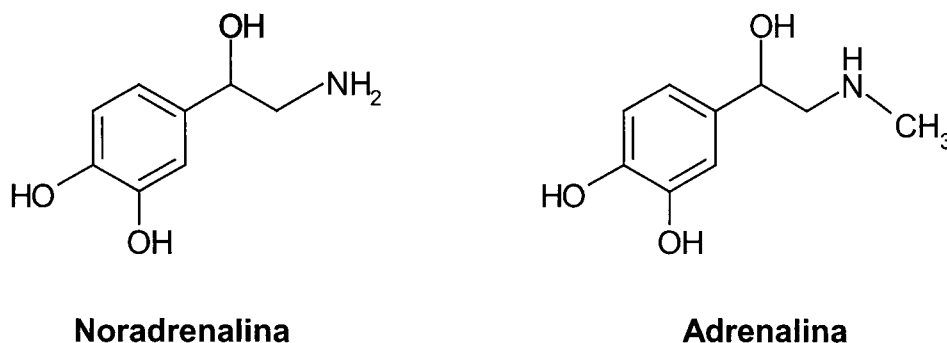


Figura 2 – Estrutura química da noradrenalina e adrenalina.

Órgão	Subtipo	Função
Coração	$\beta_1, (\beta_2)^a$	Estimulação cardíaca: efeitos crono-, ino-, dromo- e batmotrópico positivos.
Tracto gastrointestinal	β_1	Relaxamento gastrointestinal.
Rim	$\beta_1, (\beta_2)^a$	Aumento da libertação da renina.
Células gordas	$\beta_1, (\beta_2)^a$	Estimulação da lipólise.
Brônquios	β_2	Relaxamento dos brônquios.
Vasos sanguíneos	$\beta_2, (\beta_1)^b$	Dilatação da musculatura dos vasos.
Útero	β_2	Relaxamento do útero.
Pâncreas (células β)	$\beta_2, (\beta_1)^a$	Estimulação da secreção da insulina.
Glândula tiroideia	$\beta_2, (\beta_1)^a$	Aumento da conversão $T_4 \rightarrow T_3$.

Tabela 1 – Algumas respostas fisiológicas mediadas pelos receptores adrenérgicos β_1 e β_2 nos diferentes órgãos (^a subtipo coexistente; ^b vasos sanguíneos cerebrais) (adaptado de Borchard, 1998).

No que diz respeito à sua utilidade clínica, os antagonistas β -adrenérgicos distinguem-se com base na sua selectividade pelos receptores β -adrenérgicos do subtipo β_1 , na sua actividade agonista parcial e nas suas propriedades fisico-químicas (lipofilia e estereoespecificidade). O propranolol, o pindolol, o labetalol, o timolol, o sotalol e o carvedilol (Figura 3) são exemplos de alguns antagonistas β -adrenérgicos não selectivos, ou seja, que têm afinidade quer para os receptores β_1 , quer para os β_2 . Por sua vez, o atenolol e o metoprolol (Figura 3) são considerados antagonistas selectivos para os receptores β_1 . A maior parte das acções terapêuticas dos antagonistas β -adrenérgicos devem-se à inibição dos receptores β_1 enquanto que grande parte dos seus efeitos secundários se deve à inibição dos receptores β_2 (Borchard, 1998; Mehvar e Brocks, 2001). Na maior parte das situações terapêuticas os compostos

selectivos para os receptores β_1 são tão eficazes como os compostos não selectivos, no entanto, os antagonistas β -adrenérgicos selectivos são mais bem tolerados do que os não selectivos devido a apresentarem menos efeitos secundários. A grande vantagem de uma elevada selectividade para os receptores β_1 está na baixa incidência de obstrução das vias respiratórias que resulta do bloqueio dos receptores β_2 (Borchard, 1998).

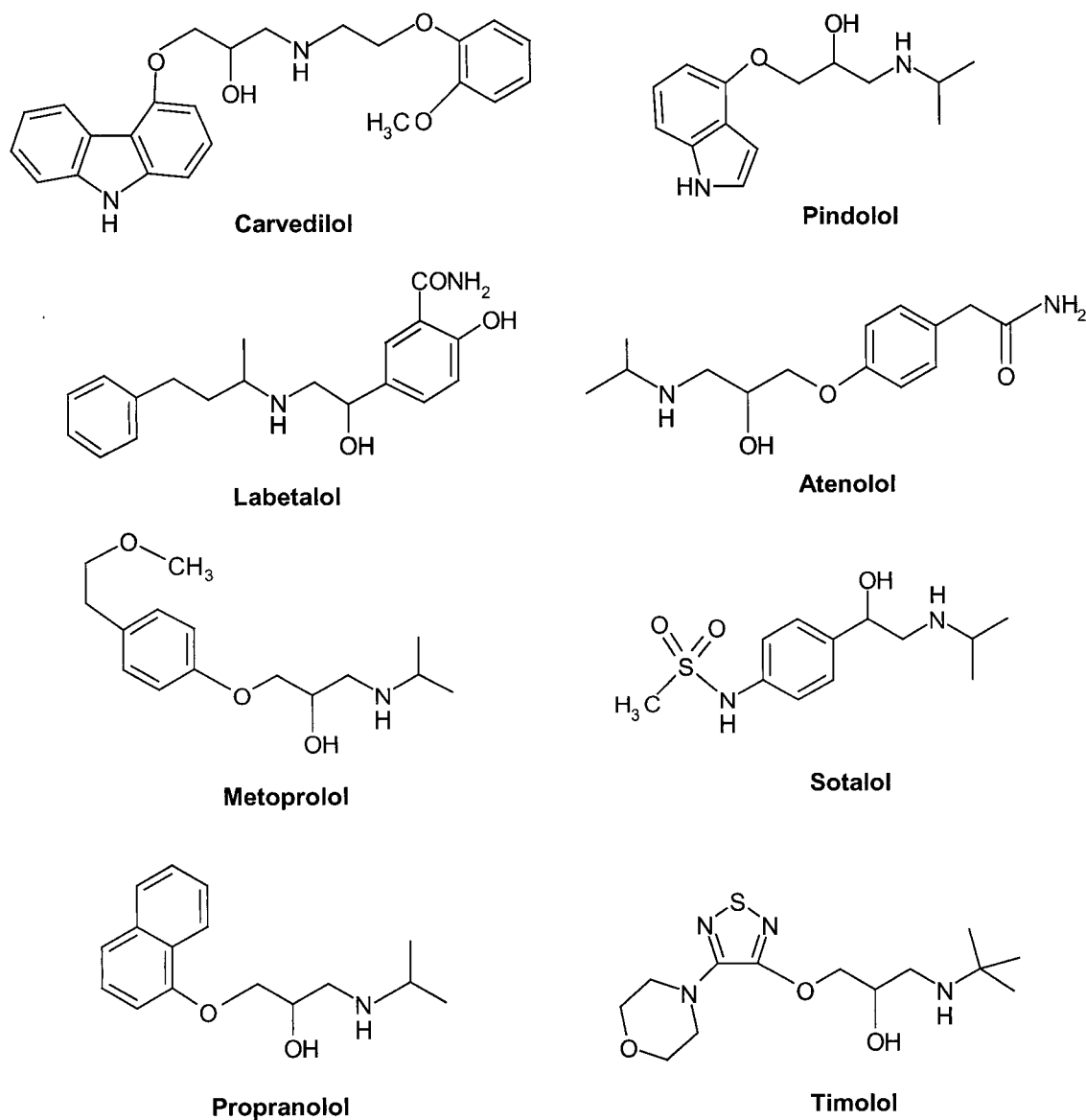


Figura 3 – Estruturas químicas dos antagonistas β -adrenérgicos estudados neste trabalho.

Para além da acção antagonista β , o carvedilol possui também acção antagonista α_1 . Esta característica faz com que o carvedilol possua efeito vasodilatador directo, o que se traduz numa diminuição das resistências periféricas, tornando-o útil no tratamento da doença cardíaca congestiva ao contrário dos outros antagonistas β -adrenérgicos que não possuem este efeito (Borchard, 1998; Mehvar e Brocks, 2001).

A actividade agonista parcial ou actividade simpaticomimética intrínseca de alguns antagonistas β -adrenérgicos, como é o caso do pindolol, deve-se à semelhança das moléculas agonistas e antagonistas (Figura 2 e Figura 3). A ligação deste tipo de compostos aos receptores resulta numa ligeira transdução de sinal mas ao mesmo tempo numa acção antagonista. Os antagonistas β -adrenérgicos com actividade agonista parcial podem ter algumas vantagens, nomeadamente em doentes com baixa taxa cardíaca. Contudo, há estudos clínicos que revelam uma menor eficiência deste tipo de compostos para reduzir a mortalidade em doentes com enfarte agudo do miocárdio (Borchard, 1998).

Os antagonistas β -adrenérgicos podem ser divididos em compostos lipofílicos e hidrofílicos. O atenolol e o sotalol são exemplos de compostos hidrofílicos enquanto que o propranolol ou o pindolol são lipofílicos. Há vários parâmetros que estão relacionados com esta característica como: a) a duração do bloqueio do receptor β ; b) o metabolismo ou a eliminação renal; c) a difusão através de barreiras biológicas (placenta, barreira hemato-encefálica); d) a concentração nos tecidos (Borchard, 1998).

Uma característica comum no que diz respeito à estrutura química dos antagonistas β -adrenérgicos é a existência de pelo menos um anel aromático ligado a uma cadeia lateral alquilo que possui os grupos funcionais hidroxilo e amina secundária. Cada um dos antagonistas β -adrenérgicos tem um ou mais carbonos quirais e, em todos os casos, pelo menos um desses carbonos quirais presentes na cadeia lateral alquilo encontra-se directamente ligado ao grupo hidroxilo (Mehvar e Brocks, 2001). À excepção do timolol que é comercializado sob a forma de enantiómero S, os antagonistas β -adrenérgicos com um carbono quiral são misturas racémicas do enantiómero S, que possui o

efeito antagonista β , e do enantiómero R, que não possui esse efeito. No caso do labetalol, que possui dois centros quirais, a mistura racêmica consiste nos quatro isômeros (Borchard, 1998; Mehvar e Brocks, 2001).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes

A di-hidrorodamina 123 (DHR), o H_2O_2 30%, a 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2), o ácido ascórbico, a solução de NaOCl, o ebselen, o 3-(2-hidroxi-1-(1-metiletil)-2-nitroso-hidrazino)-1-propanamina (NOC-5), o luminol, a lucigenina, a xantina oxidase (XO) de *buttermilk* (grau I) (EC 1.1.3.22), a xantina, a hipoxantina (HX), o ácido lipóico e os antagonistas β -adrenérgicos, excepto o carvedilol, foram adquiridos à Sigma. O dicloridrato de 2,2'-azobis-2-amidinopropano (AAPH), a melatonina e o trolox foram adquiridos à Fluka. A fluoresceína, o tiron e a rutina foram adquiridos à Aldrich. O carvedilol foi gentilmente oferecido pela Roche. Todos os outros reagentes tinham grau de pureza "pro analysis" e foram adquiridos à Merck.

2.2 Material

As leituras da fluorescência e da quimiluminescência foram realizadas em leitor de microplacas (Synergy HT, BIO-TEK).

2.3 Avaliação da capacidade de captação do anião radical superóxido

2.3.1 Geração do anião radical superóxido

O $\text{O}_2^{\cdot-}$ foi gerado por via enzimática, pela conversão da HX em ácido úrico pela acção da enzima XO (Figura 4) (Borges *et al.*, 2002).

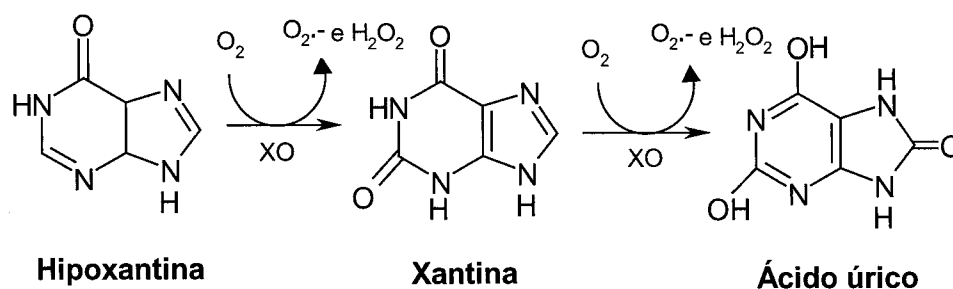


Figura 4 – Geração de O_2^- através da metabolização da HX e xantina pela enzima XO (adaptado de Borges *et al.*, 2002).

2.3.2 Fundamento do método

A quimiluminescência consiste na emissão de radiação luminosa electromagnética em consequência de uma reacção química (Ferreira e Rossi, 2002). A lucigenina (Figura 5) é um composto que participa em reacções quimiluminescentes, ou seja, um luminóforo. A emissão de quimiluminescência pela lucigenina tem sido referida pela literatura sobretudo como forma de detecção do O_2^- (Figura 5) (Li *et al.*, 1998; Schepetkin, 1999; Afanas'ev *et al.*, 2001 ; Okajima e Ohsaka, 2003 ; HyrsI *et al.*, 2004). Contudo, existem também referências da sua utilidade para detectar H_2O_2 (Rost *et al.*, 1998; Yeung *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2005). A emissão de luz pela lucigenina depende da sua oxidação, com a formação de um intermediário instável do tipo dioxetano e decomposição deste em metilacridona, que emite fotões quando relaxa para o seu estado fundamental (Figura 5) (Li *et al.*, 1998; Schepetkin, 1999; Afanas'ev *et al.*, 2001 ; Okajima e Ohsaka, 2003 ; HyrsI *et al.*, 2004).

A monitorização da luminescência resultante da oxidação da lucigenina pode ser utilizada como meio de estudar a capacidade de determinados compostos para captarem O_2^- ou H_2O_2 (Chang *et al.*, 2002; Jeng *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2004). Um composto que possua um efeito captador destas ERO vai competir com a lucigenina na sua reacção com as mesmas, originando assim uma diminuição da luminescência.

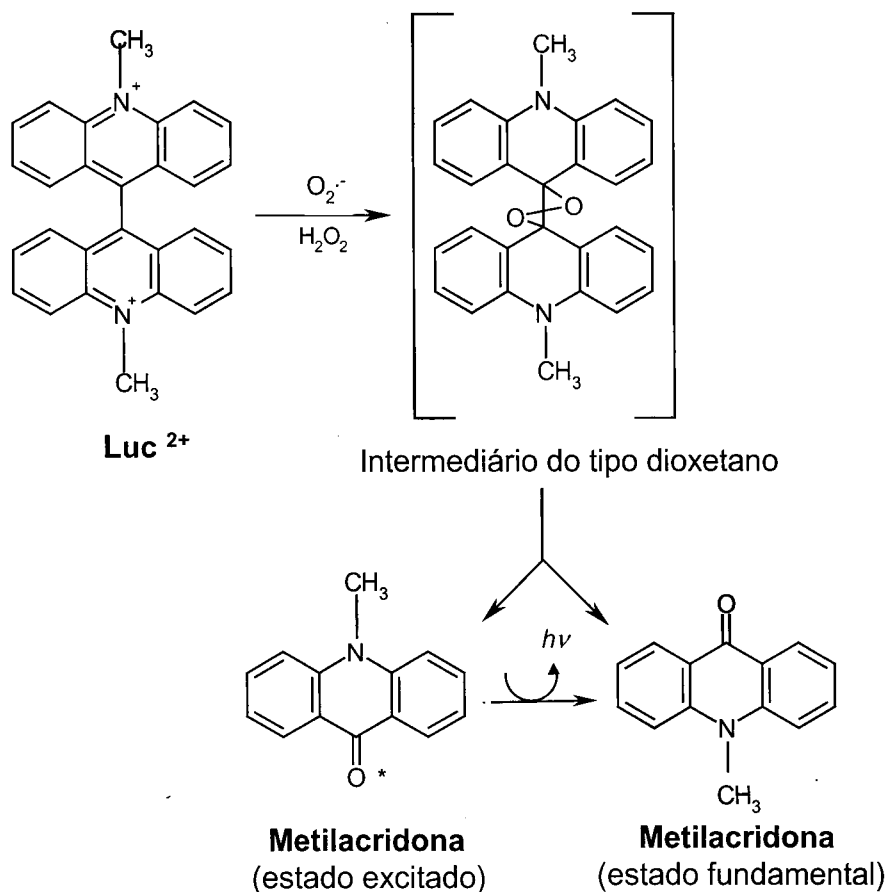


Figura 5 – Reacção entre a lucigenina e o O_2^- e H_2O_2 com a formação de metilacridona e emissão de luz (adaptado de Okajima e Ohsaka, 2003).

2.3.3 Ensaio

A avaliação da capacidade de captação do O_2^- foi realizada por quimiluminescência, monitorizando-se a oxidação da lucigenina pelo O_2^- de acordo com o descrito por Oosthuizen e Greyling (1999), com modificações. O O_2^- foi gerado pelo sistema HX/XO (Figura 4).

A mistura reaccional continha, num volume final de 250 μL , os seguintes constituintes nas concentrações finais indicadas: lucigenina (154 μM) dissolvida em solução tampão de Na_2CO_3 0,5 M a pH 10, os compostos em estudo, em diferentes concentrações, HX (0,4 mM) dissolvida em H_2O quente e XO (150 mU/mL) dissolvida em tampão fosfato (KH_2PO_4 10 mM a pH 8). As leituras da luminescência (L) foram efectuadas a 37 °C durante 5 min e os valores de luminescência lidos nos picos obtidos nessas cinéticas ($\cong 2 \frac{1}{2}$ min). O tiron foi

utilizado como controlo positivo. Cada estudo correspondeu a quatro ensaios realizados em triplicado. O efeito captador dos compostos foi expresso sob a forma de percentagem de inibição da oxidação da lucigenina induzida pelo $O_2^{\cdot-}$ (Equação 33).

Equação 33

$$\text{Efeito captador de } O_2^{\cdot-} (\%) = \frac{L_{\text{amostra}} - L_{\text{branco}}}{L_{\text{controlo}} - L_{\text{branco}}} \times 100 \%$$

Amostra – Ensaio na presença do composto em estudo.

Controlo - Ensaio na ausência do composto em estudo.

Branco – Ensaio na ausência do composto em estudo e agente oxidante.

