

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**



**MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO  
(MCC)**

TÍTULO: “Síntese e estudo da diapocinina como um inibidor da NADPH Oxidase em neutrófilos e células mononucleares de sangue periférico”

Orientador: Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes

Orientada: Michele Anselmo Maticoli

**BAURU - SP**

**Dezembro / 2009**

MICHELE ANSELMO MATICOLI

**Síntese e estudo da diapocinina como um inibidor da NADPH  
Oxidase em neutrófilos e células mononucleares de sangue  
periférico**

Monografia de Conclusão de Curso  
apresentada ao curso de  
Licenciatura Plena em Química, da  
Universidade Estadual Paulista Júlio  
de Mesquita Filho – UNESP, campus  
Bauru.

Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes

BAURU-SP

2009

Maticoli, Michele Anselmo.

Síntese e estudo da diapocinina como um inibidor da NADPH oxidase em neutrófilos e células mononucleares de sangue periférico / Michele Anselmo Maticoli, 2009. 47 f. : il.

Orientador: Valdecir Farias Ximenes

Monografia (Graduação)-Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2009

1. Espécies reativas de oxigênio. 2. Apocinina. 3. Diapocinina. I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências. II. Título.

**DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Jesus e Margarete.  
Meu irmão Lucas,  
Minha irmã Geovana (in memoriam),  
E ao meu marido Robson,  
Eu não teria feito nada sem vocês.  
Amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, primeiramente, a Deus pelas oportunidades e pela minha vida.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Valdecir, que sempre demonstrou uma paciência inigualável comigo, compreensão e disposição em me ajudar. Aprendi muito com ele e admiro muito sua dedicação e competência.

Aos meus pais, pela educação que me deram e por serem os grandes responsáveis por eu ter me tornado a pessoa que sou hoje. Sem o apoio deles não teria conseguido.

Ao Robson por fazer parte da minha vida, por me fazer muito feliz e sempre me apoiar, compreender, pelo seu amor e dedicação.

À minha avó, Maria, por ser uma avó muito presente, preocupada e carinhosa.

Aos meus tios Fátima e Ari, pelos conselhos, carinho, incentivo e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu tio José Roberto que sempre representou pra mim, um grande exemplo de superação e dedicação.

À minha prima Tatiana e ao meu irmão Lucas, vocês são muito especiais para mim.

Ao Adriano, meu amigo e parceiro na realização dos experimentos. Devo agradecê-lo por ter me ajudado e me aturado por todo este tempo. Valeu "carma".

Aos meus queridos amigos da faculdade e de laboratório: Camila, Daniele, Kátia, Fabiana, Fernanda e Mariana pela ajuda e pelo companheirismo. Com certeza nunca vou me esquecer os momentos que passamos juntos e as alegrias que vocês me proporcionaram, espero que continuem sempre presentes na minha vida.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a finalização deste trabalho.

“Nem tudo que se enfrenta pode ser modificado, mas nada pode ser modificado até que seja enfrentado.”

Albert Einstein

## RESUMO

Apocinina, um metoxi-catecol originalmente extraído da raiz da *Picrorhiza kurroa*, tem sido usado como inibidor do complexo NADPH oxidase em células fagocíticas e não fagocíticas. Seu mecanismo de inibição está ligado à sua prévia ativação através da ação de peroxidases levando a oxidação do produto dimérico, diapocinina. Neste estudo a diapocinina foi sintetizada e investigado o seu efeito como inibidor da NADPH oxidase em neutrófilos (PMN) ativados e células mononucleares de sangue periférico (PBMC). A síntese da diapocinina foi realizada pela oxidação da apocinina por persulfato de potássio em meio água durante 5 minutos em temperatura ambiente. O precipitado foi filtrado e lavado com água e metanol. Diapocinina foi caracterizada por espectrometria de massas. Os PMN e PBMC foram obtidos do sangue periférico de doadores saudáveis e purificados para sedimentação com gelatina ou por centrifugação com Histopaque<sup>®</sup>, as hemácias foram lisadas com água gelada ou cloreto de amônio. Diapocinina ou apocinina foram incubadas com zimosan opsonizado, para ativação dos PMNs e liberação de ânion superóxido, estes monitorados por ensaio quimiluminescente dependente de lucigenina. Descobrimos que diapocinina não era melhor inibidor do que a apocinina nos PMN. No entanto, diapocinina foi mais eficiente que apocinina como inibidor da NADPH oxidase em PBMC. Em conclusão, considerando que PBMC são relativamente pobres em peroxidases em comparação com PMN, nossos resultados são consistentes com a necessidade de oxidação de apocinina durante o seu efeito como inibidor da NADPH oxidase.

**Palavras-chave:** Diapocinina, Apocinina, NADPH Oxidase, Espécies Reativas de Oxigênio, Fagócitos.

## ABSTRACT

Apocynin, a methoxy-catechol originally extracted from the root of *Picrorhiza kurroa*, has been used as an inhibitor of the NADPH oxidase complex in phagocytic and nonphagocytic cells. Its mechanism of inhibition is linked to their prior activation through the action of peroxidases leading to oxidation of the dimeric product, diapocynin. In this study, dipocinina was synthesized and investigated its effect as an inhibitor of activation NADPH oxidase in neutrophils (PMN) and peripheral blood mononuclear cells (PBMC). The synthesis of diapocinina was performed by oxidation of apocinina by potassium persulphate in the midst of water for 5 minutes at room temperature. The precipitate was filtered and washed with water and methanol. Diapocinina was characterized by mass spectrometry. PMN and PBMC were obtained from peripheral blood of healthy donors and purified for gelatin sedimentation, or centrifugation with Histopaque ®, the red cells were lysed with ice water or ammonium chloride. Diapocinina or apocinina were incubated with opsonized zymosan, activation of PMNs and release of superoxide anion, these monitored by chemiluminescent assay dependent lucigenina. We found that diapocinina inhibitor was no better than the apocinina in PMN. However, diapocinina was more efficient than apocinina as an inhibitor of NADPH oxidase in PBMC. In conclusion, whereas PBMC are relatively poor compared with peroxidases PMN, our results are consistent with the need for oxidation apocinina for its effect as an inhibitor of NADPH oxidase.

**Keywords:** Diapocynin, Apocynin, NADPH Oxidase, Reactive Oxygen Species, Phagocytes.

## ÍNDICE DO TEXTO

1 INTRODUÇÃO .....	13
1.1 Neutrófilos e Monócitos .....	14
1.2 NADPH Oxidase .....	15
1.3 Estresse Oxidativo .....	18
1.4 Inibidores do Complexo Enzimático NADPH Oxidase .....	20
1.4.1 DPI (Cloreto de Difenilenoiodônio) .....	20
1.4.2 PR-39 .....	21
1.4.3 Apocinina e Diapocinina .....	22
1.4.4 Síntese da Diapocinina .....	24
2 OBJETIVOS .....	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS .....	27
3.1 Compostos Químicos e Solventes .....	27
3.2 Preparo de Soluções .....	27
3.3 Preparo do Zimosan Opsonizado .....	27
3.4 Síntese do Dímero da Apocinina .....	28
3.5 Análise da Apocinina e da Diapocinina .....	29
3.6 Obtenção das Células .....	29
3.7 Estudos Quimiluminescentes .....	31
4 RESULTADOS .....	33
4.1 Caracterização da Diapocinina por Espectrometria de Massas .....	33
4.2 Análise da Diapocinina por HPLC .....	34
4.3 Estudos Quimiluminescentes .....	35
4.3.1 Efeito da Apocinina e Diapocinina como Inibidores da Liberação de Superóxido por Neutrófilos Ativados .....	37
4.3.2 Efeito da Apocinina e Diapocinina como Inibidores da Liberação de Superóxido em Células Mononucleares de Sangue Periférico .....	39
5 DISCUSSÃO .....	41
6 CONCLUSÕES .....	43
REFERÊNCIAS .....	44

**LISTA DE FIGURAS**

1. Ativação do Complexo NADPH Oxidase.....	17
2. Produção de ROS e Reações em Neutrófilos Ativados. ....	18
3. Fórmula Estrutural do DPI.....	20
4. Fórmula Estrutural da Apocinina. ....	22
5: Sangue e Histopaque <sup>®</sup> antes da centrifugação.....	30
6: Fases do Sangue e Histopaque <sup>®</sup> depois da centrifugação.....	30
7: Foto do Luminômetro do Laboratório. ....	32
8: Espectros de massas da apocinina e diapocinina.....	34
9: Cromatogramas da Análise da Apocinina e da Diapocinina.....	35
10: Gráfico de cinética e do efeito da apocinina como inibidora.....	37
11: Gráfico da Inibição (em %) de Superóxido em PMN.....	38
12: Gráfico da Inibição (em %) de Superóxido em PBMC.....	40

