

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO (MCC)

TÍTULO: “Estudo da Oxidação da Melatonina e de seus Produtos por Radicais Peroxila”

Orientador: Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes

Orientada: Camila Zerbinatti Padovan

BAURU - SP
DEZEMBRO / 2009

CAMILA ZERBINATTI PADOVAN

“Estudo da Oxidação da Melatonina e de seus Produtos por
Radicais Peroxila”

Monografia de conclusão de curso de
Licenciatura Plena em Química,
apresentada a Faculdade de Ciências
da Universidade Estadual Paulista,
Campus Bauru.

Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes.

Bauru
2009

Padovan, Camila Zerbinatti.

Estudo da oxidação da melatonina e de seus produtos por radicais peroxila / Camila Zerbinatti Padovan, 2009.

57 f.: il.

Orientador: Valdecir Farias Ximenes

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

1. Melatonina. 2. Glutathione. 3. Antioxidante.
I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências. II. Estudo da oxidação da melatonina.

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente à Deus, pela luz e sabedoria.

Aos meus pais, Valdir e Heloísa, que sempre acreditaram e me apoiaram em todos os momentos da minha vida; dedicando-se ao máximo para que eu tivesse uma ótima carreira acadêmica e conseguisse concluir mais esta etapa.

Ao meu irmão, Gabriel, por sempre estar ao meu lado e entender os momentos que não pude estar ao seu lado.

Aos meus avós, Rubens (*in memoriam*) e Conceição, Mario e Valdecil, pessoas que desde o início souberam me apoiar e me acolher durante o período que cursei a faculdade, principalmente por estar longe de meus pais.

Ao meu namorado, Thiago, por sempre estar ao meu lado me ajudando seja nos momentos fáceis ou difíceis, pelo seu amor, carinho e por entender quando não pude dar a atenção necessária.

Enfim, a todos os meus familiares que me ajudaram direta ou indiretamente, para que eu pudesse encontrar forças necessárias para mais esta conquista.

Amo muito vocês!

Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao meu orientador, prof. Valdecir, pela paciência, compreensão, incentivo, por sempre me ensinar e corrigir, me preparando para seguir a carreira profissional.

Ao prof. Manuel, por ter disponibilizado o aparelho para que eu pudesse realizar os estudos do meu projeto.

Aos meus amigos, Adriano, Michele e Daniele, pelo companheirismo, conselhos, risadas, enfim por sempre estarem ao meu lado me ajudando em todos os momentos.

Ao pessoal do laboratório, Daniele, Fernanda, Kátia e Mariana, por tudo que passamos juntos.

A FAPESP, pelo apoio financeiro durante o tempo de estágio.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu conquistasse mais esta etapa.

“Concedei-nos Senhor, Serenidade necessária, para
aceitar as coisas que não podemos modificar,
Coragem para modificar aquelas que podemos e
Sabedoria para distinguirmos umas das outras”.
(Reihold Niebuhr)

Resumo

A melatonina é uma endoleamina que apresenta propriedades antiinflamatórias, imunomoduladoras e antioxidantes. Porém, existem contradições entre os efeitos antioxidantes da melatonina e da glutathione (GSH). Sendo assim, este trabalho apresenta como principal objetivo verificar o efeito da melatonina na oxidação do GSH e o efeito do GSH na oxidação da melatonina por radicais peroxila, gerados pela termólise de dicloridrato de 2,2'-diazó(2-amidinopropano) (AAPH). Investigou-se também os produtos desta oxidação e a influência do meio reacional. Desta maneira, foi verificado por meio de análises cromatográficas e por comparação com padrões, que os produtos principais de oxidação da melatonina foram um derivado mono-hidroxilado e o produto de abertura do anel indólico da melatonina, ou seja, *N*¹-acetil-*N*²-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK). Ao estudar o efeito do tipo de tampão, pH e a presença ou ausência de oxigênio dissolvido no meio de reação, observou-se que, seja o aumento do pH, seja o aumento na concentração de oxigênio, causam um aumento no rendimento de AFMK. Comparando a reatividade de GSH e melatonina com AAPH pode-se verificar que radicais intermediários gerados durante a oxidação da melatonina são capazes de oxidar GSH, isto justificaria os trabalhos que demonstram a incapacidade da melatonina em inibir a oxidação de GSH em células.

Palavras chave – melatonina, GSH, antioxidante e pro-oxidante.

Abstract

Melatonin is an endoleamine that has anti-inflammatory, immunomodulating and antioxidants properties. But there is a contradiction between the antioxidant effects of melatonin and glutathione (GSH). Therefore, the main objective of this work was to study the effect of melatonin on the oxidation of GSH and the effect of GSH on the oxidation of melatonin by peroxy radicals generated by thermolysis of 2,2'-Azobis(2-amino-propane)-dihydrochloride (AAPH). The influence of the reaction conditions and the identity of the products of oxidation were also studied. The main products obtained during the oxidation of melatonin were its monohydroxylated derivative and N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK), which is the product obtained by oxidative cleavage of the melatonin indole ring. By studying the buffer type, pH and the presence or absence of dissolved oxygen in the reaction system, it was observed that, the yield of AFMK was higher when the pH or the concentration of oxygen was increased. Comparing the reactivity of both molecules GSH and melatonin, it can be seen that intermediates radicals generated during the oxidation of melatonin are able to oxidize GSH itself. We propose that this chemical property could justify the recent reports that demonstrated the inability of melatonin to inhibit the oxidation of GSH in cells.