Optimização das condições de ensaio

- **pH da solução tampão** - Oosthuizen e Greyling (1999) utilizaram na sua metodologia uma solução tampão fosfato a pH 8 para efectuar a diluição do luminóforo. Com a utilização desta solução tampão não foi detectado qualquer sinal de luminescência. Assim, decidiu-se realizar ensaios utilizando soluções tampão com pH mais elevado. Testou-se uma solução tampão Tris com pH 9 e uma solução tampão carbonato com pH 10, tendo-se, no final, optado por esta última por ser aquela que permitia obter um sinal de luminescência mais elevado. Este resultado está de acordo com um estudo de Oosthuizen *et al.* (1997) em que é referido o pH 10 como óptimo para a detecção de $O_2^{\cdot-}$ utilizando a lucigenina e o sistema gerador HX/XO.
- **Concentração de XO** - a concentração da XO foi também alterada em relação à metodologia original para o triplo do valor. Compararam-se os resultados dos perfis de luminescência, obtidos em cinéticas de 15 min, de controlos preparados com as

concentrações de 50, 100, 150 e 200 mU/mL de XO e verificou-se que a concentração de 150 mU/mL permitia obter picos bem definidos a um tempo de leitura vantajoso ($\cong 2 \frac{1}{2}$ min).

2.4 Avaliação da capacidade de captação do peróxido de hidrogénio

2.4.1 Preparação da solução de peróxido de hidrogénio

A solução de H₂O₂ a 2% (m/m) foi preparada diariamente por diluição de uma solução de H₂O₂ a 30%.

2.4.2 Fundamento do método

A avaliação da capacidade de captação do H₂O₂ foi realizada por quimiluminescência, utilizando-se a lucigenina como luminóforo, de acordo com o descrito em 2.3.2.

2.4.3 Ensaio

A avaliação da capacidade de captação do H₂O₂ foi realizada por quimiluminescência, monitorizando-se a oxidação da lucigenina pelo H₂O₂ de acordo com o descrito por Costa *et al.* (2005).

A mistura reaccional continha, num volume final de 250 μ L, os seguintes constituintes nas concentrações finais indicadas: lucigenina (1,6 mM), dissolvida em solução tampão Tris 50 mM a pH 7,4, os compostos a testar, em diferentes concentrações, dissolvidos em solução tampão ou DMSO e o H₂O₂ a 2 % (m/m). As leituras da luminescência (L) foram efectuadas a 37 °C após 10 min de incubação. O ácido ascórbico e a catalase foram utilizados como

controles positivos. Cada estudo correspondeu a quatro ensaios, efectuados em triplicado. O efeito captador dos compostos foi expresso sob a forma de percentagem de inibição da oxidação da lucigenina induzida pelo H₂O₂ (Equação 34).

Equação 34

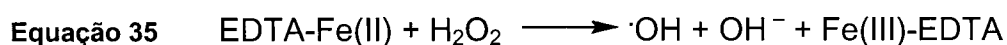
$$\text{Efeito captador de H}_2\text{O}_2 (\%) = \frac{L_{\text{amostra}} - L_{\text{branco}}}{L_{\text{controlo}} - L_{\text{branco}}} \times 100 \%$$

O efeito captador de H₂O₂ do atenolol, pindolol e carvedilol não pôde ser avaliado através desta metodologia porque se verificou que estes compostos originaram um aumento da luminescência de uma forma dependente das concentrações. Nenhum destes compostos apresentou interferência directa com a lucigenina. No entanto, todos eles provocaram um aumento do sinal, em relação ao controlo, após 10 min de incubação com o H₂O₂ seguida de adição da lucigenina. Isto levou a supor que pela reacção destes compostos com o H₂O₂ se geram produtos que reagem em maior extensão com a lucigenina do que o H₂O₂.

2.5 Avaliação da capacidade de captação do radical hidroxilo

2.5.1 Geração do radical hidroxilo

O ·OH foi gerado pelo sistema FeCl₂/EDTA/H₂O₂, segundo a Equação 35.



2.5.2 Fundamento do método

O luminol (Figura 6) é um composto que participa em reacções quimiluminescentes, ou seja, um luminóforo. A emissão de luz pelo luminol depende da sua oxidação e da formação de uma espécie electronicamente excitada que culmina no aparecimento do di-anião 3-aminofталato como produto final (Figura 6) (Rost *et al.*, 1998; Ferreira e Rossi, 2002).

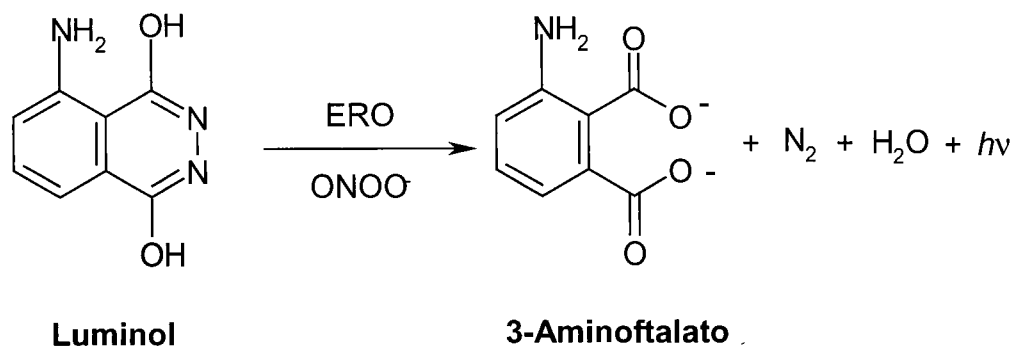


Figura 6 – Reacção de oxidação do luminol com a formação do di-anião 3-aminofталato e emissão de luz (adaptado de Rost *et al.*, 1998).

O luminol pode ser oxidado por várias ERO (Caldefie-Chézet *et al.*, 2002) como é o caso do $\cdot\text{OH}$ (Oosthuizen e Greyling, 2001), do $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Kopprasch *et al.*, 2003), do $^1\text{O}_2$ (Oosthuizen *et al.*, 1997; Myhre *et al.*, 2003), do H_2O_2 (Rost *et al.*, 1998; Kopprasch *et al.*, 2003) e do HOCl, bem como pelo ONOO^- (Yildiz *et al.*, 1998). A monitorização da luminescência resultante da reacção do luminol com cada uma das espécies reactivas atrás referidas pode ser utilizada como meio de estudar a potencial capacidade de determinados compostos para captarem as mesmas (Cynshi *et al.*, 1990; Mira *et al.*, 1994; Demiryürek *et al.*, 1998; Rao *et al.*, 1998), já que estes compostos, ao captarem uma determinada espécie reactiva, vão competir com o luminol na sua reacção com estas originando assim uma diminuição da luminescência.

2.5.3 Ensaio

A avaliação da capacidade de captação do $\cdot\text{OH}$ foi realizada por quimiluminescência, através da monitorização da oxidação do luminol pelo $\cdot\text{OH}$, de acordo com o descrito por Oosthuizen e Greyling (2001).

Diariamente era preparada uma solução com 1,75 mg/mL de luminol em NaOH 0,05 M. As diluições do luminol foram efectuadas com solução tampão Na_2CO_3 0,5 M a pH 10. A mistura reaccional, continha, num volume final de 250 μL , os seguintes constituintes nas concentrações finais indicadas: luminol (20 μM), os compostos a testar, em diferentes concentrações, FeCl_2 em EDTA (25 μM e 100 μM) e H_2O_2 (3,5 mM). As leituras da luminescência (L) foram efectuadas a 37 °C, após um período de incubação de 5 min. A melatonina e o DMSO foram utilizados como controlos positivos. A adição de 50 μL de DMSO na mistura reaccional reduziu o sinal de luminescência até ao valor do branco. Cada estudo correspondeu a quatro ensaios, efectuados em triplicado. O efeito captador dos compostos foi expresso sob a forma de percentagem de inibição da oxidação do luminol induzida pelo $\cdot\text{OH}$ (Equação 36).

Equação 36

$$\text{Efeito captador de } \cdot\text{OH} (\%) = \frac{L_{\text{amostra}} - L_{\text{branco}}}{L_{\text{controlo}} - L_{\text{branco}}} \times 100 \%$$

Como alguns dos compostos que se pretendia testar são insolúveis em solução tampão e como não era possível utilizar o DMSO como solvente dado o seu efeito captador de $\cdot\text{OH}$, foram testados outros solventes. Testou-se o etanol, o metanol e o HCl (0,1 M) e verificou-se que apenas este último não possuía efeito captador de $\cdot\text{OH}$, tendo sido, por este motivo, o escolhido. A dissolução do carvedilol com este solvente não foi possível, devido a esse facto este composto não foi testado.

2.6 Avaliação da capacidade de captação do ácido hipocloroso

2.6.1 Obtenção do ácido hipocloroso

O HOCl foi obtido diariamente por ajuste do pH de uma solução de NaOCl 1% (v/v) ao valor de 6,2 com H₂SO₄ diluído. A concentração de HOCl era, de seguida, determinada espectrofotometricamente a 235 nm ($\epsilon=100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Aruoma, 1997).

2.6.2 Fundamento do método

A avaliação da captação do HOCl foi realizada por quimiluminescência, utilizando-se o luminol como luminóforo, de acordo com o descrito em 2.5.2 (Figura 6).

2.6.3 Ensaio

A avaliação da capacidade de captação do HOCl foi realizada por quimiluminescência, monitorizando-se a oxidação do luminol pelo HOCl de acordo com o descrito por Demiryürek *et al.* (1998) com modificações.

A mistura reaccional continha, num volume final de 250 μL , os seguintes reagentes nas concentrações finais indicadas: luminol (250 μM) dissolvido em solução tampão Na₂HPO₄ 50 mM, a pH 12, os compostos a testar, em diferentes concentrações, dissolvidos na mesma solução tampão ou em etanol e HOCl (25 μM). As leituras da luminescência (L) foram realizadas imediatamente após a adição do HOCl. O ácido lipóico foi utilizado como controlo positivo. Cada estudo correspondeu a quatro ensaios realizados em triplicado. O efeito captador dos compostos foi expresso sob a forma de

percentagem de inibição da oxidação do luminol induzida pelo HOCl (Equação 37).

Equação 37

$$\text{Efeito captador de HOCl (\%)} = \frac{L_{\text{amostra}} - L_{\text{branco}}}{L_{\text{controlo}} - L_{\text{branco}}} \times 100 \%$$

Optimização das condições de ensaio

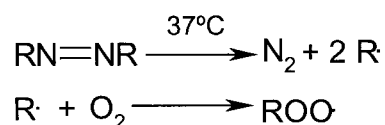
- **pH da solução tampão** – inicialmente utilizou-se uma solução tampão de pH 7,4. Contudo, nestas condições, a reacção ocorria com extrema rapidez, não sendo possível a detecção do sinal. Testaram-se soluções tampão com valores de pH diferentes: pH 10 mas igualmente sem sucesso pelo mesmo motivo. Apenas a utilização de um tampão com o pH 12 permitiu reduzir a velocidade da reacção de forma a ser possível a sua detecção.

2.7 Avaliação da capacidade de captação do radical peroxilo

2.7.1 Geração do radical peroxilo

Os ROO \cdot foram gerados por termodecomposição do AAPH, à temperatura de 37 °C, da qual resultam R \cdot que por sua vez reagem com o O $_2$, originando ROO \cdot (Equação 38).

Equação 38



2.7.2 Fundamento do método

A capacidade para a captação de $\text{ROO}\cdot$, tem sido referida como “Capacidade de absorção de radicais de oxigénio” (ORAC) (Cao *et al.*, 1993). O ensaio ORAC consiste na monitorização da oxidação de uma sonda fluorescente pelo $\text{ROO}\cdot$, traduzida pela diminuição da intensidade da sua fluorescência. A inibição dessa oxidação por uma substância antioxidante é, no ensaio ORAC, uma medida da capacidade antioxidante dessa substância perante o radical. A particularidade do ensaio ORAC é que a reacção entre a sonda e o radical é levada até ao fim, ou seja até à completa inibição da fluorescência, sendo a quantificação da inibição conseguida pelo cálculo da área sob a curva (AUC) da reacção. Este cálculo permite combinar o tempo e o grau de inibição dos radicais pelo antioxidante num só valor (Huang *et al.*, 2002).

A fluoresceína é uma molécula fluorescente que tem vindo a ser utilizada neste tipo de metodologias. A sua fluorescência diminui após oxidação por espécies reactivas, nomeadamente pelo $\text{ROO}\cdot$ (Huang *et al.*, 2002) (Figura 7).

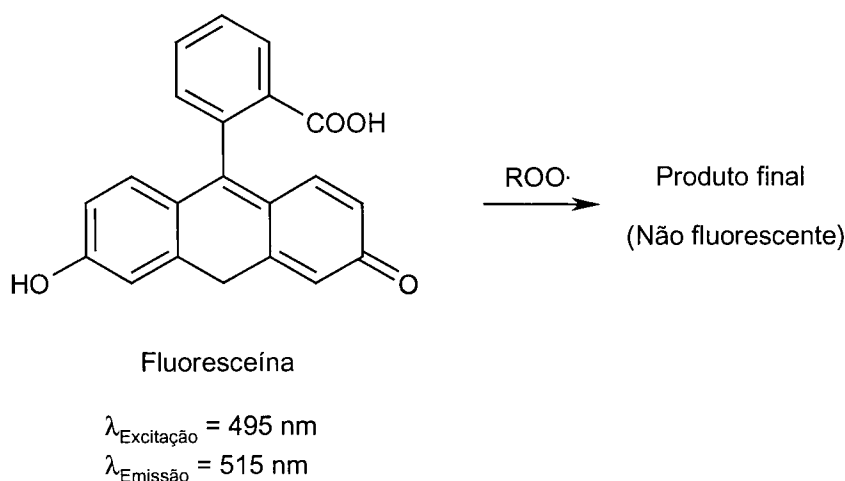


Figura 7 – Oxidação da fluoresceína pelo $\text{ROO}\cdot$ com a formação de um produto não fluorescente.

2.7.3 Ensaio

A avaliação da capacidade de captação do ROO[·] foi realizada por fluorimetria, monitorizando-se a oxidação da fluoresceína pelo ROO[·], de acordo com o descrito por Fernandes *et al.* (2004).

A mistura reaccional continha, num volume final de 200 µL, os seguintes reagentes, dissolvidos em tampão KH₂PO₄ 75 mM a pH 7,4, nas concentrações finais indicadas: fluoresceína (61 nM), os compostos em estudo, em diferentes concentrações, e AAPH (19 mM). O AAPH era o último reagente a ser introduzido na mistura reaccional, após um período de incubação de 3 min a 37°C com agitação. O trolox foi utilizado como composto de referência. As leituras da fluorescência foram efectuadas nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 485±20 nm e 528±20 nm, respectivamente, sob a forma de cinéticas, com intervalos de 1 min, até que o valor da fluorescência fosse menor ou igual a 0,5% da fluorescência inicial. Cada estudo correspondeu a quatro ensaios, efectuados em triplicado.

O valor ORAC relativo a equivalentes de trolox foi calculado utilizando a seguinte equação (Huang *et al.*, 2002):

$$\text{Equação 39} \quad \text{Valor de ORAC relativo} = [(AUC_{\text{amostra}} - AUC_{\text{branco}}) / (AUC_{\text{trolox}} - AUC_{\text{branco}})] \times (\text{molaridade do trolox} / \text{molaridade do composto})$$

A representação gráfica dos valores ORAC em função das concentrações permite obter, para cada composto, uma recta cujo declive corresponde à actividade ORAC_{ROO·} desse mesmo composto, ou seja, à sua capacidade de captação do ROO[·].

2.8 Avaliação da capacidade de captação do anião peroxinitrito

2.8.1 Síntese do anião peroxinitrito

O ONOO^- foi sintetizado pela adição de uma solução de 15 mL de NaNO_2 (0,66 M) a uma solução de 15 mL de H_2O_2 (0,6 M) em HCl (0,7 M), soluções estas que foram preparadas no momento, arrefecidas à temperatura de $-4\text{ }^\circ\text{C}$ e colocadas em seringas separadas. A reacção ocorreu por injeção simultânea dos conteúdos das duas seringas, através de uma junção em forma de Y. O ONOO^- foi recolhido num recipiente, colocado no gelo, que continha NaOH (3 M) sob agitação. Foi adicionado peróxido de manganês à solução para remover o excesso de H_2O_2 . A solução foi filtrada e a concentração do ONOO^- foi determinada espectrofotometricamente em NaOH 0,05 M ($\epsilon_{302}=1670\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) (Beckman *et al.*, 1994). Esta solução foi conservada em atmosfera de azoto, ao abrigo da luz e a $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Antes de cada ensaio a concentração da solução de ONOO^- era novamente determinada.

2.8.2 Fundamento do método

A DHR é uma molécula não fluorescente que por oxidação origina um produto fluorescente, a rodamina 123 (RH) (Kooy *et al.*, 1994) (Figura 8). Kooy *et al.* (1994), desenvolveram uma metodologia com detecção fluorimétrica, que permite detectar o ONOO^- através da monitorização da oxidação da DHR mediada por esta espécie reactiva.

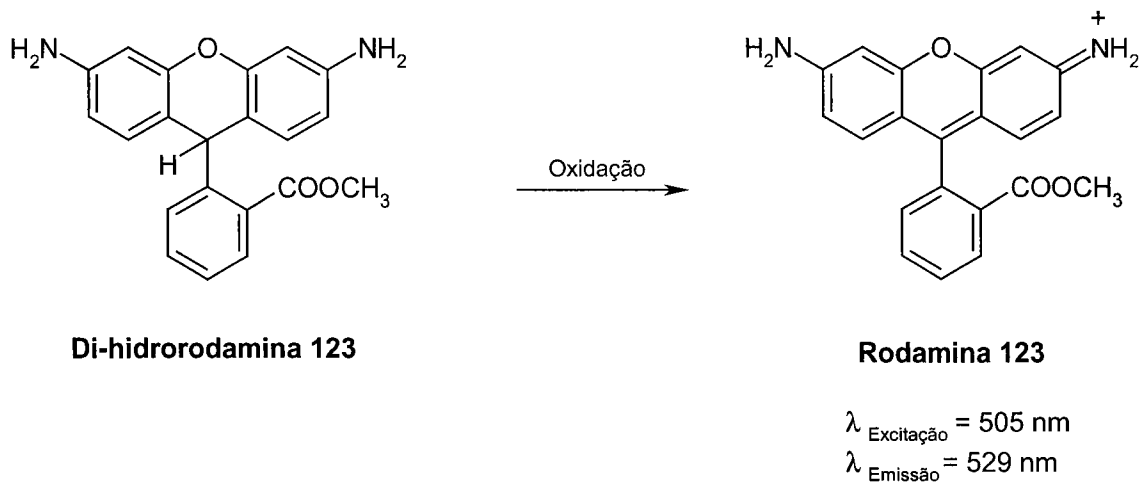


Figura 8 – Oxidação da DHR a RH por reacção com o ONOO^- (adaptado de Crow, 1997).