**LISTA DE TABELAS**

1 – Significado das Abreviações dos Aminoácidos da PR-39.....	21
2 - Inibição (em %) de Superóxido pelas Substâncias em Neutrófilos.....	38
3 - Inibição (em %) de Superóxido pelas Substâncias em PBMC.....	39

**LISTAS DE ESQUEMAS**

1. Reação de Dimerização da Apocinina, Envolvendo MPO e  $H_2O_2$ ..... 23
2. Oxidação da Apocinina e Formação da Diapocinina..... 25
3. Reações Envolvendo Lucigenina na Detecção de Ânion Superóxido ..... 36

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

**$^1\text{O}_2$** : oxigênio singlete

**APO**: apocinina

**CAT**: catalase

**DIM**: diapocinina

**DMSO**: dimetilssulfóxido

**DPI**: diphenyleneiodonium Chloride (cloreto de difenilenoiodônio)

**ERO**: espécies reativas de oxigênio

**GPx**: glutathiona peroxidase

**$\text{H}_2\text{O}_2$** : peróxido de hidrogênio

**HClO**: ácido hipocloroso

**HO·**: radical hidroxila

**HPLC**: *high performance liquid chromatograph* (cromatografia líquida de alta eficiência)

**HRP**: horseradish peroxidase (peroxidase extraída de raiz forte)

**LC/MS**: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

**MPO**: mieloperoxidase

**NADPH**: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

**NO·**: óxido nítrico

**NOX**: NADPH oxidase

**$\text{O}_2^-$** : ânion radical superóxido

**ONOO·**: peroxinitrito

**PBMC**: células mononucleares de sangue periférico (monócitos)

**PBS:** *phosphate buffered saline* (tampão fosfato com cloreto de sódio na concentração fisiológica)

**PDA:** photodetector array (detector de arranjo de diodos)

**Phox:** proteínas componentes do complexo NADPH Oxidase

**PMN:** leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos)

**ROS:** *reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigênio)

**SOD:** superóxido dismutase

## 1 INTRODUÇÃO

Os radicais livres, espécies dotadas de elétrons desemparelhados são moléculas bastante instáveis e reativas. Para sua estabilização, reagem rapidamente com determinadas substâncias vizinhas. Em função disso, possuem meia vida curta, porém suficiente para desencadear reações que podem comprometer e danificar biomoléculas, células ou tecidos. Na literatura é crescente o surgimento de trabalhos que abordam o assunto nas suas várias vertentes. Grande parte dessas discussões correlaciona à produção excessiva dos radicais no organismo e seu envolvimento em várias doenças, tais como, diabetes, hipertensão, aterosclerose, doenças cardíacas, renais, pulmonares, eventos mutagênicos e até mesmo, carcinogênicos.

A produção de radicais livres pelo organismo é inevitável, pois muitas dessas espécies são oriundas do metabolismo do oxigênio. Os radicais livres que pertencem à classe das ERO, espécies reativas de oxigênio, também conhecidas por ROS, sigla de Reactive Oxygen Species, são intermediários oxidantes gerados em organismos vivos. Entre estes, pode-se citar ERO não radicalares como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso ( $HOCl$ ), peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ), oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) e radicalares como ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), radical perhidroxila ( $HO_2^{\cdot}$ ), radical alcóxila ( $RO^{\cdot}$ ) e radical peróxila ( $ROO^{\cdot}$ ). (GUZIK; HARRISON, 2006). Contrariando seus efeitos maléficos, as ERO também são essenciais para o desenvolvimento de algumas atividades fisiológicas absolutamente vitais como a proteção imune mediada por fagócitos e a regulação da pressão arterial pelo óxido nítrico. No caso da defesa inata do

organismo, os neutrófilos fazem uso da produção e do metabolismo das ERO para eliminar invasores patogênicos.

Nesse contexto, alguns compostos com propriedades antioxidantes estão sendo investigados devido a sua capacidade de neutralizar ou diminuir a toxicidade dessas espécies reativas. Este trabalho apresenta uma breve discussão sobre dois compostos evidenciados como inibidores de NADPH oxidase, principal fonte de ERO em células fagocíticas e não fagocíticas, a apocinina e o seu produto dimérico.

### **1.1 Neutrófilos e Monócitos**

Os leucócitos ou glóbulos brancos são células constituintes do sangue, produzidos, assim como os eritrócitos, na medula óssea. Os leucócitos são células responsáveis pela defesa do organismo contra agentes infecciosos e são subdivididos em dois grupos de células: os granulócitos e os agranulócitos. Dentro do primeiro grupo enquadram-se os neutrófilos, denominados também como polimorfonucleares (PMN). Os neutrófilos constituem aproximadamente de 50 a 70% da quantidade total de leucócitos e são evidenciados também pela sua capacidade de realizar fagocitose (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Os PMN se encaixam no grupo dos granulócitos por conterem em seu citoplasma grânulos específicos e também grânulos azurófilos. Os grânulos azurófilos recebem esse nome por corarem em tons de púrpura e são, na verdade, lisossomos (ROSS; ROWRELL, 1993). Na composição desses grânulos encontram-se muitas enzimas que contribuem para a morte do microorganismo, com destaque para a mieloperoxidase (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Esta peroxidase é capaz de converter peróxido de hidrogênio em ácido hipocloroso (WORM, 2001). Após a fagocitose e por meio da degranulação

a mieloperoxidase é liberada no interior do fagossomo. Para a formação dos produtos bactericidas a mieloperoxidase necessita da presença de halogênios, como  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$  (KLEBANOFF, 2005).



Os neutrófilos compõem a primeira linha de defesa e são os primeiros a chegarem ao local de inflamação. Além dos PMN, outra linha de células de defesa, os monócitos também realizam fagocitose e necessitam das ERO para desempenhar sua função (ROSS; ROWRELL, 1993). Os monócitos ficam no sangue por alguns dias, depois penetram em órgãos e sofrem maturação e são chamados de macrófagos. Tanto os neutrófilos como os macrófagos habitam o tecido conjuntivo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Na presença de um microorganismo, as células de defesa são chamadas aos locais de inflamação por sinalizadores químicos, ou seja, quimiotaxia (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Nesta condição ocorre um aumento no consumo de oxigênio da célula, processo antecessor a produção de ERO e conhecido como “burst” oxidativo ou explosão respiratória. Durante a explosão respiratória o oxigênio molecular consumido é convertido em ânion radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) (BABIOR, 1999).

## 1.2 NADPH oxidase

O complexo enzimático NADPH oxidase (NOX) é o responsável pela formação de ânion radical superóxido a partir do oxigênio consumido durante a explosão respiratória. Trata-se de um complexo composto por várias enzimas que são encontradas em células fagocíticas, como os neutrófilos, monócitos e

macrófagos, e células que não realizam fagocitose como as células endoteliais, fibroblastos, etc. (EL-BENNA et al., 2005).