Keywords - Melatonin, glutathione, antioxidant and pro-oxidant.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. ASPECTOS TEÓRICOS	14
2.1 Melatonina	14
2.2 Melatonina e Radical Hidroxila ($\bullet\text{OH}$)	16
2.3 Melatonina e Oxigênio Singlete ($^1\text{O}_2$)	17
2.4 Melatonina e Óxido Nítrico ($\text{NO}\bullet$).....	17
2.5 Melatonina e Radical Peroxila ($\text{ROO}\bullet$).....	18
2.6 Melatonina e Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2).....	19
2.7 Melatonina e Doenças Neurodegenerativas	20
2.7.1 Melatonina e Doença de Parkinson.....	20
2.7.2 Melatonina e Doença de Alzheimer.....	22
2.7.3 Melatonina e Epilepsia	23
2.8 Melatonina e Câncer.....	23
2.9 Melatonina e Doença Inflamatória	25
2.10 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	26
3. OBJETIVOS	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1 Compostos Químicos.....	30
4.2 Preparo de Soluções e Tampões	30
4.3 Equipamentos e condições cromatográficas	34
4.4 Métodos	35
4.4.1 Oxidação da melatonina por AAPH.....	35

4.4.2 Oxidação de GSH por AAPH e análise de GSH remanescente	36
4.4.3 Análise de GSH e GSSG por HPLC	36
4.4.4 Obtenção de eritrócitos	37
4.4.5 Quantificação da concentração intracelular de GSH	37
4.4.6 Sistema oxidante peroxidase (HRP/H ₂ O ₂)	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
6. CONCLUSÕES	51
7. REFERÊNCIAS	52

Lista de Figuras

1 – Estrutura da melatonina	14
2 – Sistema do HPLC	27
3 - HPLC.....	35
4 - Separação dos produtos de oxidação da melatonina.	40
5 - Efeito de pH na oxidação de melatonina por ROO•	42
6 - Efeito de oxigênio dissolvido durante a oxidação da melatonina e produção de AFMK por ROO•.....	43
7 - Efeito de glutathione durante a oxidação da melatonina por ROO•.	44
8 - Efeito da melatonina durante a oxidação da glutathione por ROO•.	46
9 – Gráfico do efeito da melatonina durante a oxidação da glutathione por HRP/H ₂ O ₂ . .	48
10 – Cromatograma do efeito da melatonina durante a oxidação da glutathione por HRP/H ₂ O ₂	49
11 - Efeito da melatonina sobre a depleção de GSH intracelular em eritrócitos causada pela oxidação por radicais peróxido.	50

Lista de Esquema

1 – Formação do Radical Peroxila	39
2 – Esquema de reação da melatonina com radicais peroxila, estes gerados a partir da termólise do AAPH	41
3 – Método de redução do DTNB	45

Lista de Siglas

AAPH – 2,2'-diazó(2-amidinopropano)

AFMK – *N*¹-acetil-*N*²-formil-5-metoxiquinuramina

AMK – *N*-acetil-5-metoxiquinuramina

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

COMT – Catecol-O-metil transferase

DA – Doença de Alzheimer

DMPO – 5,5'-dimetil-pirrolina-*N*-óxido

DP – Doença de Parkinson

DTMB – Ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico)

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

EROS – Espécies reativas de oxigênio

ESR – Espectroscopia de ressonância de elétrons

FeSO₄ – Sulfato ferroso

GPx – Glutathione peroxidase

GRd – Glutathione reductase

GSH – Glutathione

GSSG – Glutathione Oxidase

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

HIOMT – Hidroxi-indol o-metiltransferase

HRP – Peroxidase extraída de raiz forte

ROO• - Radicais Peroxila

MAO – Monoamina oxidase

MLT - Melatonina

Na_2HPO_4 – Fosfato de sódio monoácido

NaOH – Hidróxido de Sódio

NAS – N-acetilserotonina

NAT – N-acetiltransferase

NEM – *N*-etilmaleimina

$\text{NO}\bullet$ - Óxido nítrico

NO_x – Espécies derivadas de nitrogênio

O_2^- - Ânion Superóxido

$^1\text{O}_2$ – Oxigênio singlete

$\bullet\text{OH}$ – Radical Hidroxila

OPA – *o*-ftaldialdeído

PBS – Solução fisiológica salina tamponada com fosfato

SNC – Sistema Nervoso Central

TPH – Triptofano Hidroxilase

1. INTRODUÇÃO

A Melatonina está entre as moléculas endógenas mais estudadas na última década. Além de suas propriedades hormonais, são crescentes as evidências que demonstram as propriedades antiinflamatórias, imunomoduladoras e antioxidantes. De fato, atualmente a melatonina não é conhecida apenas como um hormônio oriundo da glândula pineal, mas sim um produto de secreção de diferentes tecidos e células. Uma das funções mais conhecidas da melatonina é a sua capacidade em inibir a peroxidação lipídica em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Isso mostra a capacidade da melatonina em reduzir radicais peroxila. No entanto, não existe nenhum trabalho na literatura científica que tenha estudado a reação direta entre a melatonina e radicais peroxila. De modo geral, nos trabalhos descritos na literatura, mede-se a reatividade da melatonina com radicais peroxila através do estabelecimento de uma competição entre a melatonina e uma sonda, que pode ser cromogênica, fluorescente ou quimiluminescente, pelos radicais peroxila, e assim, estabelece-se um padrão de eficiência da mesma como supressor desses radicais. Neste trabalho pretende-se, sem a utilização de sondas, acessar a reatividade da melatonina com radicais peroxila gerados pelo azo composto 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH). Além de identificar os produtos de oxidação, a influência do meio de reação, etc. Como principal objetivo, pretende-se contribuir para o conhecimento do papel da melatonina como molécula de grande relevância na inibição de processos deletérios.