Kooy *et al.* (1994) propuseram um mecanismo para esta reacção (Figura 9). A DHR transfere um electrão para o ONOO^- originando o radical $\text{DHR}^{\cdot-}$ que, por sua vez, sofre dismutação originando RH e DHR. Por outro lado, o $\text{DHR}^{\cdot-}$ pode, em ambiente aeróbio, reduzir o oxigénio molecular formando-se $\text{O}_2^{\cdot-}$ e RH. No entanto esta reacção ocorre lentamente em relação à dismutação do $\text{DHR}^{\cdot-}$, contribuindo assim em pequena escala para a fluorescência total na ausência da SOD (Kooy *et al.*, 1994).

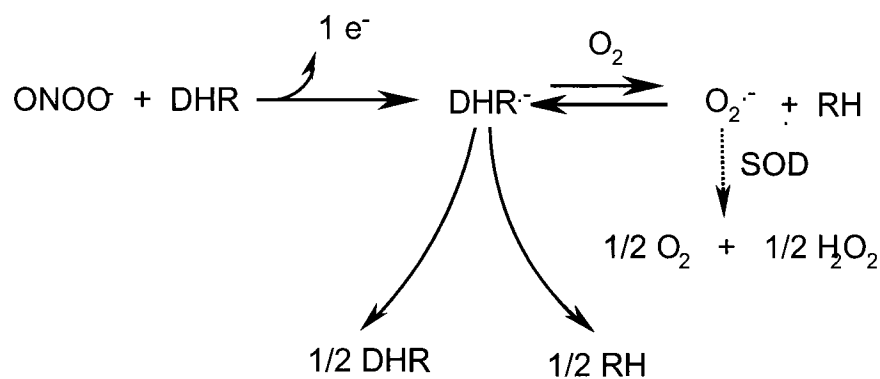


Figura 9 – Mecanismo proposto para a oxidação da DHR a RH mediada pelo ONOO^- (adaptado de Kooy *et al.*, 1994).

No entanto, o mecanismo exacto da oxidação da DHR pelo ONOO^- constitui ainda assunto de debate. Jourd'heuil *et al.* (2001) propuseram que esta reacção ocorria via intermediários radicalares ($\cdot\text{OH}$ e $\cdot\text{NO}_2$) formados durante a decomposição espontânea do ONOO^- e excluíram a possibilidade de uma reacção directa entre a DHR e o ONOO^- .

Segundo Glebska e Koppenol (2003) a reacção entre o ONOO^- e a DHR é de ordem zero no que diz respeito à sonda, ou seja, a taxa de oxidação da DHR pelo ONOO^- é independente da concentração daquela, o que significa que não há reacção directa entre o ONOO^- e a DHR. Contudo, na opinião destes autores, a oxidação da DHR por intermediários formados durante a decomposição do HONOO também não é provável porque nesse caso seria de esperar uma maior eficiência na oxidação a valores de pH mais baixos e não mais altos, tal como foi observado por estes investigadores. Baseados nestas descobertas, Glebska e Koppenol (2003) propuseram um possível mecanismo semelhante ao da Figura 10. Segundo estes autores, a reacção entre o ONOO^- e a DHR pode proceder-se via protonação de um aducto formado entre o ONOO^- e a sonda, seguida de uma oxidação da mesma (Glebska e Koppenol, 2003).

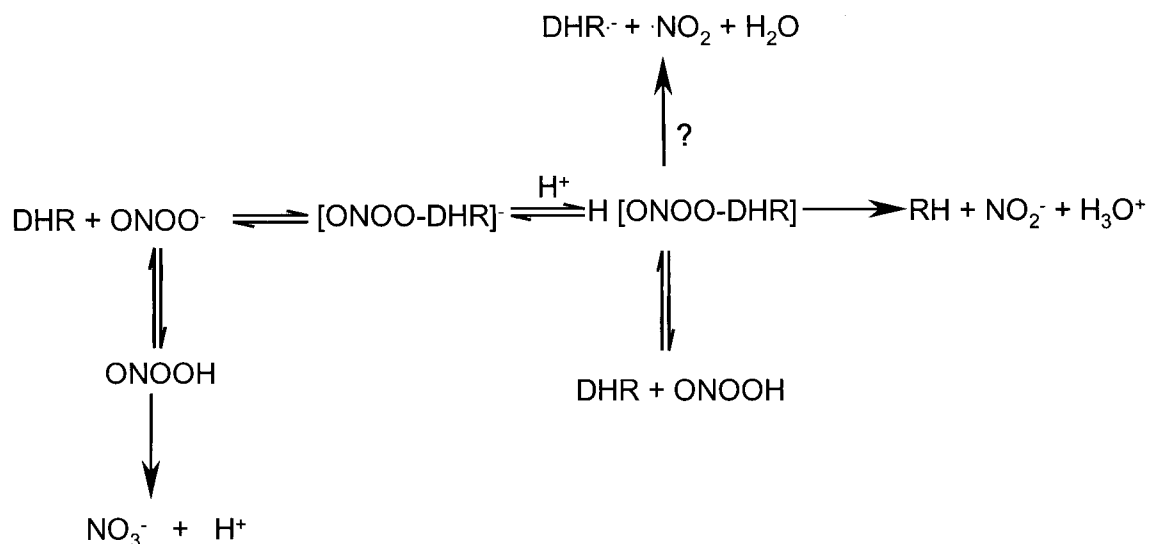


Figura 10 – Mecanismo proposto para a oxidação da DHR mediada pelo ONOO^- (adaptado de Glebska e Koppenol, 2003).

A monitorização da fluorescência da RH pode ser utilizada como meio de estudar a potencial capacidade de determinados compostos para captarem o

ONOO⁻ (Bailly *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2002; Zou *et al.*, 2002; Fernandes *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2004; Santos e Mira, 2004). Um composto que possua um efeito captador do ONOO⁻ vai competir com a DHR na sua reacção com este, provocando assim uma diminuição da quantidade de RH formada e, conseqüentemente, da fluorescência.

2.8.3 Ensaio

A avaliação da capacidade de captação do ONOO⁻ foi realizada por fluorimetria, monitorizando-se a oxidação da DHR a RH pelo ONOO⁻, de acordo com o descrito por Fernandes *et al.* (2003, 2004), com modificações.

Uma solução "stock" de 2,89 mM de DHR em dimetilformamida foi conservada em atmosfera de azoto a -20 °C. As diluições de DHR a partir da solução "stock" foram preparadas com solução tampão [NaCl 90 mM, KCl 5 mM e Na₃PO₄ 50 mM, a pH 7,4] contendo ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) 100 µM, imediatamente antes de cada ensaio e colocadas no gelo e ao abrigo da luz.

A mistura reaccional continha, num volume final de 300 µL, os seguintes constituintes nas concentrações finais indicadas: DHR (5 µM), os compostos a testar (dissolvidos em solução tampão ou DMSO) em diferentes concentrações e ONOO⁻ (600 nM) dissolvido em NaOH (0,05 M). As leituras da intensidade de fluorescência (F) foram realizadas nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 485±20 nm e 528±20 nm respectivamente, após um período de incubação de 5 min a 37 °C. O ebselen foi utilizado como controlo positivo. Cada estudo correspondeu a quatro ensaios, efectuados em triplicado. O efeito captador dos compostos foi expresso sob a forma de percentagem de inibição da oxidação da DHR induzida pelo ONOO⁻ (Equação 40).

Equação 40

$$\text{Efeito captador de ONOO}^- (\%) = \frac{F_{\text{amostra}} - F_{\text{branco}}}{F_{\text{controlo}} - F_{\text{branco}}} \times 100 \%$$

O ensaio acima descrito foi também efectuado na presença de NaHCO_3 25 mM.

Foi efectuado um ensaio para estudar possíveis interferências no sinal de fluorescência resultantes da reactividade entre os antagonistas β -adrenérgicos e o ONOO^- . Neste ensaio incubou-se cada um dos compostos, na sua concentração mais elevada, com o agente oxidante na ausência da DHR. Verificou-se que o timolol era o único composto a apresentar interferência no sinal de fluorescência, provocando um aumento da fluorescência, em relação ao ensaio em branco (sem ONOO^-), na presença do agente oxidante. Verificou-se num estudo posterior que esse aumento da fluorescência era dependente da concentração do composto.

Também foi estudada a reactividade directa entre os antagonistas β -adrenérgicos e a DHR. Neste caso incubou-se cada um dos compostos com a DHR, na ausência do ONOO^- . O labetalol foi o único composto a apresentar interferência, originando um aumento de fluorescência, dependente da concentração, por reacção com a DHR.

Foi ainda efectuado um ensaio para estudar o possível efeito "quenching" da fluorescência por parte dos antagonistas β -adrenérgicos. Incubou-se a DHR com o ONOO^- e de seguida adicionou-se cada um dos compostos para verificar se havia diminuição da fluorescência. Observou-se que nenhum dos compostos diminuía a intensidade do sinal de fluorescência.

Optimização das condições de ensaio

- **pH da mistura reaccional** - verificou-se que o pH da mistura reaccional, quando o ONOO⁻ era diluído em NaOH 0,1 M, se situava acima do intervalo ideal para a reacção em estudo (4,2 – 8,3) (Kooy *et al.*, 1994). Por este motivo, optou-se pela utilização de NaOH 0,05 M, pois neste caso, o valor de pH da mistura reaccional correspondia a 7,6, ou seja, encontrava-se no intervalo ideal.
- **Concentração de DHR** - estudaram-se diferentes concentrações de DHR no sentido de verificar se a intensidade do sinal de fluorescência se mantinha com concentrações inferiores a 50 µM. Verificou-se que com uma concentração de DHR de 5 µM a intensidade do sinal de fluorescência se mantinha igual ao de DHR 50 µM, o que levou a optar-se pela concentração final de 5 µM.

2.9 Avaliação da capacidade de captação do óxido nítrico

2.9.1 Geração do óxido nítrico

O NO foi gerado a partir de uma solução de NOC-5, que liberta dois equivalentes de NO espontaneamente, em condições fisiológicas, sem necessidade de um co-factor (Nagata *et al.*, 1999).

2.9.2 Fundamento do método

A reacção entre a DAF-2, uma molécula praticamente não fluorescente, e o NO, na presença do O₂, resulta na formação de um produto de elevada

fluorescência, a triazolofluoresceína (DAF-2T) (Figura 11) (Kojima *et al.*, 1998). A fluorescência resultante da DAF-2T aumenta com a concentração de $\cdot\text{NO}$ (Kojima *et al.*, 1998; Nagata *et al.*, 1999). O mecanismo proposto para a reacção do $\cdot\text{NO}$, na presença de O_2 , com a DAF-2 está descrito na (Figura 12).

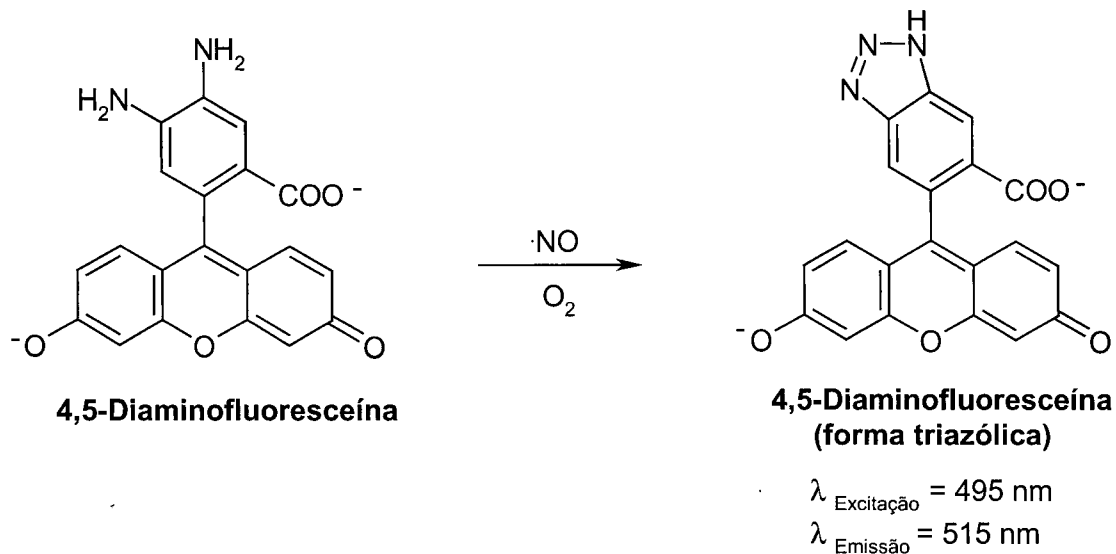


Figura 11 - Oxidação da DAF-2 a DAF-2T por reacção com o $\cdot\text{NO}$ na presença do O_2 (adaptado de Kojima *et al.*, 1998).

A monitorização da fluorescência da DAF-2T pode ser utilizada como meio de estudar a potencial capacidade de determinados compostos para captarem o $\cdot\text{NO}$ (Nagata *et al.*, 1999; Yoshioka *et al.*, 2000; Fernandes *et al.*, 2003, 2004, 2005). Um composto que possua um efeito captador do $\cdot\text{NO}$ vai competir com a DAF-2 na sua reacção com este, provocando assim uma diminuição da quantidade de DAF-2T formada e, conseqüentemente, da fluorescência.

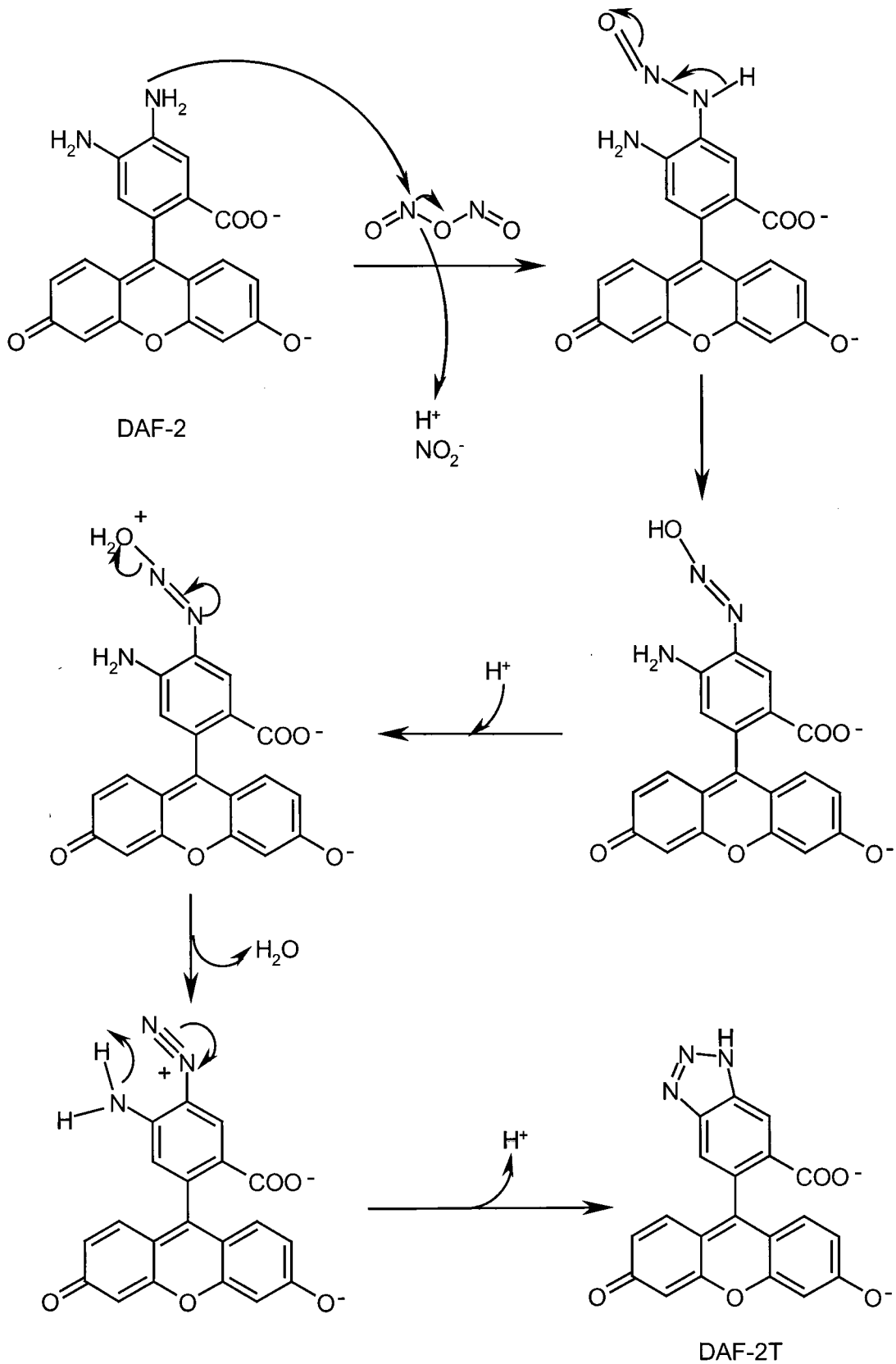


Figura 12 – Mecanismo proposto para a oxidação da DAF-2 a DAF-2T por reacção com o $\cdot\text{NO}$ na presença do O_2 (adaptado de Nakatsubo *et al.*, 1998).

2.9.3 Ensaio

A avaliação da capacidade de captação do $\cdot\text{NO}$ foi realizada por fluorimetria, monitorizando-se a oxidação da DAF-2 a DAF-2T pelo $\cdot\text{NO}$ de acordo com o descrito por Nagata *et al.* (1999), com modificações.