O mecanismo de interação das subunidades da NADPH oxidase é mais conhecido nas células leucocitárias, já que o complexo multi-enzimático dos fagócitos é mais amplamente investigado (PARAVICINI; TOUYZ, 2008). Para formação da NADPH oxidase são necessárias várias proteínas, algumas presentes na membrana plasmática e outras, no citoplasma (KLEBANOFF, 2005). A proteína de membrana é uma flavoproteína conhecida como citocromo  $b_{558}$  e é constituída por uma glicoproteína designada por  $gp91^{phox}$  e um polipeptídeo, o  $p22^{phox}$ . As outras proteínas estão presentes no citoplasma da célula. São elas:  $p47^{phox}$ ,  $p67^{phox}$ ,  $p40^{phox}$ , Rac1. Para a ativação da NADPH oxidase (Figura 1), as proteínas citossólicas migram para a membrana plasmática, e se unem ao flavocitocromo  $b_{558}$  (BABIOR; LAMBETH; NAUSSEEF, 2002). A proteína  $p47^{phox}$  desempenha importante função de organizar e translocar os componentes citoplasmáticos para a junção com o citocromo  $b_{558}$ . Com a ativação da NADPH oxidase o oxigênio molecular recebe um elétron desse complexo, ou seja, é reduzido a  $O_2^-$  (XIMENES et al., 2007). A reação que ocorre é a seguinte:



## Ativação da NADPH oxidase

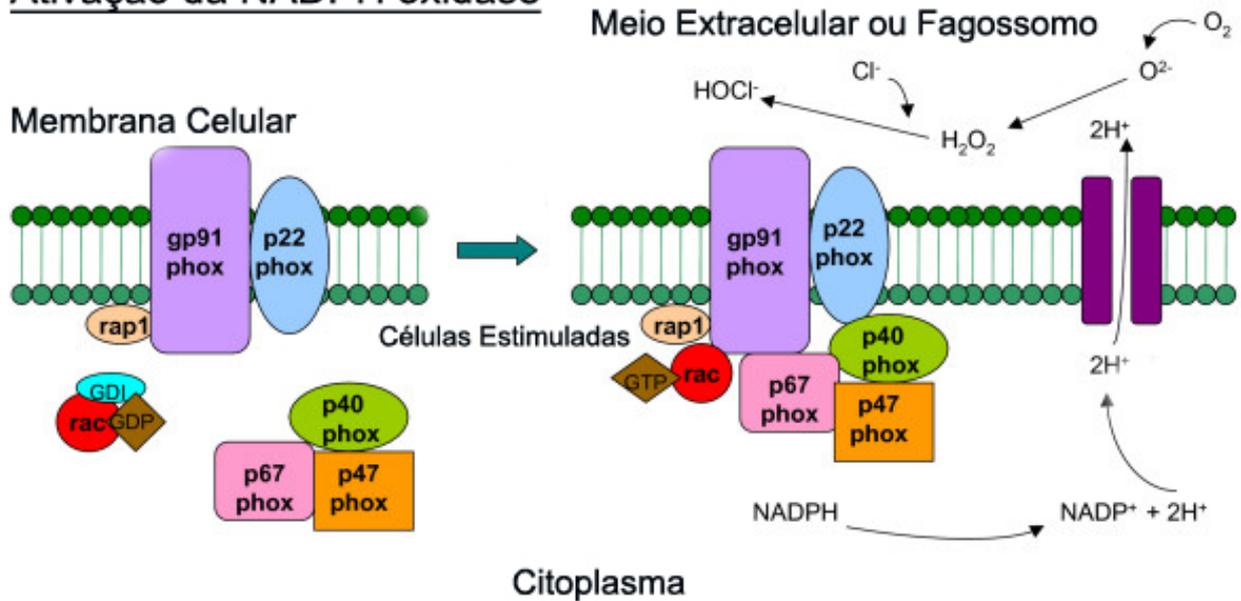
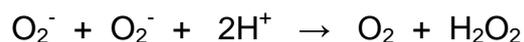


Figura 1. Ativação do Complexo NADPH Oxidase (MEDICAL IMMUNOLOGY).

É a subunidade gp91 que reduz o oxigênio molecular a ânion superóxido, é esta molécula que efetua, de fato, a transferência de elétrons para a molécula de O<sub>2</sub> (WORM, 2001).

Uma vez formado, o ânion superóxido pode sofrer uma reação de dismutação, pela enzima superóxido dismutase (SOD) e ser convertido em peróxido de hidrogênio (GOULART et al., 2007). A reação de dismutação é a seguinte (ANDRADRE Jr et al., 2005):



Após a formação do peróxido de hidrogênio e com a atividade catalítica da enzima mieloperoxidase, o ácido hipocloroso é formado e contribui para a eliminação do patógeno fagocitado (ROSS; ROWRELL, 1993). Portanto, após a

formação da espécie primária,  $O_2^-$ , várias reações podem ser desencadeadas e outras EROs são produzidas até que o microorganismo seja efetivamente eliminado (Figura 2) (GUZIK; HARRISON, 2006). Como exemplo de ERO originadas a partir do  $O_2^-$  pode-se citar: radical óxido nítrico ( $NO\cdot$ ), radical hidroxila ( $HO\cdot$ ), peroxinitrito ( $ONOO\cdot$ ), oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) (SIES, 1991).

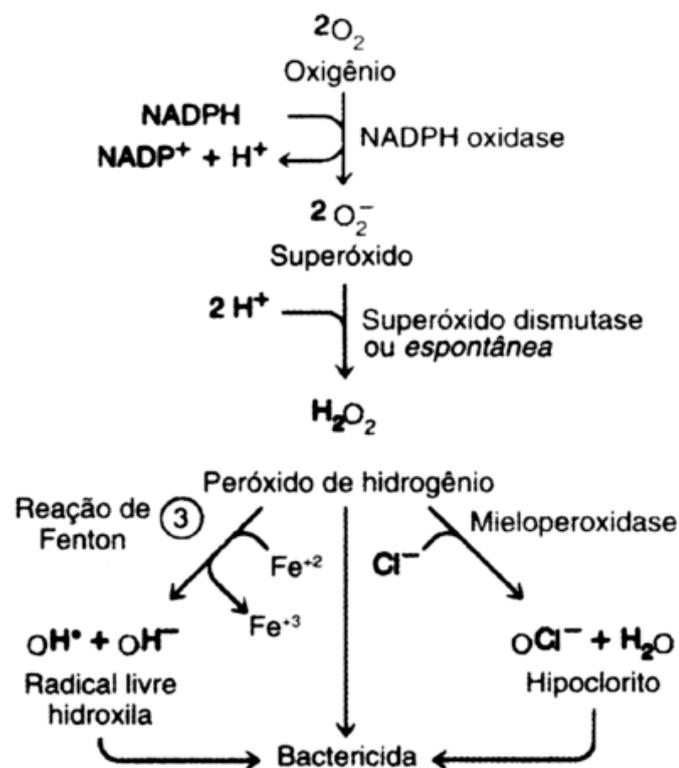


Figura 2. Produção de ROS e Reações em Neutrófilos Ativados (KLEBANOFF, 2005).

### 1.3 Estresse Oxidativo

O predomínio de radicais livres no organismo é conhecido como estresse oxidativo. Nestas condições, danos podem ser causados a células ou tecidos por meio dessas espécies. No caso da atividade dos fagócitos, as EROs podem ir para o meio extracelular, uma vez que a formação desses produtos muitas vezes se dá

antes do fagossomo se fechar completamente. Em casos onde a célula não consegue fagocitar o patógeno, ela também pode liberar as EROs para o espaço extracelular e, assim, danificar os tecidos adjacentes (SANTOS, 2007). É devido a esses eventos, a relação existente entre o estresse oxidativo e muitas doenças inflamatórias e degenerativas.

Substâncias conhecidas como antioxidantes desempenham a função de neutralizar ou diminuir a reatividade dos radicais, bem como das EROs. O estresse oxidativo é, portanto, resultado de um desequilíbrio entre os radicais livres e as substâncias antioxidantes, onde as espécies oxidantes se sobrepõem às antioxidantes (SIES, 1991).

O sistema de defesa antioxidante é subdividido em enzimático e não-enzimático. O enzimático é composto por enzimas que desempenham a função antioxidante. As que mais se destacam são: superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do ânion radical superóxido em peróxido de hidrogênio; a catalase (CAT), por sua vez, decompõe o peróxido de hidrogênio em oxigênio molecular e água; a glutathiona peroxidase (GPx), que age sobre peróxidos em geral e utiliza a glutathiona como cofator. As reações de cada enzima estão representadas abaixo:



Predominantemente, o sistema antioxidante enzimático está presente no interior das células. O sistema antioxidante não-enzimático, por sua vez, pode ser representado pelas vitaminas A, E, C e também pelo  $\beta$ -Caroteno. Esses compostos precisam ser absorvidos pelo organismo vivo através da alimentação (GOULART et al., 2007).

#### 1.4 Inibidores de NADPH Oxidase

Considerando a atividade da NADPH Oxidase, bem como a sua presença em diversos tecidos, a produção de ROS e relação desses eventos com doenças inflamatórias, algumas substâncias com propriedades antioxidantes têm sido investigadas como inibidoras deste complexo enzimático.

##### 1.4.1 DPI (Cloroeto de Difenilenoiodônio)

Constituído por dois anéis benzênicos e iodo, o DPI (Figura 3) caracteriza-se como sendo uma molécula bastante eletrofílica. É um sólido branco, bem solúvel em DMSO, possui peso molecular de 315,6.