2. ASPECTOS TEÓRICOS

2.1 Melatonina

A melatonina (N-Acetil-5-metoxitriptamina) é uma indolamina sintetizada a partir do triptofano. Foi descoberta por Lerner et al. em 1958 como sendo o principal hormônio produzido na glândula pineal. Além de ser secretada nesta glândula é também sintetizada em tecidos extrapineais, tais como, retina, medula óssea, cérebro, epitélio respiratório, trato gastrointestinal, pele, entre outros (DZIEGIEL et al., 2008; TAN et al., 2007).

Até meados de 1990 reconhecia-se a melatonina praticamente como sendo apenas um regulador do ritmo circadiano e circanual dos mamíferos. Foi a partir deste período, com a descoberta do seu potencial antioxidante, que a melatonina se tornou uma das moléculas mais estudadas nos últimos anos. Atualmente é amplamente reconhecido o seu papel na modulação da função imunológica, inibição do crescimento de tumores, influência na fisiologia da retina, proteção das células contra os efeitos nocivos dos radicais livres, etc (REITER et al., 2000; ANTUNES et al., 1999).

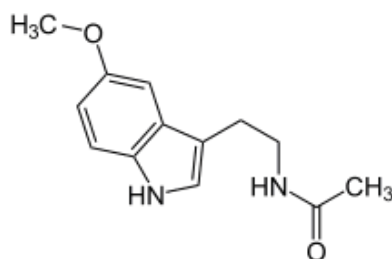


Figura 1 – Estrutura da melatonina

A melatonina é um eficiente supressor (reduzidor do ponto de vista químico) de substâncias oxidantes, sendo elas radicais livres ou não (IANAS et al., 1991). Devido às suas propriedades hidrofílicas e lipofílicas, a melatonina passa facilmente pelas barreiras morfofisiológicas por difusão, podendo atuar como antioxidante em diferentes locais nas células, tais como no núcleo, mitocôndria, citosol e membranas (REITER, 1998). A sua secreção depende de sua síntese, que é catalisada por quatro enzimas distintas: triptofano hidroxilase (TPH), descarboxilase de aminoácidos aromáticos, *N*-acetiltransferase (NAT), que converte serotonina em *N*-acetilserotonina (NAS), e hidroxil-indol *o*-metiltransferase (HIOMT), que converte posteriormente NAS em melatonina (KARASEK, WINCZYK, 2006).

A existência de moléculas endógenas com grande potencial antioxidante como a melatonina, vitamina E, ácido ascórbico entre outras pode ser considerado como um mecanismo natural de defesa dos organismos vivos e que dependem de oxigênio para sobrevivência. De fato, os organismos aeróbicos necessitam de oxigênio para produção de energia via respiração mitocondrial. Neste processo, o oxigênio é reduzido totalmente resultando na produção de água, porém uma parte deste oxigênio pode ser reduzido apenas parcialmente o que resultará na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Tais substâncias podem ser altamente oxidantes, como sugere o termo geral utilizado para designá-las, ou seja, EROs. Exemplos destas substâncias incluem o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila ($\cdot OH$), sendo este o mais tóxico (DZIEGIEL et al, 2008). A capacidade da melatonina em neutralizar radicais livres tem potenciais implicações na proteção fisiológica do organismo contra doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson, doenças cardiovasculares e câncer (KARASEK, WINCZYK, 2006).

2.2 Melatonina e Radical Hidroxila ($\bullet$ OH)

O radical hidroxila é considerado, entre as EROs, o mais deletério, devido a sua alta capacidade de reagir com qualquer molécula da sua vizinhança (REITER et al., 2000; ALLEGRA et al., 2003). A alta reatividade desta substância é conhecida a mais de 100 anos, quando Fenton em 1894 descobriu um método simples para sua produção a partir da reação entre sulfato ferroso (FeSO_4) e H_2O_2 e Haber Weiss demonstrou a ação oxidativa do $\bullet$ OH em 1934 (KLEBANOFF, 2005). No que diz respeito à melatonina, Tan et al. (1993) descobriram a capacidade dessa substância em neutralizar o $\bullet$ OH. Estes estudos foram realizados por meio da fotólise do H_2O_2 , ocorrendo assim a geração do $\bullet$ OH, que foram detectados por espectroscopia de ressonância de elétrons (ESR) via captura pelo agente 5,5'-dimetil-pirrolina-N-óxido (DMPO). Poeggeler et al. (1996) calculou a constante de velocidade da interação entre a melatonina e o $\bullet$ OH, como sendo de $0,6 \times 10^{11} \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Vários estudos realizados com este mesmo propósito e utilizando-se de diferentes metodologias, sejam elas técnicas *in-vitro* e *in-vivo*, confirmaram a eficiência da melatonina como um supressor de $\bullet$ OH. Como apresentado anteriormente, o $\bullet$ OH é altamente reativo, apresentando uma meia-vida extremamente curta. Assim, o dano em biomoléculas causado por este oxidante ocorre no seu sítio de geração. Por esta razão, a melatonina, capaz de atuar em sítios hidrofílicos e lipofílicos, pode potencialmente estar presente em qualquer local onde este oxidante seja gerado.

2.3 Melatonina e Oxigênio Singlete ($^1\text{O}_2$)

O $^1\text{O}_2$ é uma forma eletronicamente excitada do oxigênio molecular, sendo altamente capaz de destruir macromoléculas (ALLEGRA et al., 2003). Na maioria das vezes é produzido em reações de fotossensibilização de substratos, como por exemplo, pigmentos de corante (REITER et al., 2000). Roberts e Martinez (2000) demonstraram recentemente que a constante de velocidade entre a melatonina e o $^1\text{O}_2$ é de $2,2 \times 10^7 \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

A capacidade da melatonina em neutralizar $^1\text{O}_2$ foi demonstrada por Poeggeler et al. (1974). Neste experimento a autooxidação da riboflavina através de sua exposição à luz levou à produção de $^1\text{O}_2$, o qual foi suprimido pela melatonina (ALLEGRA et al., 2003), nesta reação foi verificada a formação do produto de oxidação da melatonina conhecido como *N*¹-acetil-*N*²-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK), como podendo ser um produto comum da interação da melatonina com o oxigênio.