Uma solução "stock" de 2,76 mM de DAF-2 em DMSO foi conservada em corrente de azoto e a -20°C . As diluições de DAF-2, a partir da solução "stock", foram preparadas com solução tampão [NaH_2PO_4 1,3 mM, KCl 5,4 mM, glucose 5,6 mM, NaHCO_3 24 mM, NaCl 120 mM, MgCl_2 1mM e CaCl_2 2mM] de pH 7,4 imediatamente antes de cada ensaio e colocadas no gelo e ao abrigo da luz.

A mistura reaccional continha, num volume final de 300 μL , os seguintes constituintes nas concentrações finais indicadas: DAF-2 (5 μM), os compostos a testar (dissolvidos em DMSO ou solução tampão) em diferentes concentrações e NOC-5 (10 μM). As leituras de fluorescência (F) foram realizadas nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 485 ± 20 nm e 528 ± 20 nm, respectivamente, após um período de incubação de 30 min à temperatura de 37°C . A rotina foi utilizada como controlo positivo. Cada estudo correspondeu a quatro ensaios, efectuados em triplicado. O efeito captador dos compostos foi expresso sob a forma de percentagem de inibição da oxidação da DAF-2 induzida pelo $\cdot\text{NO}$ (Equação 41).

Equação 41

$$\text{Efeito captador de } \cdot\text{NO} (\%) = \frac{F_{\text{amostra}} - F_{\text{branco}}}{F_{\text{controlo}} - F_{\text{branco}}} \times 100 \%$$

Tal como se fez no estudo da avaliação da capacidade de captação do ONOO^- (2.8.3), foram estudadas possíveis interferências no sinal de fluorescência resultantes da reactividade entre os antagonistas β -adrenérgicos e o agente oxidante ($\cdot\text{NO}$) e a reactividade directa entre os compostos em estudo e a sonda (DAF-2). Apenas o timolol apresentou interferência com o sinal de fluorescência por reacção com o agente oxidante, originando valores de fluorescência acima do valor dos ensaios em branco. Nenhum dos

compostos apresentou interferência no sinal de fluorescência por reacção com a DAF-2.

Foi também pesquisado o efeito “quenching” do sinal de fluorescência por parte dos compostos. Nenhum deles apresentou o referido efeito, no entanto, durante este estudo observou-se um marcado aumento da fluorescência do controlo imediatamente após a adição do labetalol. Este facto poderá significar que este composto promove um aumento da libertação de NO pelo NOC-5.

Optimização das condições do ensaio

- **Influência da luz na libertação do NO pelo NOC-5** - realizaram-se dois ensaios durante 30 min, um exposto à luz e outro ao abrigo da luz. Foram de seguida efectuadas leituras da fluorescência, tendo-se obtido resultados semelhantes para os dois casos, o que levou a concluir que as condições de intensidade luminosa não influenciam a libertação do NO pelo NOC-5.
- **Influência da temperatura na reacção** - realizaram-se dois ensaios, um a 20 °C e outro a 37 °C. Verificou-se que a intensidade da fluorescência, ao fim de 30 min, era consideravelmente mais baixa no ensaio realizado a 20 °C. Decidiu-se, por isso, realizar todos os ensaios à temperatura de 37 °C.
- **Concentração de NOC-5** – realizaram-se ensaios com diferentes concentrações de NOC-5 (0,1; 1; 10; 15; 20 e 25 µM), com DAF-2 a 10 µM, e verificou-se que a intensidade do sinal de fluorescência era muito baixa quando as concentrações de NOC-5 eram de 0,1 e 1 µM e bastante mais elevada com 10 µM de NOC-5. O aumento das concentrações de NOC-5, para além deste valor, não trouxe alterações em relação à intensidade do sinal de fluorescência.

- **Concentração de DAF-2** - testaram-se também concentrações de DAF-2 inferiores a 10 μM (0,62; 1,25; 2,5 e 5 μM) e verificou-se que baixando a concentração de DAF-2 para 5 μM , e com as condições de ensaio anteriormente definidas, a intensidade do sinal de fluorescência se mantinha com um valor muito elevado relativamente ao ensaio em branco, pelo que foi escolhida a concentração de 5 μM .

3 RESULTADOS

3.1 Captação do anião radical superóxido

Nenhum dos antagonistas β -adrenérgicos estudados apresentou efeito captador de $O_2^{\cdot-}$. O timolol apresentou um pequeno efeito, cerca de 25% na concentração máxima estudada (5000 μ M). O tiron foi utilizado como controlo positivo, apresentando um valor de IC_{50} de $3,7 \pm 0,7 \mu$ M.

3.2 Captação do peróxido de hidrogénio

Dos antagonistas β -adrenérgicos estudados, apresentaram efeito captador de H_2O_2 o timolol e o labetalol. O labetalol apresentou um efeito máximo, correspondente à concentração de 5000 μ M, de cerca de 35% (Figura 13). O timolol apresentou um efeito que rondou os 90% (Figura 13) na concentração máxima estudada, tendo-se obtido para este composto um valor de IC_{50} de $1642 \pm 145 \mu$ M. O ácido ascórbico foi utilizado como controlo positivo nesta metodologia devido à sua actividade captadora de H_2O_2 . O seu valor de IC_{50} situou-se nos $863 \pm 79 \mu$ M. Como já foi referido (2.4.3) o atenolol, o carvedilol e o pindolol provocaram um aumento da luminescência, relativamente ao controlo, dependente da concentração. Foi demonstrado que este efeito não dependia de uma reacção dos compostos com a lucigenina. Os compostos em questão apresentaram o referido efeito apenas na presença do H_2O_2 , levando a supor que os mesmos reagem com o H_2O_2 originando, possivelmente, produtos que oxidam mais eficazmente a lucigenina, provocando assim o aumento do sinal de luminescência.

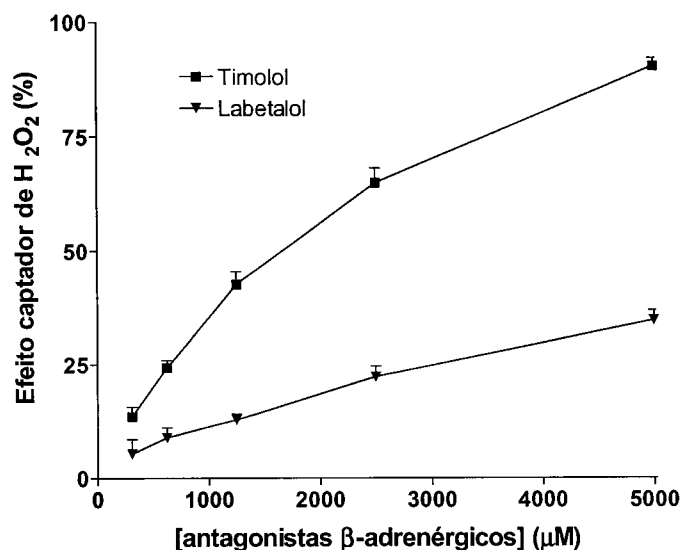


Figura 13 - Efeito captador de H₂O₂ (%) do labetalol e timolol (312-5000 μM). Cada ponto representa valores obtidos em quatro ensaios, efectuados em triplicado (média ± erro padrão).

3.3 Captação do radical hidroxilo

Dos antagonistas β-adrenérgicos testados por esta metodologia, todos apresentaram efeito captador de ·OH (Figura 14). Como se pode verificar pela análise da Tabela 2, há uma grande variação entre os valores de IC₅₀ dos diferentes compostos. A ordem da potência captadora dos compostos foi a seguinte: labetalol > pindolol > propranolol > sotalol > timolol > atenolol > metoprolol. O labetalol apresentou um IC₅₀ inferior ao da melatonina.

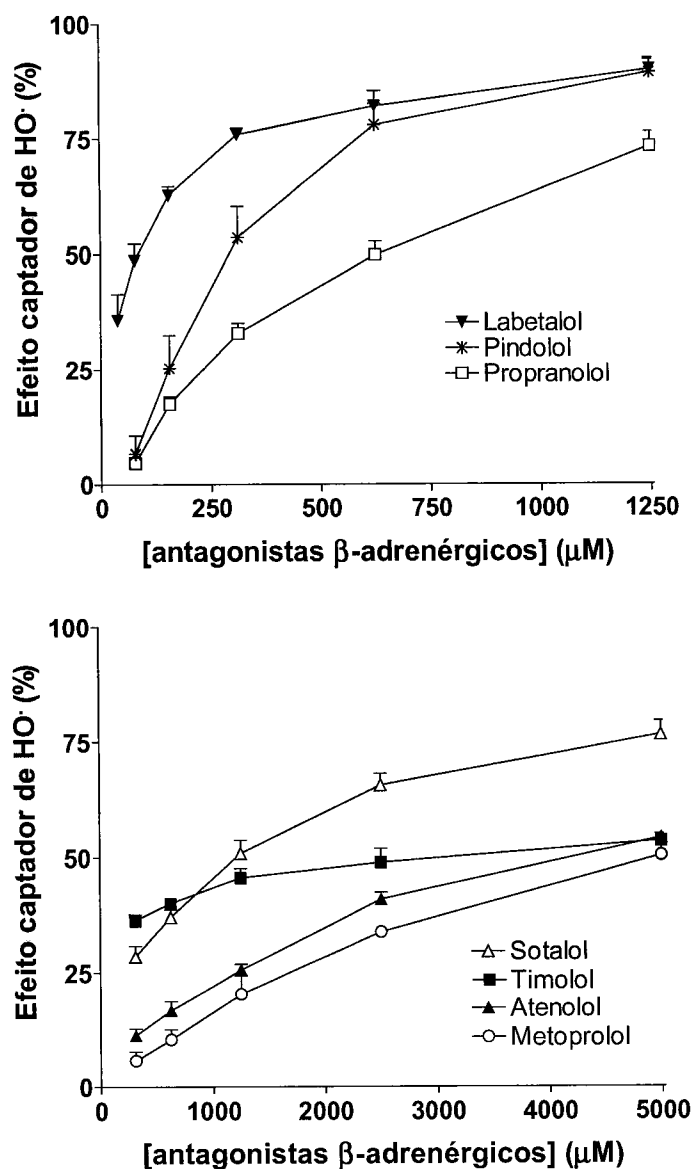


Figura 14 - Efeito captador de $\cdot\text{OH}$ (%) do labetalol (39-625 μM), pindolol (62-500 μM), propranolol (156-5000 μM), sotalol, timolol, atenolol e metoprolol (312-5000 μM). Cada ponto representa valores obtidos em quatro ensaios, efectuados em triplicado (média \pm erro padrão).

Compostos testados	IC ₅₀ (μM)
Atenolol	4118 ± 36
Labetalol	94 ± 15
Metoprolol	> 5000
Pindolol	313 ± 48
Propranolol	649 ± 68
Sotalol	1287 ± 140
Timolol	3140 ± 851
Melatonina	153 ± 32

Tabela 2 - Valores de IC_{50s} para a actividade captadora de ·OH do atenolol, labetalol, metoprolol, pindolol, propranolol, sotalol, timolol e da melatonina. Os valores correspondem à média ± erro padrão dos resultados obtidos em quatro ensaios, efectuados em triplicado.

3.4 Captação do ácido hipocloroso

Todos os antagonistas β-adrenérgicos estudados apresentaram efeito captador de HOCl dependente da concentração (Figura 15). O metoprolol e o propranolol foram os compostos que apresentaram maior efeito captador, com valores de IC₅₀ semelhantes (Tabela 2). O carvedilol foi o composto que apresentou menor efeito captador. A ordem da potência captadora dos compostos foi a seguinte: metoprolol > propranolol > atenolol > sotalol > labetalol > timolol > carvedilol.

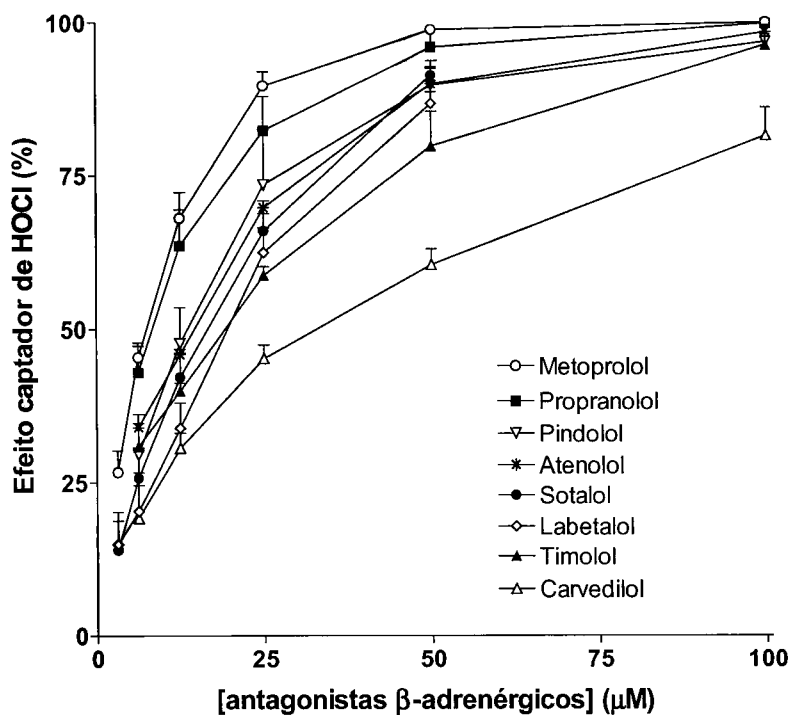


Figura 15 - Efeito captador de HOCl (%) do labetalol, sotalol (3-50 μM), timolol, atenolol, propranolol, pindolol e carvedilol (6-100 μM) e do metoprolol (3-100 μM). Cada ponto representa valores obtidos em quatro ensaios, efectuados em triplicado (média \pm erro padrão).

Compostos testados	IC ₅₀ (μM)
Atenolol	14,5 \pm 0,4
Carvedilol	32,8 \pm 3,7
Labetalol	19,6 \pm 1,8
Metoprolol	7,3 \pm 0,9
Pindolol	15,2 \pm 3,1
Propranolol	9,0 \pm 2,0
Sotalol	15,7 \pm 1,8
Timolol	20,1 \pm 1,4
Ácido lipóico	6,0 \pm 0,5

Tabela 3 - Valores de IC_{50s} (média \pm erro padrão) correspondentes ao efeito captador de HOCl do atenolol, carvedilol, labetalol, metoprolol, pindolol, propranolol, timolol, sotalol e do ácido lipóico. Os valores correspondem aos resultados obtidos em quatro ensaios, efectuados em triplicado.

3.5 Captação do radical peróxido

Dos antagonistas β -adrenérgicos estudados no ensaio ORAC, o pindolol e o propranolol foram os únicos compostos que, de uma forma dependente da concentração, atrasaram o decréscimo do sinal fluorescente da fluoresceína, provocado por oxidação por acção do ROO^\cdot , relativamente ao controlo, apresentando-se na Figura 16 o exemplo do pindolol. Isto significa que estes dois compostos possuem efeito captador de ROO^\cdot , como se pode verificar na Figura 17. Pela análise da Tabela 4, verifica-se que o pindolol e o propranolol possuem uma actividade captadora de ROO^\cdot relativamente ao trolox ($\text{ORAC}_{\text{ROO}^\cdot}$) de cerca de $0,62 \pm 0,05$ e $0,35 \pm 0,03$, respectivamente. Daqui se conclui que a actividade do pindolol é superior à do propranolol e que nenhum dos compostos possui uma actividade superior à do trolox, o composto utilizado como padrão neste ensaio.

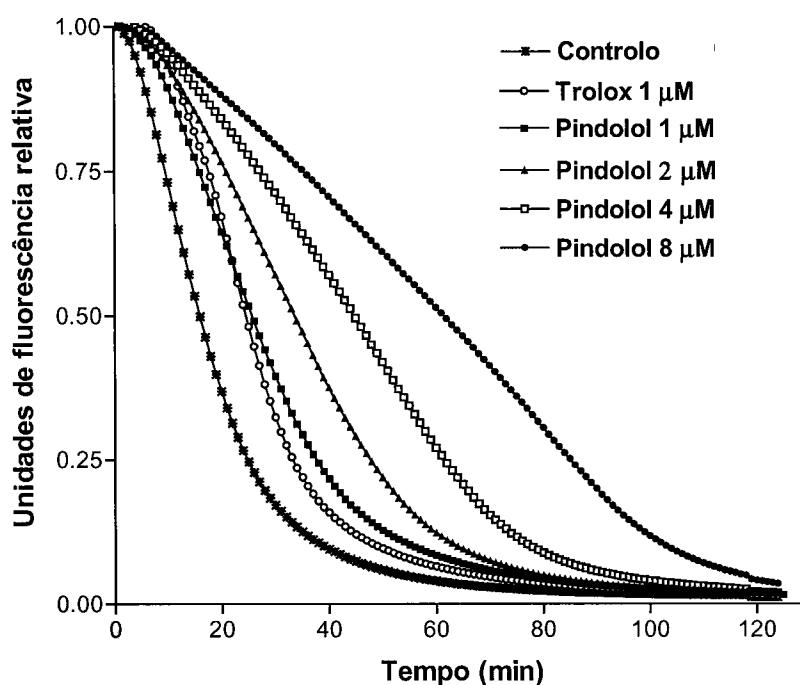


Figura 16 – Evolução ao longo do tempo do sinal de fluorescência resultante da oxidação da fluoresceína pelo ROO^\cdot na ausência de qualquer composto captador (controlo) e na presença do trolox (1 μM) e do pindolol (1, 2, 4 e 8 μM).

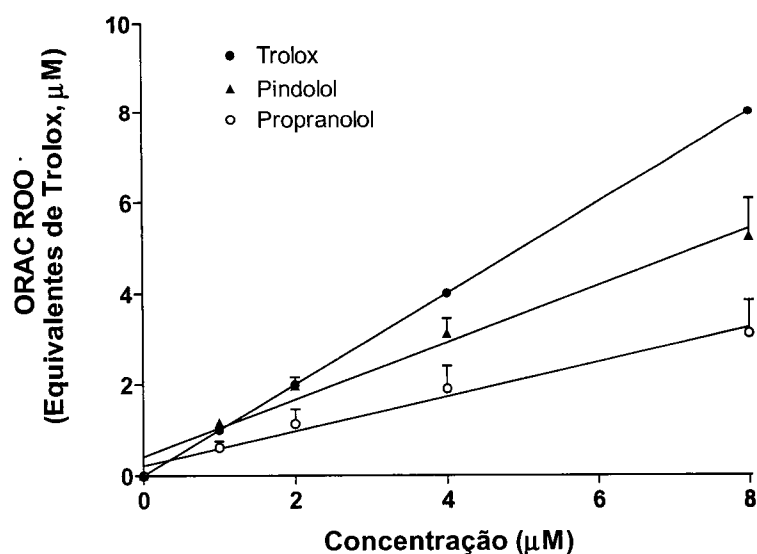


Figura 17 – Regressão linear da relação entre o valor ORAC e as concentrações do pindolol, propranolol e trolox. O valor do declive corresponde à actividade captadora de ROO do composto relativamente ao trolox ($ORAC_{ROO}$). Os valores ORAC foram calculados a partir dos resultados de quatro experiências realizadas em triplicado (média \pm erro padrão).