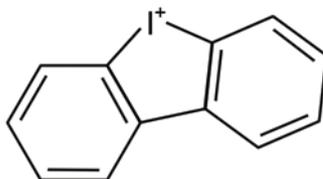


Figura 3. Fórmula Estrutural do DPI (SELEMIDIS et al., 2008).

O DPI pode formar radical fenila e ligar-se covalentemente com o grupo flavina. Esta ligação é irreversível e inibe a atuação da enzima FAD. Mesmo sendo

utilizado como inibidor da NADPH oxidase, o DPI pode também influenciar a atividade de outras enzimas e proteína, até mesmo das que não contém o grupo flavina (SELEMIDIS et al., 2008).

#### 1.4.2 PR-39

Alguns peptídeos também acabam inibindo o complexo NADPH oxidase. É o caso da PR-39, um peptídeo com 39 aminoácidos com alta porção de aminoácido prolina. A seqüência de aminoácidos da PR-39 está esquematizada da seguinte forma:

RRRPRPPYLPRRPPPPFFPRLPPRIPPGFPPRFPPRFP

A Tabela 1 correlaciona as letras com o nome dos aminoácidos que elas representam (LEHNINGER, 2002)

Tabela 1 – Significado das Abreviações dos Aminoácidos da PR-39.

Abreviação	Nome do Aminoácido
F	Fenilalanina
G	Glicina
I	Isoleucina
L	Leucina
P	Prolina
R	Arginina
Y	Tirosina

Dados da literatura indicam que a PR-39 se liga a subunidade da NADPH oxidase, p47<sup>phox</sup> e que essa interação bloqueia a ligação da p47<sup>phox</sup> com a p22<sup>phox</sup>. Acredita-se que a PR-39 se liga aos domínios SH3 da p47<sup>phox</sup>, o que acaba por impedir a junção e ativação da enzima NADPH Oxidase (SELEMIDIS et al., 2008).

### 1.4.3 Apocinina e Diapocinina

A apocinina ou acetovanilona (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona) tem sido testada como inibidora da geração de EROs produzidas pela ativação do complexo NADPH oxidase em fagócitos e não fagócitos. Esta substância não tóxica foi isolada da raiz da planta *Picrorhiza Kurroa* em 1971 por Basu e seus colaboradores. A *P. Kurroa* é uma planta originária do Himalaia, muito utilizada na medicina Ayurveda. Apocinina teve seu potencial antiinflamatório reconhecido em 1990 por Simons et al. (SELEMIDIS et al., 2008).

A apocinina (Figura 4) é um metoxi-catecol com peso molecular de 166,17 sendo muito solúvel em água quente e em solventes orgânicos (éter, álcool, clorofórmio, DMSO, benzeno) (WORM, 2001).

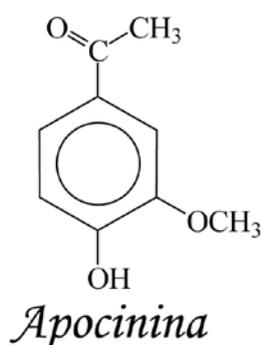
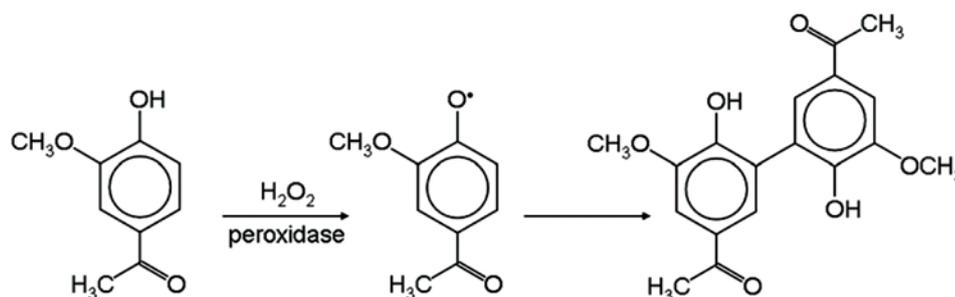


Figura 4. Fórmula Estrutural da Apocinina.

O mecanismo de ação dessa substância ainda não está claramente definido. Porém, há suposições de que antes de agir a apocinina seja convertida no seu dímero, trivialmente chamado de diapocinina, e que este seja o responsável pela inibição (WORM et al., 2001). Outra suposição é que o intermediário formado durante processo de dimerização, a forma radicalar da substância, seja o composto ativo. Isso implica dizer que para se ter um efeito inibitório a reação de dimerização precisa ocorrer (SELEMIDIS et al., 2008).

Na presença de MPO e  $H_2O_2$ , a apocinina é oxidada. A reação de oxidação da apocinina resulta na formação do seu dímero e também trímero (Esquema 1).



Esquema 1. Reação de Dimerização da Apocinina, Envolvendo MPO e  $H_2O_2$  (SELEMIDIS et al., 2008).

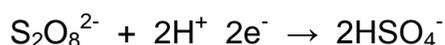
Sabe-se que na presença da substância apocinina, o componente citoplasmático da NADPH oxidase,  $p47^{phox}$  é impedido de migrar para a membrana. Uma vez que o componente  $p47^{phox}$  não se desloca para membrana plasmática, os outros componentes também ficam impedidos de se unir ao citocromo  $b_{558}$  e, por conseguinte não ocorre a ativação da NADPH oxidase (STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008).

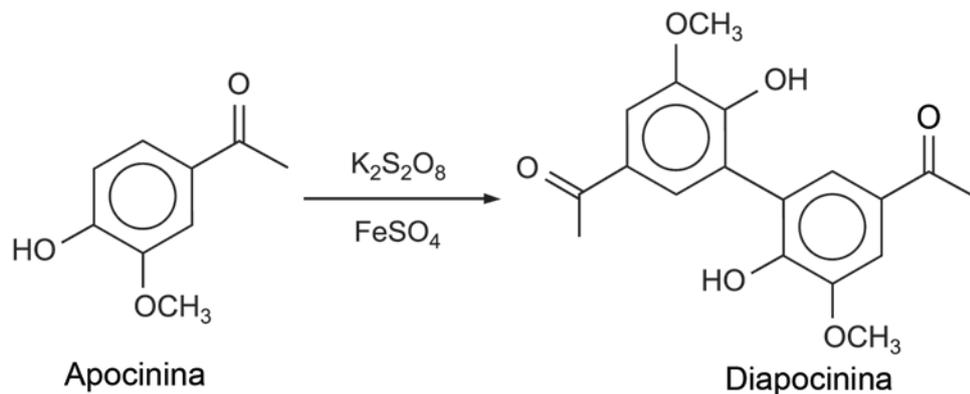
Em 2007, Ximenes e seus colaboradores propuseram um mecanismo de inibição para a molécula. Este mecanismo se baseia na formação radicalar da apocinina, a partir da reação com MPO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, seguido da formação da glutathiona radicalar (GS). Esta pode comprometer os grupos tiois da p47<sup>phox</sup>, inativando a proteína e, conseqüentemente, desencadeando o evento inibitório (XIMENES et al., 2007).

#### 1.4.4 Síntese da Diapocinina

A apocinina é uma substância que pode ser oxidada e, dessa forma, gerar o seu dímero (Esquema 2). Com a utilização do persulfato de potássio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) e de sulfato de ferro II (FeSO<sub>4</sub>), a reação de oxidação ocorre rapidamente (SMITH et al., 2008a), (SMITH et al., 2008b).

Neste caso o Fe<sup>2+</sup> age como catalisador da reação:





Esquema 2. Oxidação da Apocinina e Formação da Diapocinina (SMITH et al., 2008a).

A hipótese de que a diapocinina é a responsável pela inibição do complexo NADPH oxidase em fagócitos é evidenciada pelo fato destas células possuírem quantidades significativas de MPO. Esta peroxidase é capaz de desencadear a reação de formação da diapocinina (XIMENES et al., 2007).

Porém, comparando os fagócitos, neutrófilos e monócitos, as quantidades de mieloperoxidase são distintas em cada um deles. Os neutrófilos possuem uma quantidade consideravelmente maior de grânulos azurófilos, conseqüentemente, maior concentração de MPO (KLEBANOFF, 2005), (PEDRO, 2003). Isto implica dizer que a apocinina pode agir como um inibidor da ativação da NADPH oxidase, com maior eficiência em neutrófilos do que em monócitos.