Maharaj et al. (2005) em estudos posteriores concluíram que a melatonina pode ser utilizada em terapias fotodinâmicas na destruição de tumores, pois embora seja um supressor de radicais livres em condições biológicas, quando exposta a irradiação laser, é capaz de gerar $^1\text{O}_2$ e radicais (DEEPA et al., 2007).

2.4 Melatonina e Óxido Nítrico ($\text{NO}\cdot$)

O monóxido de nitrogênio ($\text{NO}\cdot$), mais conhecido como óxido nítrico é um radical livre, porém relativamente não reativo. O $\text{NO}\cdot$ é um radical livre que possui várias funções reguladoras, como sistema imunológico, alterações da fisiologia cardiovascular,

modulação da função neuronal, além de algumas condições inflamatórias que podem mediar lesão tecidual, como por exemplo, câncer, diabetes, doenças degenerativas neuronais, infarto do miocárdio, entre outras (ALLEGRA et al., 2003).

Para demonstrar que a melatonina reage com $\text{NO}\cdot$, este foi gerado em um sistema de célula livres, a partir da decomposição do 1-hidro-2-oxo-3-(N-metil-3-aminopropil)-3-metil-1-triazeno. Com base nesses resultados e aos de Mahal et al. (1999) foi determinada a taxa constante de interação da melatonina com $\text{NO}\cdot$ como sendo de $3,0 \times 10^7 \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (REITER et al., 2000; ALLEGRA et al., 2003).

Em estudos posteriores realizados por Blanchard et al. (2000) foi apresentado que a melatonina reage com o $\text{NO}\cdot$ apenas na presença de O_2^- , sugerindo que a melatonina reage com espécies derivadas de nitrogênio (NOx), provavelmente ONOO^- , sendo estes reconhecidamente deletérios (KLEBANOFF, 2005). Resultados de Turjanski et al. (2000) demonstraram que o produto da reação de $\text{NO}\cdot$ com melatonina é a nitrosomelatonina com uma taxa constante de interação da ordem de $10^2 \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Além da melatonina estudos foram realizados com serotonina, N-acetil-5-hidroxitriptamina e 5-hidroxitriptofano, porém a melatonina foi a mais eficaz como supressor de $\text{NO}\cdot$ (REITER et al., 2000).

2.5 Melatonina e Radical Peroxila ($\text{ROO}\cdot$)

O radical peroxila ($\text{ROO}\cdot$) pode ser formado durante a peroxidação lipídica (DEEPA et al., 2007). A interação deste radical com a melatonina vem sendo amplamente estudada por diversos grupos de pesquisadores, porém a eficiência da melatonina em neutralizar o radical peroxila ainda é controversa (ALLEGRA et al., 2003).

Pieri et al. (1994) em seus estudos propuseram que a melatonina é um supressor mais eficiente comparado com a vitamina E, por outro lado, Marshall et al. (1996) concluíram que essa capacidade é limitada. Em estudos mais completos, Antunes et al. (1999) utilizaram vários sistemas, onde o α -tocoferol foi usado como controle positivo. Eles mostraram que a melatonina não é um supressor significante de $\text{ROO}\bullet$, e que isso seria uma característica de moléculas onde o grupo oxidável é o grupo NH (ALLEGRA et al., 2003).

2.6 Melatonina e Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas concentrações fisiológicas e sem um catalisador é um fraco agente oxidante. Esta baixa reatividade e a ausência de carga elétrica fazem com que o mesmo possa atravessar membranas celulares tornando-o acessível aos sítios distantes onde são produzidos. O H_2O_2 é gerado em qualquer sistema biológico a partir da dismutação do O_2^- , e também em vários sistemas enzimáticos (JOVANOVIĆ, STEENKEN, 1992; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999). Apesar do H_2O_2 ser pouco reativo, este pode ser convertido na forma mais reativa $\text{HO}\bullet$, na presença de íons metálicos de transição, tais como Fe^{2+} , através da reação de Fenton ou Haber-Weiss (REITER et al., 2000; ALLEGRA et al., 2003).

Em seus estudos Tan et al. (2000) demonstraram que a melatonina é um supressor de H_2O_2 . Utilizando um sistema de peroxidase/vermelho de fenol, o produto desta interação é o AFMK, que incubado com a enzima CAT, foi convertido em *N*-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK). Desta maneira notou-se uma maior eficiência da

melatonina como supressor de H_2O_2 , visto que os produtos formados, tanto AFMK como o AMK são também supressores de radicais livres (REITER et al., 2000).

2.7 Melatonina e Doenças Neurodegenerativas

Várias células do organismo estão sujeitas a produção de radicais livres, devido ao metabolismo de oxigênio. O sistema nervoso central (SNC) está sujeito ao estresse oxidativo, pelo fato de ocorrer um grande consumo de oxigênio que inevitavelmente contribui para a formação de radicais livres e também por possuir poucos mecanismos de defesa oxidativa. Além de apresentar elevada taxa de ácidos graxos poli-insaturados, tornando as células neuronais vulneráveis ao estresse oxidativo. Desta maneira, existem várias evidências de que as doenças neurodegenerativas tais como, doença de Parkinson, doença de Alzheimer e Epilepsia, estão relacionadas com os danos causados pelos radicais livres existentes no cérebro (AGUIAR, 2002).