Compostos testados	$ORAC_{ROO}$ (μM de equivalentes trolox/ μM composto)
Pindolol	$0,62 \pm 0,05$
Propranolol	$0,35 \pm 0,03$
Trolox	1

Tabela 4 – Valores $ORAC_{ROO}$ do pindolol e do propranolol calculados a partir do declive (\pm erro padrão) das rectas de regressão dos respectivos compostos.

3.6 Captação do anião peroxinitrito

Dos antagonistas β -adrenérgicos estudados, o atenolol, o carvedilol, o metoprolol, o pindolol, o propranolol e o sotalol apresentaram efeito captador de ONOO^- nas concentrações estudadas, na ausência de NaHCO_3 (Figura 18 e Figura 19) e na presença de NaHCO_3 (25 mM) (Figura 20 e Figura 21). O pindolol, o sotalol e o carvedilol foram os compostos que apresentaram maior actividade captadora de ONOO^- quer na ausência, quer na presença de NaHCO_3 (Figura 19 e Figura 21), tendo-se obtido para o pindolol um valor de IC_{50} praticamente igual ao do ebselen (controlo positivo), na presença de NaHCO_3 (Tabela 5). O sotalol apresentou um efeito captador elevado, no entanto, o seu efeito máximo rondou os 50% na ausência de NaHCO_3 , não se tendo observado um efeito maior com concentrações deste composto acima do IC_{50} . Na presença de NaHCO_3 o efeito deste composto foi dependente da concentração. Não foi possível testar o carvedilol em concentrações acima de 400 μM devido à insolubilização do composto na mistura reaccional, que ocorreu quando se testaram concentrações superiores.

Na sua maioria, os compostos apresentaram um maior efeito captador na presença de NaHCO_3 do que na sua ausência. Apenas o atenolol e o ebselen apresentaram um menor IC_{50} na presença de NaHCO_3 . Todos os restantes compostos apresentaram, nestas condições, valores de $\text{IC}_{50\text{s}}$ superiores, com grandes diferenças nos casos do propranolol, carvedilol e pindolol (Tabela 5).

O timolol e o labetalol apresentaram interferência com o sinal de fluorescência nesta metodologia, factor que impediu tirar quaisquer conclusões acerca do efeito captador de ONOO^- destes compostos. No caso do timolol essa interferência resultou da reactividade entre o composto e o ONOO^- . No caso do labetalol, a interferência resultou da reactividade directa entre o composto e a DHR (ver 2.8.3).

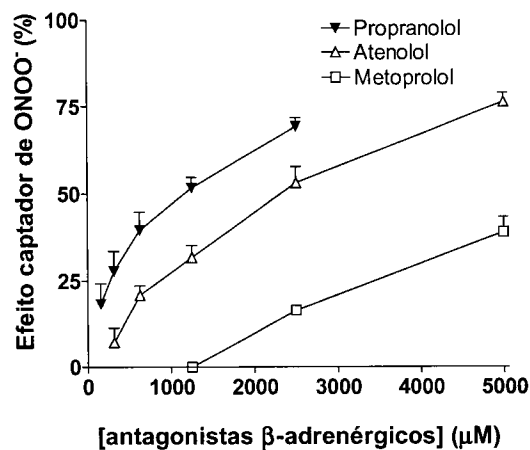


Figura 18 – Efeito captador de ONOO^- (%) do propranolol (156-2500 μM), metoprolol (1250-5000 μM) e atenolol (312-5000 μM). Cada ponto representa valores obtidos em quatro ensaios, efectuados em triplicado (média \pm erro padrão).

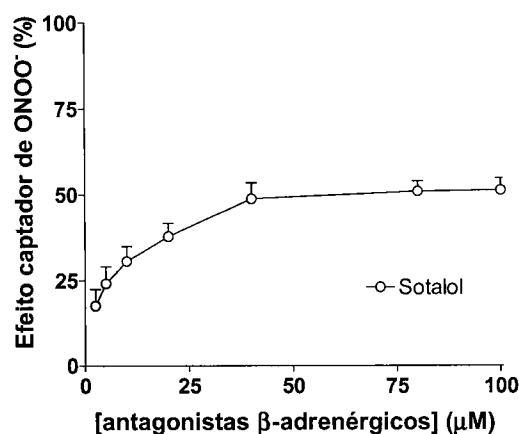
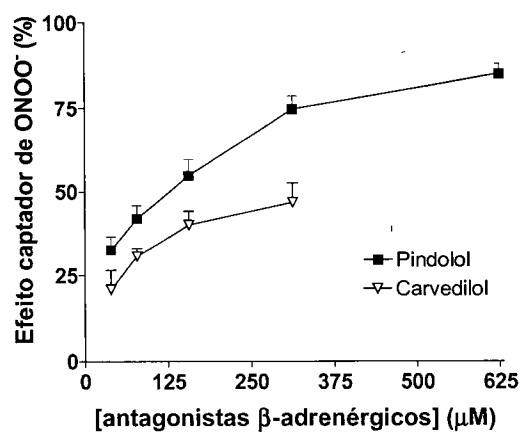


Figura 19 - Efeito captador de ONOO^- (%) do sotalol (2,5-100 μM), pindolol (39-625 μM) e carvedilol (50-312 μM). Cada ponto representa valores obtidos em quatro ensaios, efectuados em triplicado (média \pm erro padrão).

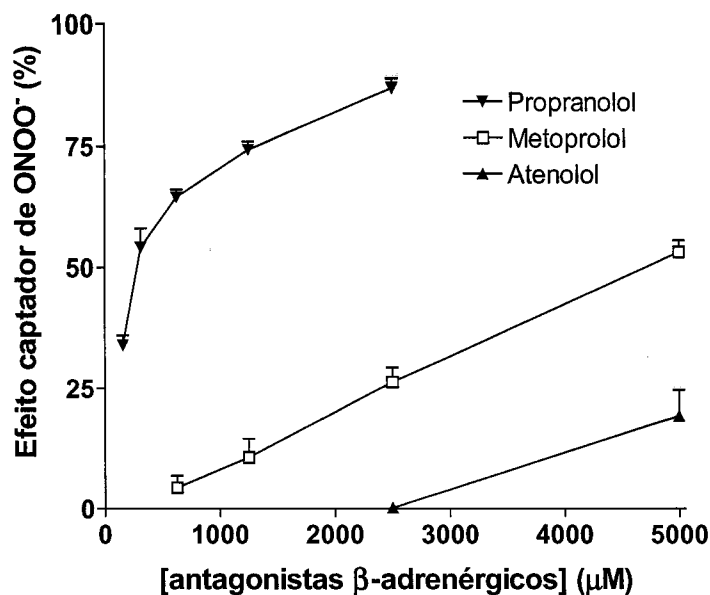


Figura 20 - Efeito captador de ONOO^- (%), na presença de NaHCO_3 (25 mM), do propranolol (156-2500 μM), metoprolol (625-5000 μM) e atenolol (2500; 5000 μM). Cada ponto representa valores obtidos em quatro ensaios, efectuados em triplicado (média \pm erro padrão).

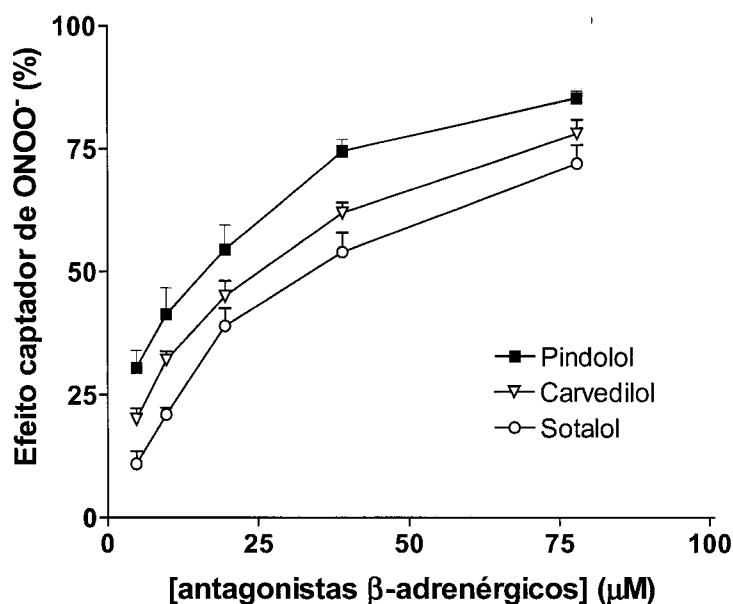


Figura 21 - Efeito captador de ONOO^- (%), na presença de NaHCO_3 (25 mM), do pindolol (5-78 μM), carvedilol (5-78 μM) e sotalol (5-78 μM). Cada ponto representa valores obtidos em quatro ensaios, efectuados em triplicado (média \pm erro padrão).

Compostos testados	IC ₅₀ (μM)	
	ONOO ⁻ na ausência de NaHCO ₃	ONOO ⁻ na presença de NaHCO ₃
Atenolol	2415 ± 278	>5000
Carvedilol	>400	27 ± 3
Metoprolol	>5000	4515 ± 167
Pindolol	131 ± 24	17 ± 3
Propranolol	1112 ± 232	299 ± 32
Sotalol	49 ± 3	32 ± 5
Ebselen	2,5 ± 0,1	16 ± 2

Tabela 5 – Valores de IC_{50s} (média ± erro padrão) para o efeito captador de ONOO⁻ do atenolol, carvedilol, metoprolol, pindolol, propranolol, sotalol e do ebselen. Os valores dizem respeito a ensaios na ausência e na presença NaHCO₃ (25 mM) e correspondem a quatro ensaios, efectuados em triplicado.

3.7 Captação do óxido nítrico

Dos antagonistas β -adrenérgicos estudados, apresentaram efeito captador de $\cdot\text{NO}$ o pindolol, o carvedilol, o atenolol e o propranolol (Figura 22). O composto que apresentou maior efeito captador de $\cdot\text{NO}$ foi o pindolol (Figura 22), mas com um valor de IC_{50} superior ao da rutina (Tabela 6). Não foi possível estudar concentrações superiores a $500 \mu\text{M}$ no caso do carvedilol devido à insolubilização deste composto na mistura reaccional quando se testaram concentrações superiores.

O metoprolol não apresentou efeito captador de $\cdot\text{NO}$ até à concentração de $5000 \mu\text{M}$.

O labetalol, o sotalol e o timolol originaram um aumento de fluorescência em função da concentração, ou seja, promoveram a oxidação da DAF-2 em DAF-2T. A explicação para este facto poderá estar relacionada com um aumento da libertação de $\cdot\text{NO}$ a partir do NOC-5, provocado por estes compostos, uma vez que estes compostos, na ausência de NOC-5, não oxidam a DAF-2. Aliás, a adição de labetalol durante o estudo do efeito “quenching” provocou um aumento imediato da fluorescência relativamente ao controlo (ver 2.9.3).

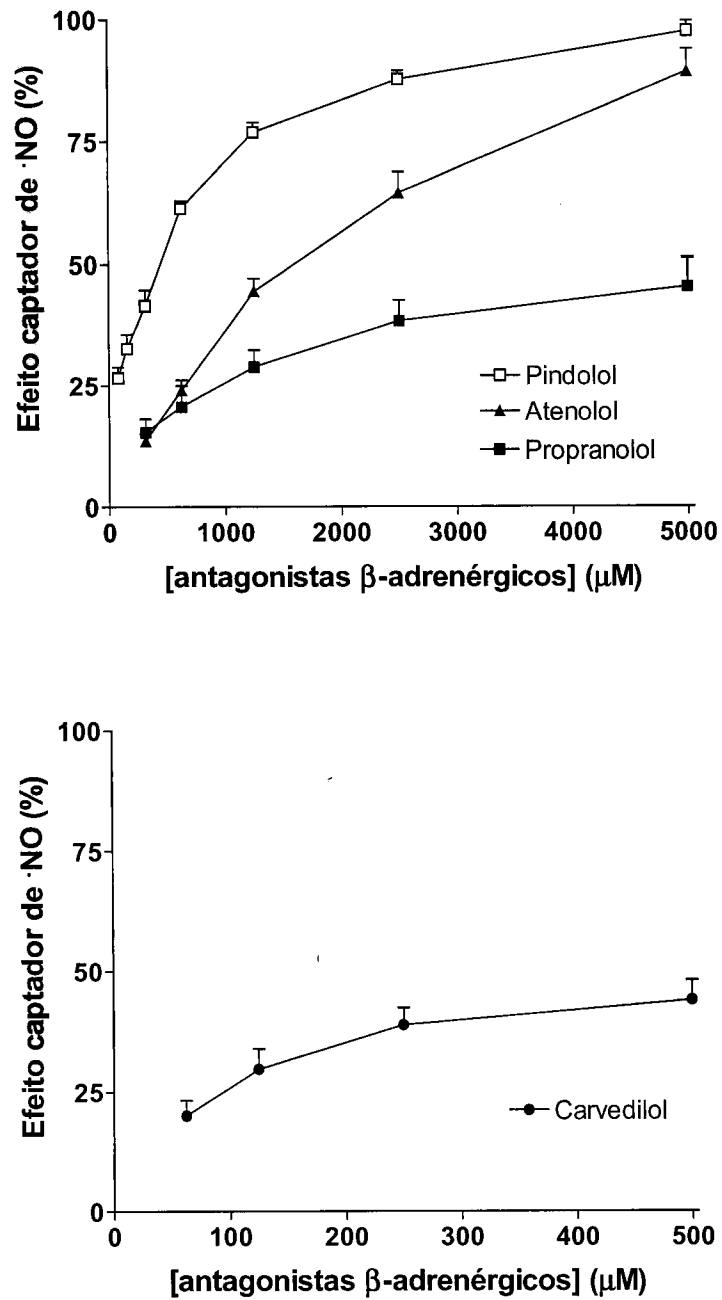


Figura 22 - Efeito captador de $\cdot\text{NO}$ (%) do pindolol (78-5000 μM), atenolol (312-5000 μM), propranolol (312-5000 μM) e carvedilol (62-500 μM). Cada ponto representa valores obtidos em quatro ensaios, efectuados em triplicado (média \pm erro padrão).

Compostos testados	IC ₅₀ (μM)
Atenolol	1646 ± 154
Carvedilol	>500
Pindolol	449 ± 33
Propranolol	>5000
Rutina	0,52 ± 0,02

Tabela 6 - Valores de IC_{50s} (média ± erro padrão) para o efeito captador de NO do atenolol, carvedilol, pindolol, propranolol e da rutina. Os valores correspondem a resultados obtidos em quatro ensaios, efectuados em triplicado.

4 DISCUSSÃO

A avaliação da actividade antioxidante dos antagonistas β -adrenérgicos consistiu na execução de um conjunto de ensaios *in vitro* que permitiu estudar a capacidade destes compostos para captarem as principais ERO e ERA que estão envolvidas na patogénese de doenças cardiovasculares.

A geração das ERO inicia-se com a produção de $O_2^{\cdot -}$ por transferência de um electrão ao O_2 através de vários processos já mencionados em 1.1.1. $O_2^{\cdot -}$ foi gerado pelo sistema enzimático HX/XO. Neste processo há formação de outras espécies reactivas para além do $O_2^{\cdot -}$, nomeadamente de H_2O_2 . Assim, através desta metodologia, com detecção quimiluminimétrica, avaliou-se não só a capacidade captadora de $O_2^{\cdot -}$ mas também de outras ERO que se geram pelo sistema HX/XO.

Nenhum dos compostos estudados apresentou efeito captador das ERO geradas no sistema HX/XO. Pelo contrário, o tiron, um composto captador de $O_2^{\cdot -}$ apresentou efeito com um $IC_{50}=3,7\pm 0,7 \mu M$ (Oosthuizen e Greyling, 2001). Vários autores referiram já a incapacidade dos antagonistas β -adrenérgicos para captarem $O_2^{\cdot -}$ (gerado pelos sistemas xantina/XO, HX/XO ou autoxidação do $FeCl_2$) através de diferentes metodologias (monitorização da redução do ferricitocromo c e do azul de nitrotetrazólio (NBT)) (Aruoma *et al.*, 1991; Anderson *et al.*, 1996; Tadolini e Franconi, 1998; Miura *et al.*, 1999), contudo, no estudo de Yue *et al.* (1992-a) o carvedilol apresentou efeito captador desta espécie reactiva, gerada por autoxidação do ácido di-hidroxifumárico, tendo sido este efeito avaliado por monitorização da redução do NBT.

Na avaliação da capacidade captadora de H_2O_2 apenas o timolol e o labetalol apresentaram um efeito captador dependente da concentração. O timolol ($IC_{50}=1642 \pm 145 \mu M$) apresentou maior efeito do que o labetalol. O valor de IC_{50} do timolol é cerca do dobro do IC_{50} do ácido ascórbico, um antioxidante endógeno ($863 \pm 79 \mu M$). O propranolol, o sotalol e o metoprolol não apresentaram efeito captador de H_2O_2 . Não se podem tirar conclusões quanto ao efeito captador do atenolol, do carvedilol e do pindolol, devido às interferências na metodologia detectadas na presença destes compostos. Na verdade, o aumento da luminescência, relativamente ao controlo, que se

verificou quando estes compostos foram testados, pode significar que os mesmos reagem efectivamente com o H_2O_2 , originando produtos que oxidam a lucigenina em maior extensão do que o próprio H_2O_2 .

A especificidade desta metodologia para o H_2O_2 tinha já sido confirmada por Costa *et al.* (2005) através da execução de um ensaio com a catalase, enzima que metaboliza o H_2O_2 , em que se verificou uma completa eliminação da luminescência da lucigenina induzida pelo H_2O_2 na presença desta enzima ($IC_{50} = 0.050 \pm 0.005$ U/ mL).