Considerando esses propósitos, nesse estudo, sintetizou-se a diapocinina e sua ação inibitória foi investigada em neutrófilos e monócitos (PBMC), comparativamente com a apocinina.

## **2 OBJETIVOS**

Nesse estudo, a diapocinina foi sintetizada e investigou-se seus efeitos como inibidor da ativação do complexo NADPH oxidase em neutrófilos (PMN) e em células mononucleares de sangue periférico (PBMC).

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS**

#### **3.1 Compostos químicos e solventes**

Apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona), sulfato de ferro II ( $\text{FeSO}_4$ ), persulfato de potássio, acetona, pentano, Histopaque<sup>®</sup>-1077 e Histopaque<sup>®</sup>-1119, zimosan e lucigenina foram obtidos da companhia Sigma-Aldrich.

Os sais utilizados na preparação de tampões foram de grau analítico e solventes utilizados na preparação de fases móveis, de grau cromatográfico e obtidos no mercado nacional.

#### **3.2 Preparo de Soluções**

Foi preparada uma solução estoque de lucigenina 3 mM. As soluções estoque de apocinina e diapocinina foram obtidas pela dissolução das substâncias em água com adição de NaOH para ajudar na solubilização. Preparou-se também o tampão fosfato salino (PBS) com pH próximo de 7,4. Para a suplementação do PBS preparou-se as soluções estoques de d-glicose-anidra 100 mg/mL,  $\text{CaCl}_2$  100 mM e  $\text{MgCl}_2$  50 mM. O PBS era suplementado e as concentrações finais dos seus componentes eram: glicose 50 mM  $\text{CaCl}_2$  1,0 mM e  $\text{MgCl}_2$  0,5 mM.

#### **3.3 Preparo do zimosan opsonizado**

Pesou-se 10 mg de zimosan que foi ressuspendido em 10 mL de solução salina. Essa solução foi levada à fervura em banho-maria por trinta minutos.

Passado esse tempo a suspensão foi centrifugada a 373 G por 5 minutos e ressuspendida em 5 mL de PBS.

No dia do uso, essa solução foi novamente centrifugada a 373 G durante 5 minutos. Após a centrifugação, o precipitado foi ressuspendido em 1 mL de soro sanguíneo (mistura de três soros de pessoas diferentes). Essa solução foi incubada em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Após a incubação, centrifugou-se novamente a solução e o precipitado obtido foi lavado por 3 vezes com PBS. Depois das lavagens, o precipitado foi ressuspendido em 1 mL de PBS. Essa solução de zimosan está opsonizada e pronta para o uso.

### **3.4 Síntese do Dímero da Apocinina**

Uma massa de 2 g de apocinina foi dissolvida em 200 mL água, levada ao aquecimento sob agitação constante. Após sua total diluição foi adicionado 0,15 g sulfato ferroso e 1,6 g persulfato de potássio. Houve a formação de um precipitado marrom. Após 5 minutos sob agitação, o precipitado formado foi filtrado a quente e a vácuo.

Para a purificação da diapocinina, o filtrado foi dissolvido com uma solução de hidróxido de amônia 3 M. Em seguida, a solução foi reprecipitada pela adição de ácido clorídrico 6 M em banho de gelo. Lavou-se o filtrado por três vezes com água morna e também com metanol. Após as lavagens o filtrado foi colocado em um dessecador para secagem (SMITH et al., 2008a).

### 3.5 Análise da Apocinina e da Diapocinina

A pureza da diapocinina foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e caracterizada por espectrometria de massas.

Para o HPLC utilizou-se uma coluna de fase reversa C18 e fase móvel 48/52/0,31 (v/v/p) de metanol/água/acetato de amônio (SMITH et al., 2008a). Padrões de apocinina e do seu dímero foram preparados com concentração de 0,1 mM e injetadas em HPLC com detectores PDA e fluorescência. Na análise, o fluxo foi de 0,5 mL/min e o tempo de eluição foi de 20 minutos.

### 3.6 Obtenção das Células

Os PMN e PBMC foram obtidos do sangue periférico de doadores saudáveis e isolados por meio da centrifugação do sangue utilizando um gradiente de densidade com Histopaque<sup>®</sup>. Foram coletados 20 mL de sangue com heparina e adicionou-se 10 mL de tampão PBS. Em um tubo falcon foi adicionado 10 mL Histopaque<sup>®</sup>- 1119 e sobre este, cuidadosamente, adicionou-se mais 10 mL Histopaque<sup>®</sup>- 1077. Em seguida o sangue foi adicionado, vagarosamente, sobre as duas fases de Histopaque<sup>®</sup>. O volume total no tubo falcon foi de 50 mL. O material foi centrifugado a 598 G durante 30 minutos a 25°C. Após a centrifugação obtiveram-se várias fases que compreendem (de cima para baixo no tubo) o plasma sanguíneo, as células PBMC, as células PMN e as hemácias. A figura 5 mostra como fica a disposição do sangue e do Histopaque<sup>®</sup> antes da centrifugação.



Figura 5: Sangue e Histopaque® antes da centrifugação (LABORATÓRIO DE FISIOLOGIA CELULAR DA UFRGS).

Já a figura 6 traz uma imagem das diversas fases obtidas depois da centrifugação.

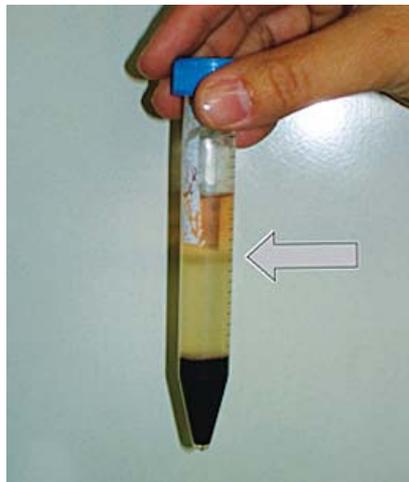


Figura 6: Fases do Sangue e Histopaque® depois da centrifugação (LABORATÓRIO DE FISIOLOGIA CELULAR DA UFRGS).

Os PMN e PBMC foram colocados isoladamente em tubos falcon limpos e secos. As células foram lavadas com solução salina e centrifugadas a 373 G por 5

minutos. Junto com os PMN era comum aparecer traços de hemácias, estas eram lisadas com água gelada. Para isso, adicionou-se às células de 1 a 2 mL de água previamente gelada, passado 1 minuto o volume do tubo foi completado com solução salina, NaCl 0,15 M. A lise das hemácias também foi feita com NH<sub>4</sub>Cl 0,83 %, porém a água gelada tinha o mesmo efeito e a vantagem de que era desnecessário realizar lavagens nas células para eliminar os traços do cloreto de amônio. Em seguida, as células foram levadas à centrifugação mais uma vez a 373 G por 5 minutos.

Após a separação, tanto monócitos quanto neutrófilos foram ressuspensos em PBS enriquecido com solução de CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, glicose e gelatina 0,1%. Para evitar o grume das células foi indispensável o uso da solução de gelatina. A gelatina deve ser preparada em solução salina, NaCl 0,15 M.

Para contagem das células, 20 µL destas foi acrescido de 380 µL de solução de Lázarus. Após homogeneização uma alíquota desta solução foi colocada na câmara de Neubauer e esta, levada ao microscópio para posterior contagem dos quadrantes.

### **3.7 Estudos Quimiluminescentes**

Nessa etapa do estudo, utilizou-se microplacas brancas opacas de 96 poços com capacidade máxima para 300 µL/poço. Depois de isoladas e contadas, as células foram levadas às microplacas e pré-incubadas com as drogas por 10 minutos a 37°C. As células foram estimuladas com zimosan opsonizado.

Nos ensaios com PBMC, 2,0x10<sup>6</sup> células/mL foram estimuladas com 1 mg/mL de zimosan e incubadas com a apocinina e seu dímero em diferentes

concentrações, em PBS a 37°C. As mesmas condições foram adotadas para os polimorfonucleares, mas a concentração de células utilizada foi de  $4,0 \times 10^6$  células/mL.

Monitorou-se a produção de ânion radical superóxido pelas células por quimiluminescência. Isso foi possível através do uso de lucigenina, uma sonda específica para detectar radicais ânions superóxido. A concentração da sonda nos ensaios foi de 10  $\mu$ M.