2.7.1 Melatonina e Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é caracterizada pela progressiva degeneração dos neurônios dopaminérgicos, causada principalmente pelas enzimas monoamina oxidase (MAO) e catecol-O-metil transferase (COMT), ocasionando perda dos neurônios, na região conhecida como substância negra, localizada no sistema nervoso central, onde os neurônios dessa região sintetizam o neurotransmissor dopamina. Devido a essa síntese ocorrem alterações no sistema motor como: tremor, rigidez muscular e diminuição da velocidade dos movimentos. Além disso, outros sintomas são observados

tais como depressão, alterações do sono, diminuição da memória e distúrbios do sistema nervoso autônomo (SRINIVASAN et al., 2006).

Em análises realizadas no tecido cerebral conhecido por substância nigra em pacientes mortos que apresentavam DP, foi observado um aumento da peroxidação lipídica, modificações oxidativa das proteínas e do DNA. A fragilidade dos neurônios da substância nigra pode estar relacionada às incrustações de ferro na melanina, sendo que os elevados níveis deste metal ocasionam um aumento dos radicais hidroxilas através da reação de Fenton. Esta situação pode ser agravada com um aumento da produção de H_2O_2 (SRINIVASAN et al., 2006).

Um dos principais tratamentos utilizados para pacientes com DP é baseado em doses terapêuticas de *L*-DOPA, que apresenta propriedades químicas neuroprotetoras, porém o uso crônico desse medicamento ocasiona aos pacientes vários efeitos colaterais, tais como distúrbios motores, distúrbios psiquiátricos e discinesias. Devido a esse fato, geralmente ocorre a diminuição das doses ou até mesmo a suspensão desse medicamento, tornando assim, o tratamento não muito eficaz (SRINIVASAN et al., 2006).

A melatonina é considerada o antioxidante endógeno mais eficaz, pelo fato de ser solúvel tanto em lipídios como em água, possuindo assim a capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálicas (ALLEGRA et al., 2003; ANTOLÍN et al., 2002). Além de possuir uma grande capacidade antioxidante, agindo desta maneira como supressor de radicais livres, atenuando os sintomas decorrentes do tratamento.

2.7.2 Melatonina e Doença de Alzheimer

Além da doença de Parkinson, a melatonina também tem um papel importante no tratamento da doença de Alzheimer (DA), devido a sua função antioxidante e neuroprotetora, conforme demonstrado por Zhou et al. (2003) e Wu e Swaab (2005). Esta doença está associada com a perda progressiva da função cognitiva, perda de memória, e outras manifestações neurocomportamentais. Além de causar distúrbios no ciclo do sistema circadiano pineal, visto que os níveis de melatonina noturno são diminuídos e no período diurno são aumentados, causando assim agitação nestes pacientes.

A principal característica molecular da DA é o acúmulo do peptídeo β -amilóide. Em pacientes com DA o tecido neural apresenta um aumento do estresse oxidativo, sendo assim alguns tratamentos são realizados com o objetivo de atenuar ou prevenir o estresse oxidativo. Por exemplo, tratamentos utilizando vitaminas E e C tem sido realizados, porém o sucesso dos mesmos foram limitado, pois apesar de reduzir a peroxidação lipídica, estes compostos são incapazes de impedir a toxicidade dos peptídeos. (SRINIVASAN et al., 2006).

Buscando um tratamento mais eficaz, a melatonina e seus metabólitos mostraram-se mais eficiente, não somente pelo fato de atuar direta e indiretamente como supressor de radicais livres, mas também por possuir efeitos adicionais destes compostos e de seus metabólitos (SRINIVASAN et al., 2006). Além disso, por não haver um tratamento farmacêutico eficaz, a melatonina foi sugerida para melhorar estes distúrbios e também a memória nos pacientes (WU, SWAAB, 2005). Além de possuir várias ações que coletivamente contribuem para a prevenção do dano oxidativo, garantindo a sobrevivência das células, mesmo sob condições adversas.

2.7.3 Melatonina e Epilepsia

Em pacientes com epilepsia, a melatonina além de ter uma função neuroprotetora, também exerce um efeito anti-excitotóxico, que diminui as manifestações epiléticas, pelo fato de inibir o receptor de glutamato no cérebro e a produção de óxido nítrico. Em estudos realizados por Gupta et al. (2004), o efeito da adição de melatonina em crianças com epilepsia recebendo tratamento de carbamazepina foi comparada com a atividade das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GRd). Desta maneira pode-se concluir que a melatonina exerce uma atividade antioxidante nestes pacientes, devido o aumento da atividade da enzima GRd (DEEPA et al. 2007).

2.8 Melatonina e Câncer

Em 1963 foi demonstrado pela primeira vez por Kenneth Starr que a utilização da melatonina em tratamentos de tumores, através de aplicações intravenosas melhorou a condição dos pacientes (DZIEGIEL et al., 2008). Posteriormente, Lissoni, et al. (1991), realizaram estudos em pacientes com câncer de pulmão e fígado, utilizando tratamento combinado de melatonina com Interleucina-2 (IL-2), sendo que ao final do tratamento foi verificada uma resposta positiva dos pacientes, especialmente pelo fato da sensibilidade desses tipos de tumores à quimioterapia.

Em tratamentos de quimioterapia de tumores uma das drogas mais utilizadas são as substâncias do grupo antraciclina. Seu metabolismo gera altos níveis de radicais livres, que como apresentados anteriormente, danificam as células, tais como a do

coração, rins e medula óssea. Desta maneira, as doses utilizadas dessas drogas necessitam serem limitadas, tornando assim o tratamento não muito eficaz (DZIEGIEL et al., 2008). Experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a melatonina por possuir a capacidade de neutralizar radicais livres é capaz de proteger as células contra os danos causados por esses radicais.