Todos os antagonistas β -adrenérgicos estudados, excepto o carvedilol, apresentaram efeito captador de $\cdot OH$. A melatonina, um antioxidante endógeno captador de $\cdot OH$, apresentou um efeito superior ao dos compostos estudados (excepto no caso do labetalol cujo valor de IC_{50} obtido foi inferior ao da melatonina) (Oosthuizen e Greyling, 2001). Tendo em conta os dados já existentes na literatura referentes à relação estrutura-actividade de outros compostos, a reacção directa entre o anel arílico e o $\cdot OH$ pode ser importante para a actividade captadora de $\cdot OH$ (Weber *et al.*, 2001). Isto pode explicar a elevada actividade observada para o labetalol, que possui na sua molécula dois anéis arílicos.

Por dificuldades de dissolução, o carvedilol não foi testado por esta metodologia, no entanto, é importante referir que noutros trabalhos este composto apresentou um forte efeito captador de $\cdot OH$ (Yue *et al.*, 1992-b; Tadolini e Franconi, 1998). O efeito captador de $\cdot OH$ do carvedilol tem sido apontado por alguns autores como um factor importante na protecção contra danos oxidativos associados a algumas disfunções cardíacas (Flesch *et al.*, 1999) e inclusivamente como possível explicação para a inibição da peroxidação lipídica por parte deste composto (Yue *et al.*, 1992-b). No entanto, outros autores consideram este efeito negligenciável em termos de contribuição para a prevenção da peroxidação lipídica (Tadolini e Franconi, 1998).

Todos os antagonistas β -adrenérgicos estudados, apresentaram um forte efeito captador de HOCl, com destaque para o propranolol e metoprolol, que apresentaram valores de IC_{50} próximos do valor encontrado para o ácido lipóico, um comprovado captador de HOCl (Wollin e Jones, 2003). Isto leva a

supor que o mecanismo pelo qual estes compostos exercem o seu efeito captador está relacionado com uma região da molécula comum a todos eles, possivelmente a amina secundária da cadeia lateral, devido à conhecida reactividade do HOCl com as aminas (Grisham *et al.*, 1984; Hawkins e Davies, 1999). Em situações de isquémia-reperfusão há produção de HOCl, pela MPO, em neutrófilos activados que se infiltram no tecido reoxigenado. A captação de HOCl por compostos que actuam no sistema cardiovascular, como é o caso dos antagonistas β -adrenérgicos estudados, poderá constituir uma forma de evitar os danos associados à isquémia-reperfusão (Aruoma *et al.*, 1991; Halliwell e Gutteridge, 1999). Aruoma (1997) tinha já referido a relevância deste factor ao constatar que o carvedilol possuía um efeito captador de HOCl dependente da concentração.

Os resultados do ensaio ORAC, efectuado para a avaliação da capacidade captadora de ROO^\cdot , mostram que o pindolol e o propranolol possuem efeito captador deste radical, sendo o efeito do primeiro consideravelmente superior ao do segundo. Comparando o valor da actividade captadora de ROO^\cdot relativamente ao trolox do pindolol ($0,62 \pm 0,05$) com o de dois conhecidos antioxidantes endógenos, a GSH ($0,34 \pm 0,1$) e ácido ascórbico ($0,25 \pm 0,07$), que tinham sido anteriormente testados pela mesma metodologia (Fernandes *et al.*, 2004), verifica-se que este composto se mostrou um captador de ROO^\cdot mais potente que os referidos antioxidantes.

O ROO^\cdot está directamente relacionado com peroxidação lipídica dado que se gera durante esse processo, assumindo um papel essencial na sua fase de propagação (Jaeschke, 1995; Menéndez, 2001; Spiteller, 2003). Como já foi anteriormente referido, a peroxidação lipídica está intimamente ligada ao aparecimento de placas ateroscleróticas. Estas por sua vez são responsáveis pelo bloqueio da circulação do sangue, conduzindo a situações de isquémia (Marton *et al.*, 2001). A actividade captadora de ROO^\cdot do propranolol e sobretudo do pindolol poderá ter alguma relevância na prevenção da peroxidação lipídica, contribuindo assim para um efeito cardioprotector.

Estudos anteriores revelaram a capacidade do propranolol (Aruoma *et al.* 1991) e de outros antagonistas β -adrenérgicos para inibir a peroxidação lipídica, podendo esta inibição dever-se à interacção dos compostos com as

membranas e à interrupção das reacções em cadeia dos radicais (Mak e Weglicki, 1988). Pelo contrário, Tadoli e Franconi (1998) referem que os antagonistas β -adrenérgicos não impedem a peroxidação lipídica. Aruoma *et al.* (1991), por sua vez salientam que a utilização de diferentes sistemas lipídicos e diferentes sistemas geradores da peroxidação lipídica conduz a diferentes resultados. Estes mesmos autores observaram uma elevada inibição da peroxidação lipídica, induzida por dois sistemas, pelo propranolol e um reduzido efeito inibitório por parte do pindolol (Aruoma *et al.*, 1991). Miura *et al.* (1999) referem o efeito captador de ROO^\cdot , gerados pelo AAPH, do propranolol e do pindolol, sendo o efeito destes dois compostos comparável ao do trolox. Segundo estes autores, o mecanismo do pindolol parece estar relacionado com a captação de R^\cdot e não de ROO^\cdot .

Em síntese, alguns antagonistas β -adrenérgicos parecem ter alguma aptidão para, de uma forma ou outra, inibirem a peroxidação lipídica. Há ainda que salientar que, quer o propranolol, quer o pindolol possuem carácter lipofílico, logo poderão acumular-se nas membranas, podendo assim atingir *in vivo* concentrações suficientemente elevadas para que o seu efeito antioxidante seja exercido (Aruoma *et al.*, 1991).

Todos os antagonistas β -adrenérgicos, excepto o timolol e o labetalol que apresentaram interferências com a metodologia, apresentam efeito captador de ONOO^- , tendo-se destacado o pindolol, o sotalol e o carvedilol. O efeito destes três compostos foi ainda mais marcante na presença do NaHCO_3 25 mM. Como já foi anteriormente referido, o CO_2 reage muito rapidamente com o ONOO^- afectando, assim, a reactividade deste ião com outras moléculas (Squadrito e Pryor, 1998). Um captador de ONOO^- só terá efeito, *in vivo*, se reagir com este mais rapidamente que o CO_2 ou se reagir com os produtos de decomposição do ONOOCO_2^- (NO_2 e CO_3^-). Assim, o CO_2 em concentrações fisiológicas, ao competir pelo ONOO^- , diminui a capacidade de determinados compostos para captar esta espécie reactiva (Ketsawatsakul *et al.*, 2000; Fernandes *et al.*, 2005). Por outro lado, certos estudos demonstram que o CO_2 funciona como catalisador de reacções de nitração induzidas pelo ONOO^- , como acontece na reacção com o triptofano (Alvarez *et al.*, 1996) e com a

melatonina (Zhang *et al.*, 1999). Zhang *et al.* (1999) demonstraram que a reacção do ONOO^- com a melatonina na ausência de NaHCO_3 produz predominantemente 6-hidroximelatonina e 1,2,3,3a,8,8a-hexahidro-1-acetil-5-metoxi-8a-hidroxipirroló[2,3-b]indol, com alguma percentagem da sua forma isomérica 1,2,3,3a,8,8a-hexahidro-1-acetil-5-metoxi-3a-hidroxipirroló[2,3-b]indol. Na presença do NaHCO_3 , a formação destes produtos diminui e a 6-hidroximelatonina não é produzida, indicando a reactividade da melatonina com outras espécies reactivas, provavelmente o $\cdot\text{NO}_2$ e o $\text{CO}_3^{\cdot-}$. É possível que, devido à sua estrutura indólica, a reactividade química do pindolol seja similar à da melatonina, sabendo-se, contudo, que a confirmação desta hipótese necessita de investigação adicional (Fernandes *et al.*, 2005).

O potente efeito captador de ONOO^- demonstrado por alguns dos antagonistas β -adrenérgicos estudados poderá ser uma mais valia no controlo de patologias do foro cardiovascular em que há envolvimento desta espécie reactiva, como a aterosclerose e a isquémia-reperfusão. Aliás, o carvedilol mostrou já preservar os tecidos vasculares em situações de hipercolesterolemia, participando no processo de destoxificação contra o ONOO^- (Ma *et al.*, 1997).

Dos antagonistas β -adrenérgicos estudados, apresentaram efeito captador de $\cdot\text{NO}$ o pindolol, o carvedilol, o atenolol e o propranolol, sendo os mais activos o pindolol e o carvedilol. O facto dos antagonistas β -adrenérgicos não apresentarem um elevado efeito captador de $\cdot\text{NO}$ poderá ser vantajoso dado que estes compostos são utilizados sobretudo em situações de hipertensão arterial, nas quais a diminuição dos níveis de $\cdot\text{NO}$ é desfavorável devido ao papel preponderante deste radical como factor de relaxamento do endotélio. Esta situação é discutida por Yoshioka *et al.* (2000) que no seu estudo se depararam com um potente efeito captador de $\cdot\text{NO}$ por parte do carvedilol. Estes autores apontam para os efeitos pouco benéficos que daí podem advir. No entanto, há que ter presente as vantajosas propriedades farmacológicas que este antagonista β -adrenérgico apresenta, bem como as propriedades antioxidantes que já demonstrou possuir quer *in vitro* (Yue *et al.*, 1992-a; Yue *et al.*, 1992-b; Aruoma, 1997; Tadolini e Franconi, 1998; Marton *et*

al., 2001; Oettl *et al.*, 2001) quer *in vivo* (Elena *et al.*, 1996; Castro *et al.*, 2004; . Kawai *et al.*, 2004). A principal característica estrutural que distingue o carvedilol dos outros compostos estudados é a sua porção carbazol. Foi já demonstrado que os derivados do carbazol possuem propriedades captadoras de espécies reactivas e inibem a peroxidação lipídica (Yue *et al.*, 1992; Tadolini e Franconi , 1998).

Como foi anteriormente referido, o efeito antioxidante do carvedilol foi já observado *in vivo*, em seres humanos ou animais com patologias cardiovasculares. Na verdade, Elena *et al.* (1996) verificaram que o tratamento com doses terapêuticas de carvedilol, durante quatro meses, reduziu a oxidação das LDL em doentes hipertensos, não estando este efeito directamente relacionado com a redução dos valores da tensão arterial. Assim, é provável que este efeito esteja relacionado com a actividade antioxidante deste composto e não com a sua acção anti-hipertensora. Por sua vez, Castro *et al.* (2004) observaram uma descida significativa do malonildialdeído plasmático em doentes com insuficiência cardíaca após 6 meses de tratamento com carvedilol. Kawai *et al.* (2004) verificaram que a relação GSH/GSSG, no miocárdio de coelhos com falha cardíaca congestiva, aumentou quando estes foram sujeitos a um tratamento com carvedilol ou metoprolol, durante 8 semanas. Este aumento de GSH/GSSG reflecte uma redução do stresse oxidativo que, segundo estes autores, poderá estar relacionada com as alterações favoráveis ao nível do miocárdio observadas nos coelhos sujeitos a este tratamento (Kawai *et al.*, 2004).

Neste trabalho o pindolol mostrou-se um captador de $\cdot\text{NO}$ e sobretudo um bom captador de ONOO^- . Esta actividade poderá justificar-se pela presença na sua estrutura química do anel indólico, tal como acontece na melatonina, na serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) e no triptofano, compostos endógenos que demonstraram já possuir actividade captadora de ERA (Alvarez *et al.*, 1996; Blanchard *et al.*, 1997; Gilad *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1999; Blanchard *et al.*, 2000; Alvarez e Radi, 2003). Estudos computacionais com derivados indólicos, em que foi calculada a energia livre relativa de reacções com radicais, indicaram que os carbonos nas posições 2,3,4,6 e 7 do anel indólico heterocíclico são locais possíveis para reacções com radicais de azoto

(Turjanski *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2002). Esta reactividade química foi confirmada em vários estudos, nomeadamente para o triptofano (Alvarez *et al.*, 1996), a 5-HT (Blanchard *et al.*, 1997) e a melatonina (Zhang *et al.*, 1998). Embora a avaliação da relação estrutura-actividade não tenha sido o objectivo deste trabalho, é possível que as posições N-1, C-2, C-3, C-6 e C-7 do pindolol estejam envolvidas na actividade captadora de ERA observada para este composto.

O forte efeito captador de ERA do pindolol poderá ser relevante noutros contextos não relacionados com o sistema cardiovascular. O pindolol, para além de possuir actividade antagonista β , mostrou também, em estudos clínicos, ser útil na redução do tempo de latência dos antidepressivos inibidores selectivos da recaptção da serotonina (ISRS). Aliás, este composto tem vindo a ser utilizado na terapêutica, com esse objectivo, desde 1994 (Artigas *et al.*, 1994; Artigas *et al.*, 1996; Artigas *et al.*, 2001). O efeito de latência associado aos ISRS resulta do facto deste tipo de compostos inicialmente provocar uma diminuição da libertação da serotonina dos neurónios serotoninérgicos devido a uma estimulação dos autoreceptores inibitórios 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} (Dawson e Nguyen, 2000). Esta diminuição do “disparo” dos neurónios serotoninérgicos resulta na redução da actividade serotoninérgica nos locais de projecção. Com uma administração continuada de ISRS, os autoreceptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} tornam-se dessensibilizados resultando num aumento da transmissão da 5-HT após 2-4 semanas de tratamento, período de tempo semelhante ao tempo de latência verificado para o efeito antidepressivo (Plenge e Mellerup, 2003). A explicação para o efeito do pindolol na redução do tempo de latência dos ISRS tem recaído sobre a actividade antagonista dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} que este composto possui (Newman-Tancredi *et al.*, 1998). Contudo, esta teoria é contestada por alguns autores dado que o pindolol, nas doses terapêuticas utilizadas, poderá não atingir concentrações plasmáticas suficientes para que o bloqueio destes receptores seja significativo (Martinez *et al.*, 2000; Artigas, 2001).

A actividade captadora de $\cdot\text{NO}$ e de ONOO^- do pindolol poderá ser uma justificação para o seu efeito de redução do tempo de latência dos ISRS. Além disso poderá também conferir a este composto uma actividade neuroprotectora. Na verdade, a diminuição dos níveis de $\cdot\text{NO}$ no SNC produz

efeitos ansiolíticos e antidepressivos quer em animais quer em humanos (Narsapur e Naylor, 1983). Assim, existe a possibilidade de que a captação de $\cdot\text{NO}$ pelo pindolol no SNC contribua para um efeito antidepressivo, algo que necessita de ser comprovado em estudos futuros (Fernandes *et al.*, 2005). É também importante acrescentar que o $\cdot\text{NO}$, quando presente em elevadas concentrações, pode produzir efeitos neurotóxicos (Dawson e Dawson, 1996; Bolanos *et al.*, 1997; Lipton, 1999; Nicotera *et al.*, 1999). No entanto, esta espécie reactiva apresenta fraca toxicidade, tendo sido atribuídos ao seu derivado ONOO^- os efeitos citotóxicos resultantes da sua produção excessiva (Radi *et al.*, 1991; Rubbo *et al.*, 1996). Deste modo, o potente efeito captador de ONOO^- demonstrado pelo pindolol poderá torná-lo útil no controlo de doenças neurodegenerativas em que estejam envolvidas ERA.

Embora todos os compostos que se mostraram activos como captadores de ERO e ERA tenham produzido efeito, nos estudos *in vitro* efectuados, em concentrações superiores às respectivas concentrações máximas terapêuticas atingidas no soro (Tabela 7), a eficiência da actividade captadora depende dos níveis produzidos de ERO e ERA, que são normalmente mais baixos *in vivo* do que *in vitro*. Os ensaios de actividade captadora não celulares, são elaborados de forma a que os níveis de espécie reactiva sejam suficientemente elevados para que esteja assegurado um bom sinal nos sistemas de detecção. Além disso, Sousa *et al.* (2005) verificaram *in vitro* que, quando se diminuem os níveis de $\cdot\text{NO}$, os $\text{IC}_{50\text{s}}$ dos compostos captadores também diminuem. Consequentemente, a concentração de composto captador necessária para que se produza efeito sobre a espécie reactiva será mais elevada *in vitro* do que *in vivo* (Fernandes *et al.*, 2005).

Antagonistas β -adrenérgicos	Máximas concentrações terapêuticas no soro (μM)
Atenolol	3
Carvedilol	0,3
Labetalol	8
Metoprolol	3
Pindolol	0,4
Propranolol	0,3
Sotalol	4
Timolol	3

Tabela 7 – Máximas concentrações terapêuticas no soro dos antagonistas β -adrenérgicos estudados.

5 CONCLUSÕES

No que diz respeito à implementação, em leitor de microplacas, de técnicas com detecção fluorimétrica e quimiluminimétrica para avaliação da capacidade de captação de ERO e ERA pode-se concluir que:

- A adaptação das metodologias com detecção fluorimétrica e quimiluminimétrica para a avaliação da captação de ERO e ERA para leitor de microplacas, permitiu utilizar uma menor quantidade de reagentes e de composto em estudo. Este factor é vantajoso quer do ponto de vista ambiental, quer do ponto de vista económico, tendo em conta o custo elevado de alguns reagentes, nomeadamente as sondas fluorescentes utilizadas (DHR e DAF-2).
- Uma segunda vantagem da adaptação destas metodologias para leitor de microplacas foi a de permitir a análise de várias concentrações do composto em estudo em triplicado e simultaneamente, permitindo encurtar o tempo de ensaio e minimizar as variações das condições de ensaio ao longo do tempo, como a temperatura.

No que diz respeito à avaliação *in vitro*, em sistemas não celulares, da capacidade de captação de ERO e ERA por antagonistas β -adrenérgicos, verifica-se que:

- Nenhum dos antagonistas β -adrenérgicos estudados se mostrou captador de $O_2^{\cdot -}$ e apenas o timolol e o labetalol mostraram possuir efeito captador de H_2O_2 .
- Todos os antagonistas β -adrenérgicos apresentaram efeito captador de $\cdot OH$ dependente da concentração, excepto o carvedilol cuja actividade captadora de $\cdot OH$ não foi testada por dificuldades de dissolução do composto. O labetalol foi o composto para o qual se obteve um menor valor de IC_{50} .