As reações foram levadas ao luminômetro BIOOrbit 1251 (Turku, Finland). As reações foram monitoradas no aparelho por 30 minutos. A área sobre a curva serviu como parâmetro analítico. A figura 5 é uma foto do luminômetro utilizado para as medidas.

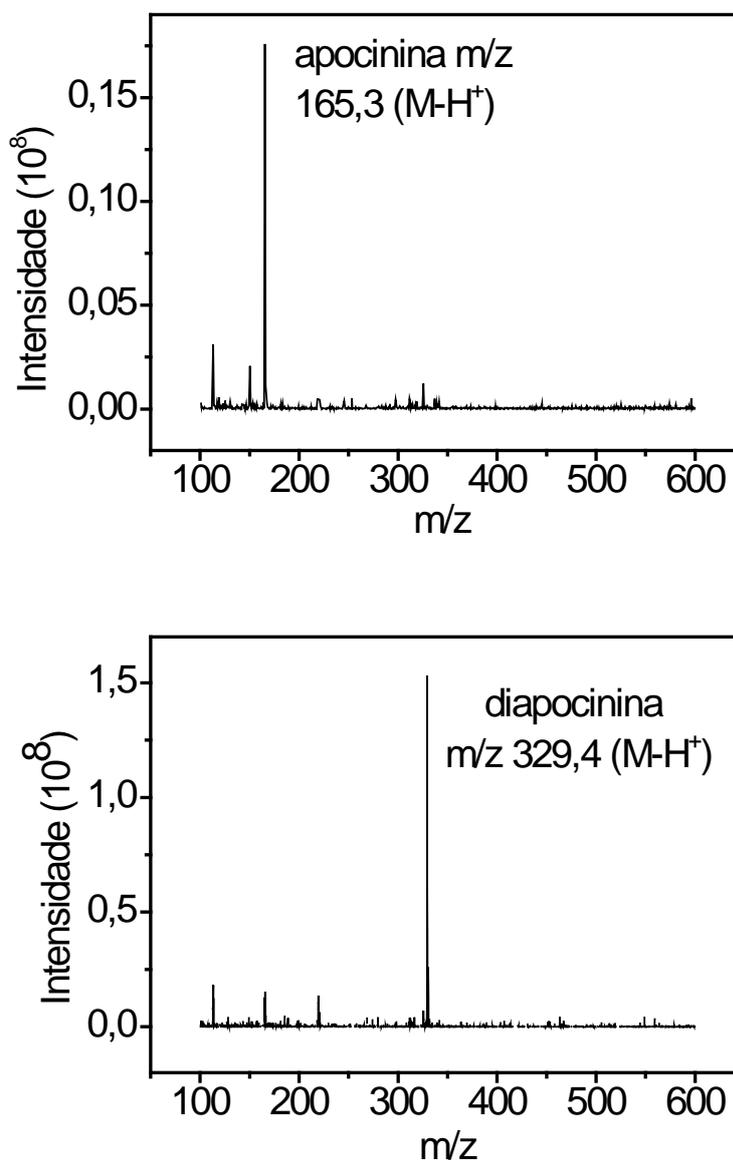


Figura 7: Foto do Luminômetro do Laboratório.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização da diapocinina por espectrometria de massas

A diapocinina sintetizada, bem como a apocinina, foi caracterizada por espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida (LC-MS). Este procedimento não foi realizado em nosso laboratório. Após a síntese o composto foi enviado ao laboratório de Farmacocinética de Araraquara (UNESP) para a realização das análises. Os espectros com a caracterização dos compostos estão mostrados a seguir (Figura 8). A apocinina possui massa molecular de 166,17 g/mol, já o seu dímero possui massa molecular de 330,3 g/mol. Os dados obtidos nos espectros estão condizentes com os valores teóricos.

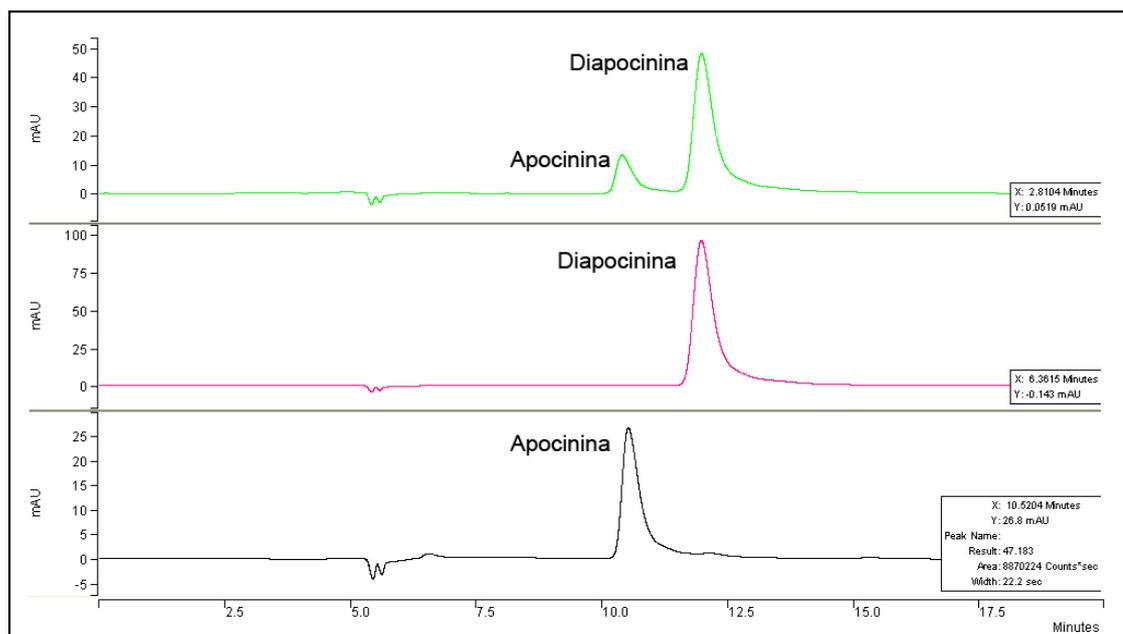


**Figura 8: Espectros de massas da apocinina e diapocinina.** Condições: As amostras purificadas (10µg/ml) foram injetadas (10 µL/min) no espectrômetro de massa (Quatro II Micro, Triplo quadrupolo, Micromass, Manchester, Reino Unido), equipado com uma fonte de ionização eletrôn-spray. O espectrômetro de massa foi operado com ionização negativa no modo de varredura completa (100 - 600 m/z). A Tensão do Spray de elétrons foi fixada em 4,5 kV, a temperatura do capilar em 150 ° C e fluxo do gás de dessolvação fixado em 300 L/h.

#### 4.2 Análise da diapocinina por HPLC

Este procedimento foi realizado no nosso laboratório conforme descrição no item materiais e métodos experimentais. Após o acerto das condições do HPLC, iniciaram-se as análises das amostras. Para isso, foram preparadas as soluções

padrão de diapocinina e apocinina. Esses padrões foram preparados em água e para auxiliar na diluição adicionou-se uma solução de NaOH 0,1 M até completa dissolução. A figura 9 mostra o perfil cromatográfico dos padrões de apocinina e diapocinina, ambos na concentração de 0,1 mM.



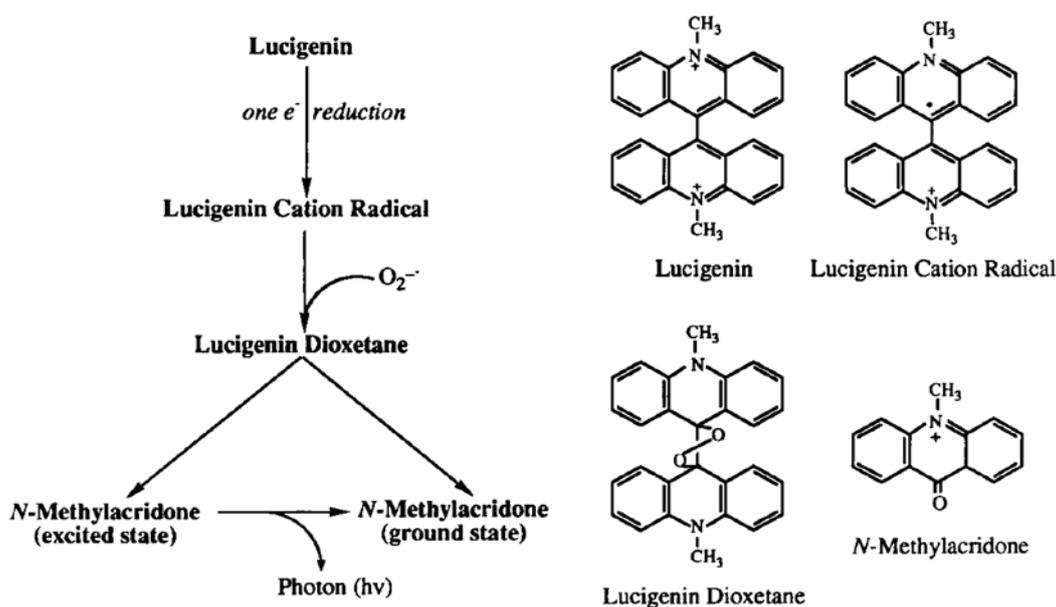
**Figura 9: Cromatogramas da Análise da Apocinina e da Diapocinina.**

Condições: Coluna de fase reversa C18, fluxo de 0,5 ml/min em 48/52/0,31 (v/v/p) de metanol/água/acetato de amônio.