A melatonina também tem se mostrado eficaz no tratamento de tumores através de radioterapia. Vijayalaxmi et al. (2004) demonstraram a partir de estudos tanto *in-vitro* como *in-vivo* a ação protetora da melatonina nas células expostas à radioterapia. Nesses estudos os linfócitos quando submetido à combinação de radioterapia com melatonina foi verificado uma menor alteração genética comparada com o tratamento apenas com radioterapia.

Nos últimos anos, dados epidemiológicos indicam que o elevado risco de desenvolvimento de câncer de mama, pulmão, câncer metastático de células renais (CCR), câncer hepatocelular, entre outros, podem estar relacionados com o hábito de vida das pessoas, que podem causar alterações nos níveis de secreção da melatonina.

Kerenyi et al. (1990), foram os primeiros a publicar sobre o risco de incidências de câncer estarem relacionados a excessiva exposição à luz artificial, causado pelo desenvolvimento industrial, visto que esta causa a supressão dos níveis de secreções da melatonina (BARTSCH, BARTSCH, 2006).

Em estudos realizados com mulheres que trabalham em período noturno, foi observado uma maior incidência de desenvolvimento de câncer de mama, comparado com pacientes que possuem deficiência visual, visto que as mulheres que trabalham em período noturno verificou-se uma diminuição dos níveis de secreção da melatonina, causando um aumento dos níveis dos hormônios reprodutivos, como por exemplo, o

estradiol, ocasionando assim o crescimento e a proliferação de sensíveis hormônios das células da mama (SCHERNHAMMER, HANKINSON, 2003).

Desta maneira Bartsch et al. (2006) sugerem que modificações nos hábitos de vida das pessoas serão necessárias para diminuir a ocorrência de câncer. Como medidas a serem tomadas incluem alimentação, restrição ao uso de álcool, diminuição da ingestão de gordura animal, realização de atividades físicas e evitar exposição à luz artificial durante a noite (BARTSCH, BARTSCH, 2006).

Dos fatos apresentados acima, a melatonina mostrou-se ser eficiente para prevenir o desenvolvimento do câncer, visto que os hormônios da glândula pineal controlam a proliferação das células malignas.

2.9 Melatonina e Doença Inflamatória

Uma das doenças inflamatórias existentes é a artrite reumatóide, a forma mais conhecida de artrite inflamatória. Esta doença é caracterizada por uma inflamação da membrana sinovial, que forra a cápsula fibrosa que envolve e protege as articulações. Os primeiros sintomas são febre, falta de apetite, mal-estar, angústia, entre outros, o que compromete a sua identificação, pois seus sintomas podem ser confundidos com outras doenças. Os sintomas crônicos destacam-se a artrose, ruptura de tendões, deformidades progressivas com perda funcional, instabilidade da coluna cervical (MAESTRONI et al., 2005).

Foi verificado em pacientes com artrite reumatóide um aumento da peroxidação lipídica, conseqüentemente maiores concentrações do estresse oxidativo [FORREST, 2007). Os sintomas observados podem ser decorrentes da variação dos níveis de

melatonina, visto que nos pacientes que apresentam essa doença, os níveis da indolamina são baixos durante a manhã e maiores durante a noite, comparados a controles saudáveis, por esse motivo os níveis de cortisol também diminuem, causado assim um aumento de doenças inflamatórias (MAESTRONI et al., 2005).

Um possível tratamento para minimizar os sintomas desta doença é a utilização de doses terapêuticas de agentes antioxidantes, como por exemplo, vitaminas antioxidantes e melatonina, podendo oferecer possibilidades terapêuticas interessantes e inovadoras (FORREST et al. 2007).

2.10 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia foi descoberta em 1906 pelo botânico russo Mikhael Tswett, o qual realizou trabalhos separando pigmentos contidos em folhas, deste então, esta técnica analítica é uma das mais utilizadas na separação, isolamento e quantificação de substâncias contidas em misturas complexas (MÜHLEN, LANÇAS, 2004).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE, ou HPLC do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) é muito utilizada pelo fato de separar substâncias não voláteis e por apresentar grande sensibilidade (TONHI et. al, 2002). A técnica consiste na separação de substâncias utilizando duas fases imiscíveis, fase móvel (líquida) e a fase estacionária (sólida) na qual as substâncias são separadas de acordo com a afinidade com a fase estacionária ou com a fase móvel. Desta maneira, a que apresentar maior afinidade pela fase estacionária, terá um tempo de retenção maior, ou seja, sua velocidade de migração pela coluna é baixa. O oposto ocorre com as substâncias que apresentam menor afinidade pela fase estacionária (ABREU, 2008).

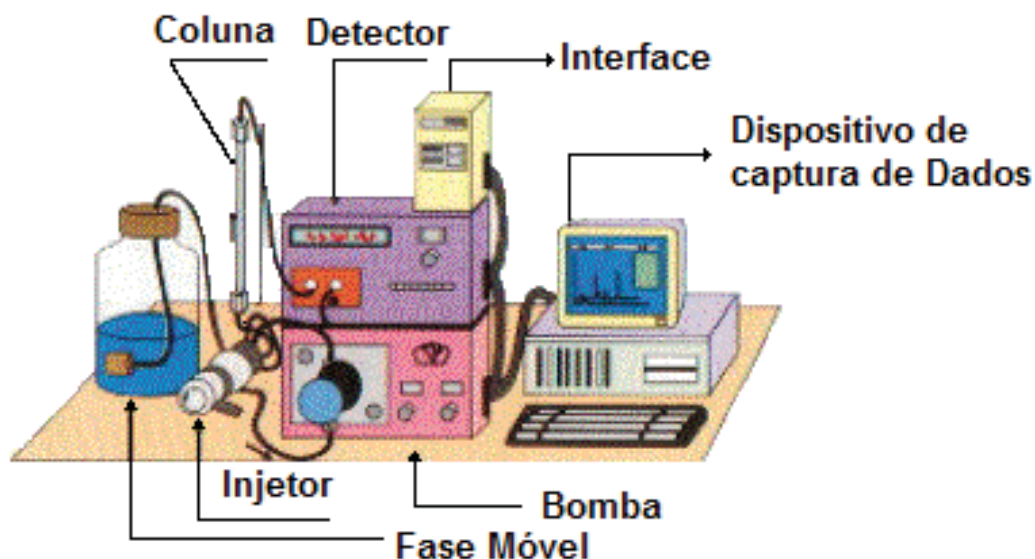


Figura 2 – Sistema do HPLC
Fonte - http://hplc.galeon.com/hplc_archivos/IMAGENES/esquemaC.gif