- Todos os antagonistas β -adrenérgicos mostraram ser bons captadores de HOCl, com o destaque para o metoprolol e o propranolol que apresentaram os valores de IC_{50} mais baixos.
- O pindolol e o propranolol apresentaram efeito captador de ROO^{\cdot} , com valores de $ORAC_{ROO^{\cdot}}$ de 0,62 e 0,35, respectivamente.
- O pindolol e o sotalol mostraram-se potentes captadores de $ONOO^{\cdot}$, na ausência e sobretudo na presença de $NaHCO_3$ (25 mM). O carvedilol mostrou também ser um bom captador de $ONOO^{\cdot}$ na presença de $NaHCO_3$ e mais fraco na sua ausência. Da mesma forma, o propranolol apresentou um efeito captador de $ONOO^{\cdot}$ consideravelmente superior na presença de $NaHCO_3$ do que na sua ausência. O atenolol e o metoprolol apresentaram um efeito captador de $ONOO^{\cdot}$ bastante mais modesto do que os compostos anteriormente referidos.
- No estudo da actividade captadora de $\cdot NO$, o pindolol, o propranolol, o carvedilol e o atenolol apresentaram efeito dependente da concentração. Dos compostos estudados, o pindolol foi aquele que apresentou menor IC_{50} .

Perspectivas para a utilidade terapéutica da actividade captadora de ERO e ERA dos compostos estudados:

- O elevado efeito captador de ERA apresentado pelo pindolol pode conferir a este composto uma actividade neuroprotectora e justificar o seu efeito na redução do tempo de latência dos antidepressivos ISRS.
- A actividade captadora de HOCl e $\cdot OH$ dos antagonistas β -adrenérgicos estudados poderá contribuir para os seus efeitos terapêuticos na hipertensão e noutras doenças cardiovasculares, às quais está associada uma elevada produção destas ERO.

- O propranolol e o pindolol podem ser úteis na inibição da peroxidação lipídica, associada aos processos aterogénicos, devido ao seu efeito captador de ROO \cdot .

6 BIBLIOGRAFIA

- Afanas'ev I.B., Ostrakhovitch E.A., Mikhal'chik E.V. and Korkina L. (2001) Direct enzymatic reduction of lucigenin decreases lucigenin-amplified chemiluminescence produced by superoxide ion. *Luminescence* 16:305-307.
- Alvarez B. and Radi R. (2003) Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids* 25:295-311.
- Alvarez B., Rubbo H., Kirk M., Barnes S., Freeman B.A. and Radi R. (1996) Peroxynitrite-dependent tryptophan nitration. *Chem. Res. Toxicol.* 9:390-396.
- Anderson R., Ramifi G. and Theron A.J. (1996) Membrane stabilizing, anti-oxidative interactions of propranolol and dexpropranolol with neutrophils. *Biochem. Pharmacol.* 52:341-349.
- Artigas F., Perez V. and Alvarez E. (1994) Pindolol induces a rapid improvement of depressed patients treated with serotonin reuptake inhibitors. *Arch. Gen. Psychiatry.* 51:248-251.
- Artigas F., Romero L., Montigny C and Blier P. (1996) Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT_{1A} antagonists. *Trends Neurosci.* 19:378-383.
- Artigas F., Celada P., Laruelle M. and Adell A. (2001) How does pindolol improve antidepressant action? *Trends Pharmacol. Sci.* 22:224-228.
- Aruoma O.I., Smith C., Cecchini R., Evans P.J. and Halliwell B. (1991) Free radical scavenging and inhibition of lipid peroxidation by β -blockers and by agents that interfere with calcium metabolism. A physiologically-significant process? *Biochem. Pharmacol.* 42:735-743.
- Aruoma O.I. (1994) Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem Toxicol.* 32:671-683.
- Aruoma O.I. (1997) Scavenging of hypochlorous acid by carvedilol and ebselen in vitro. *Gen Pharmac.* 28:269-272.
- Aruoma O.I. (1998) Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75:199-212.
- Augusto O., Bonini M.G., Amanso A.M., Linares E., Santos C.C.X. and De Menezes S.L. (2002) Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: Two emerging radicals in biology. *Free Radic. Biol. Med.* 32:841-859.
- Azzi A., Davies K.J.A. and Kelly F. (2004) Free radical biology - Terminology and critical thinking. *FEBS Lett.* 558:3-6.
- Babior M.B. (2000) Phagocytes and oxidative stress. *Am. J. Med.*

109:33-44.

- Bailly F., Zoete V., Vamecq J., Catteau J-P. and Bernier J-L. (2000) Antioxidant actions of othiol-derived 4-mercaptoimidazoles : glutathione peroxidase activity and protection against peroxynitrite-induced damage. *FEBS Lett.* 486:19-22.
- Bast A., Haenen G.R.M.M. and Doelamn C.J.A. (1991) Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am. J. Med.* 91:2-13.
- Beckman J.S. (1996) Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* 9:836-844.
- Beckman J.S. and Koppenol W.H. (1996) Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol.* 271:C1424-C1437.
- Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A. and Freeman B.A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1620-1624.
- Beckman J.S., Chen J., Ischiropoulos H. and Crow J.P. (1994) Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymol.* 223:229-240.
- Beckman K.B. and Ames B.N. (1998) The free radical theory of aging. *Physiol Rev.* 78:547-581.
- Blanchard B., Dendane M., Gallard J.F., Houee-Levin C., Karim A., Payen D., Launay J.M. and Ducrocq C. (1997) Oxidation, nitrosation, and nitration of serotonin by nitric oxide-derived nitrogen oxides: Biological implications in the rat vascular system. *Nitric Oxide* 1:442-452.
- Blanchard B., Pompon D. and Ducrocq C. (2000) Nitrosation of melatonin by nitric oxide and peroxynitrite. *J. Pineal Res.* 29:184-192.
- Bolanos J.P., Almeida A., Stewart V., Peuchen S., Land J.M., Clark J.B. and Heales S.J. (1997) Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: Mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *J. Neurochem.* 68:2227-2240.
- Bonini M.G., Radi R., Ferrer-Sueta G., Ferreira A.M., Da C. and Augusto O. (1999) Direct EPR detection of the carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide. *J. Biol. Chem.* 274:10802-10806.
- Borchard U. (1998) Pharmacological properties of β -adrenoceptor blocking drugs. *J. Clin. Cardiol.* 1:5-8.
- Borges F., Fernandes E. and Roleira F. (2002) Progress towards the

discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* 9:195-217.

- Cai H. and Harrison D.G. (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases. The role of oxidant stress. *Circ. Res.* 87:840-844.
- Cadenas E. (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* 58:79-110.
- Caldefie-Chézet F., Walrand S., Moinard C., Tridon A., Chassagne J. and Vasson M.-P. (2002) Is the neutrophil reactive oxygen species production measured by luminol and lucigenin chemiluminescence intra or extracellular? Comparison with DCFH-DA flow cytometry and cytochrome c reduction. *Clin. Chim. Acta* 319:9-17.
- Cao G., Alessio H.M. and Cutler R.G. (1993) Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 14:303-311.
- Castro P., Perez O., Greig D., Diaz-Araya G., Moraga F., Chiong M., Troncoso R., Padilla I., Vukasovic J.L., Corbalan R. and Lavandero S. (2004) Efectos del carvedilol en la capacidad funcional, función ventricular izquierda, catecolaminas y estrés oxidativo en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica. *Rev. Esp. Cardiol.* 57:1053-1058.
- Chae H.Z., Robison K., Poole L.B., Church G., Storz G. and Rhee S.G. (1994a) Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:9265-9269.
- Chae H.Z., Chung S.J., and Rhee S.G. (1994b) Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J. Biol. Chem.* 269, 27670-27678.
- Chang M.C., Uang B.J., Wu H.L., Lee J.J, Hahn L.J. and Jeng J.H. (2002) Inducing the cell cycle arrest and apoptosis of oral KB carcinoma cells by hydroxychavicol: roles of glutathione and reactive oxygen species. *Br. J. Pharmacol.* 135:619-630.
- Cheeseman K.H. and Slater T.F. (1993) An Introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.* 49:481-493.
- Choi J.S., Chung H.Y., Kang S.S., Jung M.J., Kim J.W., No J.K. and Jung H.A. (2002) The structure-activity relationship of flavonoids as scavengers of peroxynitrite. *Phytother. Res.* 16:232-235.
- Coddington J.W., Hurst J.K. and Lyman S.V. (1999). Hydroxyl radical formation during peroxynitrous acid decomposition. *J. Am. Chem. Soc.* 121:2438-2443.
- Costa D., Gomes A., Reis S., Lima J. L. F. C. and Fernandes E. (2005)

Hydrogen peroxide scavenging activity by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Life Sci (In press)*.

- Crow J.P. (1997) Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite *in vitro*: Implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide* 1:145-157.
- Cynshi O., Saitoh M., Cynshi F., Tanemura M., Hata S-I. and Nakano M. (1990) Anti-oxidative profile of lobenzarit disodium (CCA). *Biochem. Pharmacol.* 40:2117:2122.
- Dawson V.L. and Dawson T.M. (1996) Nitric oxide neurotoxicity. *J. Chem. Neuroanat.* 10:179-190.
- Dawson L.A. and Nguyen H.Q. (2000) The role of 5-HT(1A) and 5-HT(1B/1D) receptors on the modulation of acute fluoxetine-induced changes in extracellular 5-HT: The mechanism of action of (+/-) pindolol. *Neuropharmacology* 39:1044-1052.
- De Grey A.D.N.J. (2002) HO₂: The forgotten radical. *DNA Cell Biol.* 21:251-257.
- Dean R.T., Thomas S.M. and Garner A. (1986) Free radical-mediated fragmentation of monoamino oxidase in the mitochondrial membrane. Role of lipid radicals. *Biochem. J.* 240:289-94.
- Demiryürek A.T., Cinel I., Kahraman S., Tecder-Ünal M., Gögüs N., Aypar Ü. and Kanzik I. (1998) Propofol and Intralipid interact with reactive oxygen species: a chemiluminescence study. *Br. J. Anaesth.* 80:649-654.
- Denicola A., Freeman B.A., Trujillo M., and Radi R. (1996) Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: Kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch. Biochem. Biophys.* 333:49-58.
- Denicola A., Souza J.M. and Radi R. (1998) Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:3566-3571.
- Devasagayam T.P.A., Tilak J.C., Bloor K.K., Sane K.S., Ghaskadbi S.S. and Lele R.D. (2004) Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J. Assoc. Physicians. India* 52:794-804.
- Digerness S.B., Harris K.D., Kirklin J.W., Urthaler F., Viera L., Beckman J.S. and Darley-Usmar V. (1999) Peroxynitrite irreversibly decreases diastolic and systolic function in cardiac muscle. *Free Radic. Biol. Med.* 27:1386-1392.

- Eiserich J.P., Cross C.E., Jones A.D., Halliwell B. and van der Vliet A. (1996) Formation of nitrating and chlorinating species by reaction of nitrite with hypochlorous acid. *J. Biol. Chem.* 272:19199-19208.
- Eiserich J.P., Patel R.P. and O'Donnell V.B. (1998) Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol. Aspects Med.* 19:221-357.
- El Midaoui A., Elimadi A., Wu L., Haddad P.S. and de Champlain J. (2003) Lipoic acid prevents hypertension, hyperglycemia, and the increase in heart mitochondrial superoxide production. *Am. J. Hypertens.* 16:173-179.
- Embola C.W., Sohn O.S., Fiala E.S., and Weisburger J.H. (2002) Induction of UDP-glucuronosyltransferase 1 (UDP-GT1) gene complex by green tea in male F344 rats. *Food. Chem. Toxicol.* 40:841-844.
- Esch T., Stefano G.B., Fricchione G.L. and Benson H. (2002) Stress-related diseases-A potential role for nitric oxide. *Med. Sci. Monit.* 8:RA103-118.
- Esterbauer H., Zollner H. and Schaur R.J. (1988) Hydroxyalkenals: cytotoxic products of lipid peroxidation. *ISI Atlas-Biochem.* 1:311-315.
- Estévez A.G., Crow J.P., Sampson J.B., Reiter C., Zhuang Y., Richardson G.J., Tarpey M.M., Barbeito L. and Beckman J.S. (1999) Induction of nitric oxide-dependent apoptosis in motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase. *Science* 286:2498-2500.
- Feng Q., Kumagai T., Torii Y., Nakamura Y., Osawa T., and Uchida K. (2001) Anticarcinogenic antioxidants as inhibitors against intracellular oxidative stress. *Free Radic. Res.* 35:779-788.
- Fernandes E., Toste S.A., Lima J.L.F.C. and Reis S (2003) The metabolism of sulindac enhances its scavenging activity against reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic. Biol. Med.* 35:1008-1017.
- Fernandes E., Costa D., Toste S.A., Lima J.L.F.C. and Reis S. (2004) In vitro scavenging activity for reactive oxygen and nitrogen species by nonsteroidal anti-inflammatory indole, pyrrole, and oxazole derivative drugs. *Free Radic. Biol. Med.* 37:1895-1905.
- Fernandes E., Gomes A., Costa D and Lima J.L.F.C. (2005) Pindolol is a potent scavenger of reactive nitrogen species. *Life Sci. (In Press)*.
- Ferreira E.C. e Rossi A.V. (2002) A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reacção do luminol em métodos de análise. *Quim. Nova* 25:1003-1011.

- Fink M.P. (2002) Role of reactive oxygen species in acute respiratory distress syndrome. *Curr. Opin. Crit. Care* 8:6-11.
- Flesch M., Maack C., Cremers B., Bäumer, A.T., Südkamp M. and Böhm M. (1999) Effect of β -blockers on free radical-induced cardiac contractile dysfunction. *Circulation* 100:346-353.
- Fridovich I. (1975) Superoxide dismutase. *Annu. Rev. Biochem.* 44:147-159.
- Garrett J., Osswald W. e Guimarães S. (1999) Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas. Porto Editora, Porto, Portugal.
- Gilad E., Cuzzocrea S., Zingarelli B., Salzman A.L. and Szabo C. (1997) Melatonin is a scavenger of peroxynitrite. *Life Sci.* 60:PL169-174.
- Glebska J. and Koppenol W.H. (2003) Peroxynitrite-mediated oxidation of dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine. *Free Radic. Biol. Med.* 35:676-682.
- Goldstein S. and Czapski G. (1995) The reaction of NO with O_2^- and HO_2 : A pulse radiolysis study. *Free Radic. Biol. Med.* 19:505-510.
- Grisham M.B., Jefferson M.M., Melton D.F. and Thomas E.L. (1984) Chlorination of endogenous amines by isolated neutrophils. Amonia-dependent bactericidal, cytotoxic, and cytolytic activity of chloroamines. *J. Biol. Chem.* 25:10404-10413.
- Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. (1999) Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Halliwell B., Zhao K. and Whiteman M. (1999) Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good. A personal view of recent controversies. *Free Rad. Res.* 31:651-669.
- Hampton M.B., Kettle A.J. and Winterbourn C.C. (1998) Inside the neutrophil phagosome: Oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92:3007-3017.
- Hashjin S. G., Folkerts G., Henricks P.A, Muijsers R.B. and Nijkamp F.P. (1998) Peroxynitrite in airway diseases. *Clin. Exp. Aller.* 28:1464-1473.
- Hawkins C.L. and Davies M.J. (1999) Hypochloride-induced oxidation of proteins in plasma: formation of chloramines and nitrogen-centred radicals and their role in protein fragmentation. *Biochem. J.* 340:539-548.
- Huang D., Ou B., Hampsch-Woodill M., Flanagan J.A. and Prior R.L. (2002) High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity

(ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.* 50:4437-4444.

- Huie E. and Padmaja S. (1993) The reaction of NO with superoxide. *Free Radic. Res. Commun.* 18:195-199.
- Hyrsi P., Lojek A., Ciz M. and Kubala L. (2004) Chemiluminescence of lucigenin is dependent on experimental conditions. *Luminescence* 19:61-63.
- Irani K. (2000) Oxidant signalling in vascular cell growth, death, and survival. A review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signalling. *Circ. Res.* 87:179-183.
- Jaeschke H. (1995) Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. *Exp. Biol. Med.* 209:104-111.
- Jeng J.H., Chen S.Y., Liao C.H., Tung Y.Y., Lin B.R., Hahn L.J. and Chang M.C. (2002) Modulation of platelet aggregation by areca nut and betel leaf ingredients: roles of reactive oxygen species and cyclooxygenase. *Free Radic. Biol. Med.* 32:860-871.
- Jour'heuil D., Miranda K.M., Kim S.M., Espey M.G., Vodovotz Y., Laroux S., Mai C.T., Miles A.M., Grisham M.B., and Wink D.A. (1999) The oxidative and nitrosative chemistry of the nitric oxide/superoxide reaction in the presence of bicarbonate. *Arch. Biochem. Biophys.* 365:92-100.
- Jour'd'heuil D., Jour'd'heuil F.L., Kutchukian P.S., Musah R.A., Wink D.A. and Grisham M.B. (2001) Reaction of superoxide and nitric oxide with peroxynitrite -implications for peroxynitrite mediated oxidation reactions *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 276:28799-28805.
- Kang S.W., Chae H.Z., Seo M.S., Kim K., Baines I.C. and Rhee S.G., (1998) Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumours necrosis factor. *J. Biol. Chem.* 273: 6297-6302.
- Kawai K., Qin F., Shite J., Mao W., Fukuoka S. and Liang C-s (2004) Importance of antioxidant and antiapoptotic effects of β -receptor blockers in heart failure therapy. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 287:H1003-H1012.
- Keith W.G. and Powell R.E. (1969) Kinetics of decomposition of peroxynitrous acid. *J. Chem. Soc. A.* 90-90.
- Ketsawatsakul U., Whiteman M. and Halliwell B. (2000) A reevaluation of the peroxynitrite scavenging activity of some dietary phenolics. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 279:692-699.