### 4.3 Estudos Quimiluminescentes

Para os estudos com as células várias tentativas foram realizadas até acertar as condições dos ensaios. O zimosan opsonizado foi utilizado como estímulo para a produção de superóxido pelas células. Este composto é um carboidrato insolúvel obtido da parede celular de bactérias. No processo de opsonização, anticorpos e proteínas do sistema de defesa presentes no plasma sanguíneo se ligam ao zimosan tornando-o capaz de ser reconhecido pelos fagócitos e, dessa forma, iniciando a produção de ERO.

A sonda específica para detectar ânion radical superóxido utilizada foi a lucigenina, composto que na presença de  $O_2^-$ , gera um composto no estado excitado e posteriormente libera fótons ( $h\nu$ ). Os fótons gerados são detectados pelo luminômetro (TRUSH et al., 1998). O esquema 3 apresenta as reações envolvendo a sonda lucigenina.



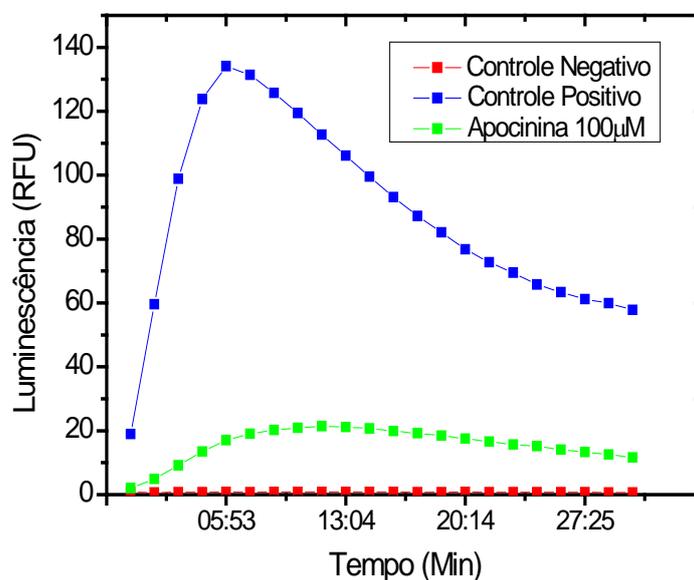
Esquema 3. Reações Envolvendo Lucigenina na Detecção de Ânion Superóxido (TRUSH et al., 1998).

A apocinina e seu dímero foram testados comparativamente. Para calcular a inibição causada pelas substâncias, foram feitos controles nos quais as células eram estimuladas na ausência dos inibidores. Assim, os valores obtidos correspondiam à produção de superóxido pelas células. Quando as células eram incubadas com as substâncias inibidoras, os valores obtidos eram menores, indicando que havia inibição ou supressão da produção de superóxido.

A fórmula utilizada para o cálculo da inibição foi a seguinte:

$$\frac{\text{Área do Controle} - \text{Área encontrada}}{\text{Área do Controle}} \times 100$$

A Figura 10 ilustra a cinética de emissão da reação e também o efeito da apocinina no processo de inibição do ânion radical superóxido em neutrófilos.



**Figura 10: Gráfico de cinética e do efeito da apocinina como inibidora.**

Condições: PMN ( $4 \times 10^6$  cel/mL), lucigenina  $10 \mu\text{M}$  e zimosan opsonizado ( $1 \text{ mg/mL}$ ) foram incubados em PBS a  $37^\circ\text{C}$  por 30 min. As reações foram realizadas no luminômetro BIOOrbit 1251 (Turku, Finland).

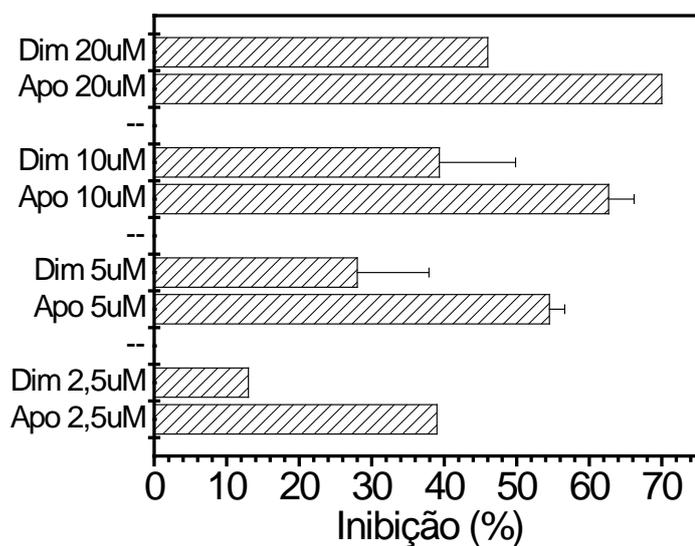
#### **4.3.1 Efeito da apocinina e diapocinina como inibidores da liberação de superóxido por neutrófilos ativados**

Neste ensaio observou-se a inibição ou supressão da produção de superóxido pelos neutrófilos. A Tabela 2 mostra as concentrações das drogas usadas, bem como as médias da inibição de superóxido em porcentagem.

Tabela 2 - Inibição (em %) de Superóxido pelas Substâncias em Neutrófilos.

Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Inibição (%)			
	Apocinina	Desvio Padrão	Diapocinina	Desvio Padrão
2,5	39	-	13	-
5,0	54,5	2,12	28	9,89
10,0	62,6	3,51	39,3	10,50
20,0	70	-	46	-

Os valores da Tabela 2 estão representados graficamente na Figura 11.



**Figura 11: Gráfico da Inibição (em %) de Superóxido em PMN.** Condições: PMN ( $4 \times 10^6$  cel/mL), lucigenina 10  $\mu\text{M}$  e zimosan opsonizado (1 mg/mL) foram incubados em PBS a 37°C por 30 min. As reações foram realizadas no luminômetro BIOOrbit 1251 (Turku, Finland). A área sobre a curva serviu como parâmetro analítico.

#### **4.3.2 Efeito da apocinina e diapocinina como inibidores da liberação de superóxido em células mononucleares de sangue periférico**

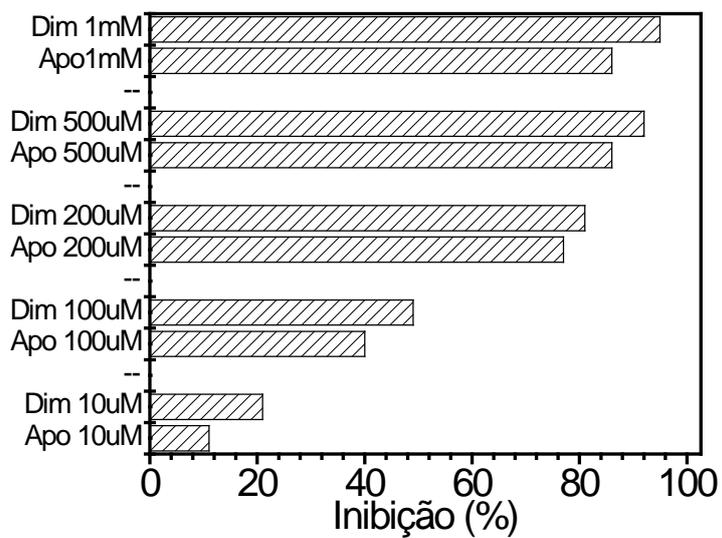
O mesmo procedimento feito com os PMN foi realizado com as células mononucleares de sangue periférico (PBMC). De modo que tornasse possível comparar a produção de superóxido nos dois tipos de células quando incubadas com a apocinina e o seu dímero.