O sistema do HPLC, como demonstrado na figura 2, baseia-se em um reservatório que contém solvente, ou seja, fase móvel, e uma coluna, utilizada como fase estacionária. Durante o processo, o solvente, impulsionado por bombas, flui constantemente sobre a fase fixa presente na coluna. A amostra é introduzida através da válvula de injeção, que pode ser manual ou automática. A separação se dá na coluna de acordo com a afinidade química dos componentes pela fase móvel e fixa. A presença e quantidade dos compostos em análise são determinadas pelos detectores, os quais podem ser baseados na absorção de luz UV-visível, fluorescência, etc. O cromatograma obtido é registrado em um dispositivo de captura de dados (COLLINS, 1995).

A fase móvel para ser utilizada na CLAE deve ser de alto grau de pureza ou de fácil purificação, não decompor ou dissolver a fase estacionária, ter baixa viscosidade, ter polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra, sendo que o tipo de eluição pode ser isocrático, eluição constante, ou na forma de gradiente. A eluição é alterada de acordo com a análise (COLLINS, 1995).

A fase estacionária mais utilizada é de partição com coluna de fase reversa, que consiste em fases móveis polares e fases estacionárias apolares. As colunas são formadas por partículas microporosas de sílica revestidas por moléculas orgânicas. Suas dimensões são 100 a 250 mm de comprimento e 3 a 9 mm de diâmetro interno (ABREU, 2008). Por a sílica apresentar instabilidade a fases móveis tanto ácidas como básicas são utilizados solventes com pH entre 2,5 e 9,0 (TONHI et. al, 2002). As fases estacionárias mais conhecidas são a C8 e C18.

3. OBJETIVOS

Esse trabalho teve como principal objetivo investigar a cinética de oxidação da melatonina por radicais peroxila gerados pela decomposição térmica do azo composto 2,2'-diaz(2-amidinopropano) (AAPH). Neste trabalho foi analisado o tipo de tampão, pH do meio reacional, presença e ausência de oxigênio e argônio e efeito da presença de Glutathione (GSH) na oxidação da melatonina. Estes estudos foram feitos por meio da monitoração da concentração da melatonina por cromatografia líquida identificando os seus produtos e o consumo de melatonina. E também investigou o efeito da melatonina na oxidação do GSH. Além de quantificação do GSH intracelular, esses estudos foram analisados utilizando a técnica do DTNB.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Compostos Químicos

Dicloridrato de 2,2'-azobis (2-aminopropano) (AAPH), ácido ascórbico, melatonina, tris(hidroximetil)aminometano (Tris), glutathione (GSH), *N*-acetil-*N*²-formil-5-metoxiquinuramine (AFMK), Aldeído orto-ftálico (OPA), *N*-etilmaleimina (NEM), EDTA 0,1% foram obtidos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Álcool etílico, ácido clorídrico, fosfato monoácido de sódio (Na_2HPO_4), fosfato dibásico de sódio (NaH_2PO_4) e hidróxido de sódio foram obtidos da Synth (SP, SP, Brasil).

4.2 Preparo de Soluções e Tampões

Solução Fisiológica salina tamponada com fosfato (Phosphate Buffered Saline (PBS))

Para o preparo de 1 litro de tampão PBS foram pesados 8,0 g de cloreto de sódio, 0,2 g de cloreto de potássio, 1,15 g de fosfato monoácido de sódio (Na_2HPO_4) e 0,2 g de fosfato diácido de potássio (KH_2PO_4). Os sais foram dissolvidos em água destilada, o pH ajustado para 7,3 e o volume completado para 1 L em balão volumétrico. A solução foi mantida em geladeira.

Solução de Dicloridrato de 2,2'-azobis (2-aminopropano) (AAPH)

Esta solução foi preparada pesando-se as massas adequadas para as concentrações desejadas. Assim, pesou-se 0,027 g para o preparo de solução 100 mM e 0,010 g para o preparo de solução 40 mM, ambos para 1 mL de solução em PBS.

Solução de Melatonina

Para o preparo de 1 mL de melatonina 100 mM, pesou-se 0,023 g e dissolveu-se em álcool etílico. A solução foi mantida em geladeira e protegida de luz.

Solução de Glutathione – (GSH)

Para o preparo de 1 mL de glutathione 100 mM, pesou-se 0,030 g, e dissolveu-se em água destilada. A solução foi mantida em geladeira.

Solução Tampão Tris

Para o preparo de 100 mL desta solução 0,05 M pesou-se 0,605 g. O reagente foi dissolvido em água. O pH da solução foi ajustado, de acordo com a análise, utilizando ácido clorídrico ou hidróxido de sódio 0,1 M. O volume foi completado para 100 mL em balão volumétrico. A solução foi mantida em geladeira.

Solução tampão fosfato

Para o preparo de 100 mL desta solução 50 mM, primeiramente foram preparados 500 mL de fosfato monoácido de sódio (Na_2HPO_4) 0,05 M e 500 mL de fosfato dibásico de sódio (NaH_2PO_4) 0,05 M, pesando-se 3,550 g e 3,0 g, respectivamente. Estes reagentes foram misturados em proporções variadas para obtenção das soluções tampões em pHs 5,5, 7,4 e 8,5. As soluções foram mantidas em geladeira.