- Kissner R., Nauser T., Bugnon P., Lye P.G. and Koppenol W.H. (1997) Formation and properties of peroxyxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis. *Chem. Res. Toxicol.* 10:1285-1292.
- Kohnen S.L., Mouithys-Mickalad A.A., Deby-Dupont G.P., Deby C.M.T., Hans P., Lamy M.L. and Noels A.F. (2003) Investigation of the reaction of peroxyxynitrite with propofol at acid pH: Predominant production of oxidized, nitrated, and halogenated derivatives. *Nitric Oxide* 8:170-181.
- Kojima H., Sakurai K., Kikuchi K., Kawahara S., Kirino Y., Nagoshi H., Hirata Y. and Nagano T. (1998) Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. *Chem. Pharm. Bull.* 46:373-375.
- Kooy N.W. and Royall J.A. (1994) Agonist-Induced peroxyxynitrite production from endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 310:352-359.
- Kooy N.W., Royall J.A., Ischiropoulos H. and Beckman J.S. (1994) Peroxyxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic. Biol. Med.* 16:149-156.
- Koppenol W.H. (1998) The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxyxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* 25:385-391.
- Koprassch S., Pietzsch J. and Graessler J. (2003) Validation of different chemiluminescent substrates for detecting extracellular generation of reactive oxygen species by phagocytes and endothelial cells. *Luminescence* 18:268-273.
- Kostka P. (1995) Free radicals (nitric oxide). *Anal. Chem.* 67:411R-416R.
- Kyaw M., Yoshizumi M., Tsuchiya K., Izawa Y., Kanematsu Y. and Tamaki T. (2004) Atheroprotective effects of antioxidants through inhibition of mitogen-activated protein kinases. *Acta Pharmacol. Sin.* 25:977-985.
- Lassègne B. and Griendling K.K. (2004) Reactive oxygen species in hypertension. *AJH* 17:852-860.
- Li Y., Zhu H., Kuppusamy P., Roubaud V., Zweier J.L. and Trush M.A. (1998) Validation of lucigenin (bis-*N*-methylacridinium) as a chemiluminescent probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. *J. Biol. Chem.* 273:2015-2023.
- Lipton S.A. (1999) Neuronal protection and destruction by NO. *Cell Death Differ.* 6:943-951.

- Liu X., Miller M.J.S., Joshi M.S., Thomas D.D. and Lancaster Jr. (1998) Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:2175-2179.
- Lyman S.V. and Hurst J.K. (1995) Rapid reaction between peroxynitrite ion and carbon dioxide: Implications for biological activity *J. Am. Chem. Soc.* 117:8867-8868.
- Lyman S.V. and Hurst J.K. (1996) Carbon dioxide: physiological catalyst for peroxynitrite-mediated cellular damage or cellular protectant? *Chem. Res. Toxicol.* 9:845-850.
- Ma X.L., Lopez B.L., Liu G.L., Christopher T.A., Gao F., Guo Y., Feuerstein Z.G., Ruffolo Jr R.R., Barone F.C and Yue T.L. (1997) Hypercholesterolemia impairs a detoxification mechanism against peroxynitrite and renders the vascular tissue more susceptible to oxidative injury *Circ. Res.* 80:894-901.
- Maggi E., Marchesi E., Covini D., Negro C., Perani G. and Bellomo G. (1996) Protective effects of carvedilol, a vasodilating [beta]-adrenoceptor blocker, against in vivo low density lipoprotein oxidation in essential hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 27:532-538.
- Mak I.T., and Weglicki W.B. (1988). Protection of β -blocking agents against free radical-mediated sarcolemmal lipid peroxidation. *Circ. Res.* 63:262-266.
- Malle E., Waeg G., Schreiber R., Grone E.F., Sattler W. and Grone H.J. (2000) Immunohistochemical evidence for the myeloperoxidase/H₂O₂/halide system in human atherosclerotic lesions: co-localization of myeloperoxidase and hypochlorite-modified proteins. *Eur. J. Biochem.* 267:4495-4503.
- Martinez D., Mawlawi O., Hwang D.R., Kent J., Simpson N., Parsey R.V., Hashimoto T., Slifstein M., Huang Y., Van Heertum R., Abi-Dargham A., Caltabiano S., Maliza A., Cowley H., Mann J.J. and Laruelle M. (2000) Positron emission tomography study of pindolol occupancy of 5-HT(1A) receptors in humans: Preliminary analyses. *Nucl. Med. Biol.* 27:523-527.
- Marton Z., Halmosi R., Horvath B., Alexy T., Kesmarky G., Vekasi J., Battyany I., Hideg K. and Toth K. (2001) Scavenger effect of experimental and clinically used cardiovascular drugs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 38:745-753.
- Mehvar R. and Brocks D.R. (2001) Stereospecific pharmacokinetics and pharmacodynamics of beta-adrenergic blockers in humans. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 4:185-200.
- Menéndez J.C. (2001) Diseño de fármacos basado en la química de radicales libres. *In* Introduction a la Química Farmaceutica, Mc Graw Hill,

576-593.

- Mimic-Oka J., Simic D.V. and Simic T.P. (1999) Free radicals in cardiovascular diseases. *Medicine and Biology* 6:11-22.
- Mira L., Silva M. and Manso C.F. (1994) Scavenging of reactive oxygen species by silibinin dihemisuccinate. *Biochem. Pharmacol.* 48:753-759.
- Miura T., Muraoka S. and Fujimoto Y. (1999) Inhibition of lipid peroxidation by pindolol. *Pharmacol. Toxicol.* 84:130-134.
- Miyasaka N. and Hirata Y. (1997) Nitric oxide and inflammatory arthritides. *Life Sci.* 61:2073-2081.
- Mohanty J.G., Jaffe J.S., Shulman E.S. and Raible D.G. (1997) A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivate. *J. Immunol. Methods.* 202:133-141.
- Moncada S., Palmer R.M.J. and Higgs E.A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43:109-142.
- Murphy M., Packer M.A., Scarlett J.L. and Martin S.W. (1998). Peroxynitrite: A biologically significant oxidant. *Gen. Pharmacol.- Vasc. S.* 31:179-186.
- Murrant C.L. and Reid M.B. (2001) Detection of reactive oxygen and reactive nitrogen species in skeletal muscle. *Microsc. Res. Tech.* 55:236-248.
- Myhre O., Andersen J.M., Aarnes H. and Fonnum F. (2003) Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem. Pharmacol.* 65:1575-1582.
- Nagano T. (1999) Practical methods for detection of nitric oxide. *Luminescence.* 14:283-290.
- Nagata N., Momose K. and Ishida Y. (1999) Inhibitory effects of catecholamines and anti-oxidants on the fluorescence reaction of 4,5-diaminofluorescein, DAF-2, a novel indicator of nitric oxide. *J. Biochem.* 125:658-661.
- Nakatsubo N., Kojima H., Kikuchi K., Nagoshi H., Hirata Y., Maeda H., Imai Y., Irimura T. and Nagano T. (1998) Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins. *FEBS Lett.* 427:263-266.

- Nedospasov A., Rafikov R., Beda N. and Nudler E. (2000) An autocatalytic mechanism of protein nitrosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:13543–13548.
- Nève J., Parij N. and Moguilevsky N. (2001) Inhibition of the myeloperoxidase chlorinating activity by non-steroidal anti-inflammatory drugs investigated with a human recombinant enzyme. *Eur. J. Pharmacol.* 417:37-43.
- Newman-Tancredi A., Chaput C., Gavaudan S., Verrièle L. and Millan M.J. (1998) Agonist and antagonist actions of (-)pindolol at recombinant, human serotonin1A (5-HT1A) receptors. *Neuropsychopharmacology* 18:395-398.
- Nicotera P., Bernassola F. and Melino G. (1999) Nitric oxide (NO), a signaling molecule with a killer soul. *Cell Death Differ.* 6:931-933.
- Nussler A.K. e Billar T.R. (1993) Inflammation, immunoregulation and inducible nitric oxide synthase. *J. Leukoc. Biol.* 54:171-178.
- O'Donnell V.B., Eiserich J.P., Chumley P.H., Jablonsky M.J., Krishna N.R., Kirk M., Barnes S., Darley-Usmar V.M. and Freeman B.A. (1999) Nitration of unsaturated fatty acids by nitric oxide-derived reactive nitrogen species peroxynitrite, nitrous acid, nitrogen dioxide, and nitronium iron. *Chem. Res. Toxicol.* 12:83-92.
- Oetli K., Greilberger J., Zangger K., Haslinger E., Reibnegger G. and Jürgens G. (2001) Radical-scavenging and iron-chelating properties of carvedilol, an antihypertensive drug with antioxidative activity. *Biochem. Pharmacol.* 62:241-248.
- Ohyashiki T., Nunomura M. and Katoh T. (1999) Detection of superoxide anion radical in phospholipid liposomal membrane by fluorescence quenching method using 1,3-diphenylisobenzofuran. *Biochim. Biophys. Acta* 1421 131-139.
- Okajima T. and Ohsaka T. (2003) Chemiluminescence of lucigenin by electrogenerated superoxide ions in aqueous solutions. *Luminescence* 18:49-57.
- Oosthuizen M.M.J., Engelbrecht M.E., Lambrechts H., Greyling D. and Levy R.D. (1997) The effect of pH on chemiluminescence of different probes exposed to superoxide and singlet oxygen generators. *J. Biolumin. Chemilumin.* 12:277-284.
- Oosthuizen M.M.J. and Greyling D. (1999) Antioxidantes suitable for use with chemiluminescence to identify oxyradical species. *Redox Rep.* 4:277-290.
- Oosthuizen M.M.J. and Greyling D. (2001) Hydroxyl radical generation:

the effect of bicarbonate, dioxygen and buffer concentration on pH-dependent chemiluminescence. *Redox Rep.* 6:105-116.

- Padgett C.M. and Whorton A.R. (1995) Regulation of cellular thiol redox status by nitric oxide. *Cell Biochem. Biophys.* 27:157-177.
- Pardini R.S. (1995) Toxicity of oxygen from naturally occurring redox-active pro-oxidants. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 29:101-118.
- Persad S., Elimban V., Siddiqui F. and Dhalla N.S. (1999) Alterations in cardiac membrane β -adrenoceptors and adenylyl cyclase due to hypochlorous acid. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31:101-111.
- Peskin A.V. and Winterbourn C.C. (2001) Kinetics of the reactions of hypochlorous acid and amino acid chloramines with thiols, methionine and ascorbate. *Free Radic. Biol. Med.* 30:572-579.
- Plenge P. and Mellerup E.T. (2003) Pindolol and the acceleration of the antidepressant response. *J. Affect. Disord.* 75:285-289.
- Prütz W.A. (1996) Hypochlorous acid interactions with thiols, nucleotides, DNA and other biological substrates. *Arch. Biochem. Biophys.* 332:110-120.
- Radi R., Beckman J.S., Bush K.M. and Freeman B.A. (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 266:4244-4250.
- Radi R., Cosgrove T.P., Beckman B.A. and Freeman B.A. (1993) Peroxynitrite-induced luminol chemiluminescence. *Biochem J.* 290:51-57.
- Radi R., Cassina A., Hodara R., Quijano C. and Castro L. (2002) Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 33:1451-1464.
- Rao P.S., Lubber Jr J.M., Milinowicz J., Lalezari P and Mueller H.S. (1998) Specificity of oxygen radical scavengers and assessment of free radical scavenger efficiency using luminol enhanced chemiluminescence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150:39-44.
- Rique A.B.R., Soares E.A. e Meirelles C.M. (2002) Nutrição e exercício na prevenção e controle das doenças cardiovasculares. *Rev. Bras. Med. Esporte.* 8:244-254.
- Romero N., Denicola A., Souza J.M. and Radi R. (1999) Diffusion of peroxynitrite in the presence of carbon dioxide. *Arch Biochem. Biophys.* 368:23-30.

- Rost M., Karge E. and Klinger W. (1998) What do we measure with luminol-, lucigenin- and penicillin-amplified chemiluminescence? 1. Investigations with hydrogen peroxide and sodium hypochlorite. *J. Biolumin. Chemilumin.* 13:355-363.
- Rubbo H., Darley-Usmar V. and Freeman B.A. (1996) Nitric oxide regulation of tissue free radical injury. *Chem. Res. Toxicol.* 9:809-820.
- Santos M.R. and Mira L. (2004) Protection by flavonoids against the peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine. *Free Radic. Res.* 38:1011-1018.
- Schepetkin I. A. (1999) Lucigenin as a substrate of microsomal NAD(P)H-Oxidoreductases. *Biochemistry* 64:25-32.
- Sharov V.S., Driomina E.S., Briviba K. and Sies H. (1998) Sensitization of peroxynitrite chemiluminescence by triplet carbonyl sensitizer coumarin-525. Effect of CO₂. *Photochem. Photobiol.* 68:797-801.
- Sousa T., Fernandes E., Nunes C., Laranjinha J., Carvalho F., Pinho D., Morato M. and Albino-Teixeira A. (2005) Scavenging of nitric oxide by an antagonist of adenosine receptors. *J. Pharm. Pharmacol.* 57:399-404.
- Spiteller G. (2003) Are lipid peroxidation processes induced by changes in the cell wall structure and how are these processes connected with diseases? *Med. Hypotheses* 60:69-83.
- Squadrito G. and Pryor W.A. (1998) Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic. Biol. Med.* 25:392-403.
- Stamler J.S., Singel D.J. and Loscalzo J. (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258:1898-1902.
- Suzuki Y.J., Forman H.J., and Sevanian A. (1997) Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.* 22: 269- 285.
- Tadolini e Franconi (1998). Carvedilol inhibition of lipid peroxidation. A new antioxidative mechanism. *Free Rad. Res.* 29:377-387.
- Tan D.X., Reiter R.J., Manchester L.C., Yan M.T., El-Sawi M., Sainz R.S., Mayo J.C., Kohen R., Allegra M. and Hardeland R. (2002) Chemical and physical properties and potential mechanisms: Melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr. Top. Med. Chem.* 2:181-197.
- Taniyama Y and Griendling K.K. (2003) Reactive oxygen species in the vasculature. Molecular and cellular mechanisms. *Hypertension.* 42:1075-1081.

- Touyz R.M. (2004) Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells – implications in cardiovascular disease. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37:1263-1273.
- Touyz R.M. and Schiffrin E.L. (2004) Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem. Cell. Biol.* 122:339-352.
- Turjanski A.G., Saenz D.A., Doctorovich F., Estrin D.A. and Rosenstein R.E. (2001). Nitrosation of melatonin by nitric oxide: A computational study. *J. Pineal. Res.* 31:97-101.
- van Dam S. (2002) Oxidative stress and diabetic neuropathy: Pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 18:176–184.
- Valentão P., Fernandes E., Carvalho F., Andrade P.B., Seabra R.M. and Bastos M.L. (2001). Antioxidant activity of *Centaureum erythraea* infusion evidenced by its superoxide radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity. *J. Agri. Food Chem.* 49:3476-3479.
- Vásquez-Vivar J., Santos A.M., Junqueira V.B.C. and Augusto O. (1996) Peroxynitrite-mediated formation of free radicals in human plasma: EPR detection of ascorbyl, albumin-thiyl and uric acid-derived free radicals. *Biochem. J.* 314:869-876.
- Vaziri N.D. (2004) Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in chronic kidney disease and hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 13:93-99.
- Vendemiale G., Grattagliano I. and Altomare E. (1999) An update on the role of free radicals and antioxidant defence in human disease. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 29:49-55.
- von Bohlen und Halbach (2003) Nitric oxide imaging in living neuronal tissues using fluorescent probes. *Nitric oxide* 9:217-228.
- Wassmann S., Wassmann K. and Nickenig G. (2004) Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension* 44:381-386.
- Wattanapitayakul S.K., Weinstein D.M., Holycross B.J. and Bauer J.A. (2000) Endothelial dysfunction and peroxynitrite formation are early events in angiotensin-induced cardiovascular disorders. *FASEB J.* 14:271-278.
- Weber, V., Coudert P., Duroux E., Leal F., Couquelet J. and Madesclaire M. (2001) Synthesis and in vitro studies of pyrone derivatives as scavengers of active oxygen species. *Arzneimittel-forschung* 51:877-884.

- Wink D.A. and Mitchell J.B. (1998) Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* 25:434-456.
- Wollin S.D. and Jones P.J.H. (2003) α -Lipoic acid and cardiovascular disease. *J. Nutr.* 133:3327-3330.
- Yan L.-J., Traber M.G., Kobuchi H., Matsugo S., Tritschler H.J. and Packer L. (1996) Efficacy of hypochlorous acid scavengers in the prevention of protein carbonyl formation. *Arch. Biochem. Biophys.* 327:330-334.
- Yeung S.Y., Lan W.H., Huang C.S., Lin C.P., Chan C.P., Chang M.C. and Jeng J.H. (2002) Scavenging property of three cresol isomers against H_2O_2 , hypochlorite, superoxide and hydroxyl radicals. *Food Chem. Toxicol.* 40:1403-1413.
- Yoshioka T., Iwamoto N., Tsukahara F., Irie K., Urakawa I. and Muraki T. (2000) Anti-NO action of carvedilol in cell-free system and in vascular endothelial cells. *Br J Pharmacol.* 129:1530-1535.
- Yue T.-L., McKenna P.J., Ruffolo R.R. and Feuerstein G. (1992-a) Carvedilol, a new β -adrenoceptor antagonist and vasodilator antihypertensive drug, inhibits superoxide release from human neutrophils. *Eur. J. Pharmacol.* 214 :277-280.
- Yue T.-L., Cheng H.-Y., Lysko P.G., McKenna P.J., Feuerstein R., Gu J.-L., Lysko K.A., Davis L.L. and Feuerstein G. (1992-b) Carvedilol, a new vasodilator and *beta* adrenoceptor antagonist, is an antioxidant and free radical scavenger. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263:92-98.
- Zhang H., Squadrito G.L. and Pryor W.A. (1998) The reaction of melatonin with peroxynitrite: formation of melatonin radical cation and absence of stable nitrated products. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251:83-87.
- Zhang H., Squadrito G.L., Uppo R. and Pryor W.A. (1999) Reaction of peroxynitrite with melatonin: A mechanistic study. *Chem. Res. Toxicol.* 12:526-534.
- Zhang H., Bhargeva K., Keszler A., Feix J, Hogg N., Joseph J. and Kalyanaraman B. (2002) Transmembrane nitration of hydrophobic tyrosyl peptides. *J. Biol. Chem.* 278:8969-8978.
- Zhang C., Yang J., Jacobs J.D. and Jennings L.K. (2003) Interaction of myeloperoxidase with vascular NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species in vasculature: implications for vascular diseases. *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol.* 285: H2563-H2572.

- Zhu L., Gunn C. and Beckman J.S. (1992) Bactericidal activity of peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 298:452-457.
- Zou Y., Kim A.R., Kim J.E., Choi J.S. and Chung H.Y. (2002) Peroxynitrite scavenging activity of synapic acid (3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid) isolated from *Brassica juncea*. *J. Agric. Food Chem.* 50:5884-5890.