Os valores de concentração da apocinina e diapocinina utilizadas juntamente com as médias da porcentagem de inibição estão contidos na Tabela 3.

Tabela 3 - Inibição (em %) de Superóxido pelas Substâncias em PBMC.

<b>Concentração (<math>\mu</math>M)</b>	<b>Inibição</b>	
	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>
	Apocinina	Diapocinina
10	11	21
100	40	44,5
200	74	81
500	86	92
1000	87	95

Os dados apresentados na Tabela 3 compõem o gráfico apresentado na Figura 12.



**Figura 12: Gráfico da Inibição (em %) de Superóxido em PBMC.** Condições: PBMC ( $2 \times 10^6$  cel/mL), lucigenina  $10 \mu\text{M}$  e zimosan opsonizado ( $1 \text{ mg/mL}$ ) foram incubados em PBS a  $37^\circ\text{C}$  por 30 min. As reações foram realizadas no luminômetro BIOOrbit 1251 (Turku, Finland). A área sobre a curva serviu como parâmetro analítico.

## 5 DISCUSSÃO

Com o objetivo de verificar a inibição da ativação do complexo enzimático NADPH oxidase dos dois tipos de fagócitos, ou seja, neutrófilos e monócitos, a apocinina e diapocinina foram incubadas com os mesmos. A ativação das células com zimosan opsonizado leva a produção do ânion radical superóxido, ou seja, promove a ativação do complexo NADPH oxidase. Nossos estudos, embora preliminares, mostram a capacidade que a apocinina e a diapocinina desempenham como inibidores deste processo.

Os resultados presentes na literatura científica indicam que a ação da apocinina como inibidora do complexo NADPH oxidase está relacionada à sua metabolização via ação catalítica de peroxidases resultando na produção de seu dímero, ou seja, a diapocinina (WORM et al., 2001). Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com a literatura, uma vez que a comparação da inibição da apocinina e diapocinina parece depender do tipo celular estudado. Especificamente deve-se considerar que os neutrófilos apresentam grânulos azurófilos com alto conteúdo da enzima MPO. Sob ativação, estas células lançam MPO ao meio extracelular (KLEBANOFF, 2005). Como se sabe, esta peroxidase é capaz de oxidar a apocinina levando a produção de diapocinina (XIMENES et al., 2007). Portanto, nos neutrófilos a apocinina pode ser rapidamente oxidada em diapocinina e, como resultado, a diferença do potencial inibitório entre apocinina e diapocinina pura poderia ser reduzida ou inexistente, como de fato, os nossos resultados parecem indicar. As células mononucleares, por sua vez, não possuem quantidades significativas de MPO como os neutrófilos (PEDRO, 2003). Assim, pode-se esperar que a eficiência de oxidação da apocinina seja menor nestas células. Portanto, se a

oxidação da apocinina à diapocinina é de fato fundamental para o seu mecanismo de ação, então tais células poderiam ser mais susceptíveis a presença da diapocinina pura. Isso de fato parece ocorrer como os nossos resultados, embora preliminares, parecem indicar.

## 6 CONCLUSÕES

1. Suposições quanto ao mecanismo de inibição da NADPH oxidase pela apocinina deve considerar o tipo de células estudadas.
2. A concentração de MPO das células influencia na conversão da apocinina a diapocinina.
3. Nos neutrófilos a apocinina pode ser oxidada a diapocinina e a ocorrência desta reação no meio intracelular pode contribuir significativamente para a inibição do complexo NADPH oxidase. A reação de oxidação da apocinina é favorecida pelo alto teor de mieloperoxidase que essas células possuem.
4. Nos monócitos, PBMC, o uso da diapocinina sintetizada favoreceu a inibição da NADPH oxidase. Nesse caso, a apocinina apresentou um desempenho menos eficiente no efeito inibitório, ocorrência que pode ser explicada pela baixa concentração de MPO nesta linha de células.

## 7 REFERÊNCIAS

ANDRADE Jr., D.R. et al. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. , v.31, n.1, p.60-68, jan./fev. 2005.

BABIOR, B.M. NADPH Oxidase: an update. **Blood**. v.93, n.5, p.1464-76, mar.1999.

BABIOR, B.M.; LAMBETH, J.D.; NAUSEEF, W. The neutrophil NADPH oxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.397, n.2, p. 342-344, jan. 2002.

EL-BENNA, J. et al. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defense. **Archvum Immunologiae et Therapiae Experimentalis** v.3, n.53, p. 199-206, maio./jun. 2005.

GOULART, M.O.F. et al. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**. v.15, n.00, jul. 2007.

GUZIK, T.J.; HARRISON, D.G. Vascular NADPH oxidases as drug targets for novel antioxidant strategies. **Drug Discovery Today**. v.11, n.11/12, jun. 2006.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 225 -228.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: Friend and Foe. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 77, n. 5, p. 598-625, maio. 2005.

LABORATÓRIO DE FISILOGIA CELULAR DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. **Histopaque Antes**. Disponível em:  
<<http://chasqueweb.ufrgs.br/~pauloivo/arqs/grupo/Histopaque%20antes.jpg>> Acesso em: 12 Nov. 2009.

LABORATÓRIO DE FISILOGIA CELULAR DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. **Histopaque Depois**. Disponível em:  
< <http://chasqueweb.ufrgs.br/~pauloivo/arqs/grupo/Histopaque%20depois.jpg>> Acesso em: 12 Nov. 2009.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 3 ed. São Paulo: Savier, 2007. p. 89-93.

MEDICAL IMMUNOLOGY. **Figura 1.** Disponível em: <<http://www.medimmunol.com/content/5/1/4/figure/F1>> Acesso em: 17 Fev. 2009.

PARAVICINI, T.M.; TOUYZ, R.M. NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species and Hypertension **Diabetes Care.** v. 31, Suppl 2, p. 170-180, fev. 2008.

PEDRO, A. J. et al. Mieloperoxidase como marcador de Stress Oxidativo na Cirrose Hepática. **Jornal Português de Gastreterologia.** v. 10, n. 4 p. 209-214, jul/ago. 2003.

ROSS, M.H.; ROWRELL, L.J. **Histologia Texto e Atlas.** 2. ed. São Paulo: Panamericana, 1993. 186-201p.

SANTOS, Karina Cunha dos. **Análise Proteômica comparativa entre neutrófilos não ativados e neutrófilos ativados com PMA, um análogo do diacilglicerol.** 2007.110f. Dissertação (pós-graduação) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2007.

SELEMIDIS, S. et al. NADPH oxidases in the vasculature: Molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. **Pharmacology and Therapeutics.** v.120, n. 3, p.254-291, dez. 2008.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **American Journal of Medicine.**, v. 91, suppl 3C, p.31-38, 1991.

SMITH, R. E. et al. Dose Formulation and Analysis of Diapocynin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v. 56, n. 2, p. 301-306, jan. 2008.

SMITH, R. E. et al. Synthesis of Diapocynin. **Journal of Chemical Education.** v. 83, n. 3, p. 411-412, mar. 2008.

STEFANSKA, J.; PAWLICZAK, R. Apocynin: Molecular Aptitudes. **Mediators of Inflammation.** dez. 2008.

TRUSH, M.A. et al. Validation of Lucigenin (Bis-N-methylacridinium) as an Chemilumigenic Probe for Detecting Superoxide Anion Radical Production by Enzymatic and Cellular Systems. **The Journal Biological Chemistry.** v. 273, n. 4, p.2015-2023, jan. 1998.

WORM, E.V.D. **Investigations on apocynin, a potent NADPH oxidase inhibitor.** 1997. 130f. Tese (PhD)-Faculteit Farmacie,Universidade de Utrecht, The Netherlands.

WORM, E.V.D. et al. Effects of methoxylation of apocynin and analogs on the inhibition of reactive oxygen species production by stimulated human neutrophils . **European Journal Pharmacology**. v. 433, n.2-3, dez. 2001.

XIMENES, V. F. et al. The Oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: Proposal for NADPH oxidase inhibition. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 457, n. 2, p. 134-141, jan. 2007.