Solução de Ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico) DTNB

Esta solução foi preparada pesando-se 0,010 g de DTNB e 0,500 g de citrato de potássio. Os reagentes foram dissolvidos em água destilada e o volume completado para 50 mL em balão volumétrico.

Solução de N¹-acetil-N²-formil-5-metoxi-quinuramine (AFMK)

Para preparar a solução de AFMK 10,8 mM, pesou-se 2 mg do AFMK, o qual foi dissolvido em 200 µL de álcool etílico e adicionado 300 µL de água destilada. A solução foi mantida em geladeira.

Solução de Ácido Metafosfórico

A solução de ácido metafosfórico foi preparada pesando-se 0,020 g de EDTA, 0,167 g de ácido metafosfórico e 3,00 g de NaCl. Os reagentes foram dissolvidos nesta ordem em água destilada e o volume da solução completado para 10 mL em balão volumétrico.

Fosfato de Sódio Monoácido (Na₂HPO₄)

Para o preparo 10 mL da solução Na₂HPO₄ 300 mM, pesou-se 0,425 g, o qual foi dissolvido em água destilada. A solução foi mantida em geladeira.

Hidróxido de Sódio (NaOH)

Para o preparo de 100 mL da solução de NaOH 0,1 M, pesou-se 0,400 g, o qual foi dissolvido em água destilada.

Aldeído orto-ftálico (OPA)

Para o preparo de 10 mL da solução de OPA 0,1%, pesou-se 0,01 g, o qual foi dissolvido em metanol.

N-etilmaleimina (NEM)

Para o preparo de 2 mL da solução de NEM 40 mM, pesou-se 0,010 g, o qual foi dissolvido em água.

Fosfato de Sódio Monoácido (Na_2HPO_4) + EDTA 0,1%

Para o preparo 100 mL desta solução, pesou-se 1,740 g de Na_2HPO_4 e 0,100 g de EDTA, os quais foram dissolvidos em água.

Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

Para o preparo de 10 mL de peróxido de hidrogênio 100 mM, diluiu-se 100 μL H_2O_2 9,7 M para 10 mL de água destilada. Como o H_2O_2 decompõem-se com o tempo é necessário fazer um estudo para a verificação de sua concentração na solução. Para a realização do estudo, primeiramente diluiu-se a solução H_2O_2 10 vezes em água destilada, e posteriormente foi analisada no espectrofotômetro. Como o H_2O_2 apresenta um $\epsilon = 43,6 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em $\lambda = 240 \text{ nm}$, e com a absorbância medida, foi possível verificar sua concentração através da lei de Beer-Lambert, onde $A = \epsilon.b.c$. A solução foi mantida em geladeira.

Enzima peroxidase (HRP)

Para o preparo de 1 mL de HRP 100 μM , pesou-se 0,006 g de HRP, o qual foi dissolvido em solução fisiológica salina tamponada com fosfato (PBS). Para a análise da concentração real, primeiramente a solução foi diluída 20 vezes em PBS, que posteriormente foi analisada no espectrofotômetro. Como o HRP apresenta um $\epsilon = 1.02 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em $\lambda = 403 \text{ nm}$, e com a absorbância medida, foi possível verificar sua concentração através da equação de Beer-Lambert, onde $A = \epsilon.b.c$. A solução foi mantida em geladeira.

4.3 Equipamentos e condições cromatográficas

Para a realização deste estudo foram utilizados os seguintes equipamentos: Cromatografia líquida de alta eficiência HPLC (Jasco acoplado aos detectores UV-Vis e fluorescência), pHmetro AR15 (Fischer Scientific), banho-maria (Kacil), balança analítica AG245 (Mettler Toledo) e balança semi-analítica PG 503-S (Delta Range). Para os estudos cromatográficos utilizou-se coluna de fase reversa C18 (Luna, Phenomenex, 250 x 4,6 mm, 5 nm). A fase móvel utilizada foi acetonitrila:água (25:75) (V/V) e operado no modo isocrático com uma vazão de 1 ml/min. O detector UV-Vis foi acertado para 254 nm e o detector de fluorescência para $\lambda_{\text{ex}} 340/\lambda_{\text{em}} 460$.



Figura 3 - HPLC

4.4 Métodos

4.4.1 Oxidação da melatonina por AAPH

Foram realizados ensaios com AAPH na presença de melatonina. As concentrações finais foram 1 mM melatonina e 40 mM AAPH. As reações foram realizadas em diferentes tampões e pHs, conforme os estudos em questão. De modo geral as reações eram incubadas em um volume final de 1 mL a 37°C em banho-maria. Quando necessário, argônio ou oxigênio eram borbulhados no decorrer da reação. Alíquotas (20 μ L) eram removidas e injetadas no HPLC em intervalos previamente estabelecidos.

4.4.2 Oxidação de GSH por AAPH e análise de GSH remanescente

A 1 mL de GSH (200 μ M) foi adicionado o mesmo volume de AAPH (5 mM) na presença ou ausência de melatonina. No controle negativo o AAPH foi substituído por PBS. A mistura foi incubada a 37°C, sob homogeneização suave e constante (homogeneizador rotatório). A cada 30 minutos, durante um intervalo de 2 horas, foram retirados alíquotas de 450 μ L de cada amostra e colocados em tubos de microcentrifugação. Na sequência adicionou-se 450 μ L da solução de 300 mM Na₂HPO₄ e 100 μ L da solução de DTNB. A absorbância foi medida em 412 nm e a concentração de GSH calculada a partir de uma curva de calibração utilizando padrões conhecidos de GSH (KO et al., 1997).

4.4.3 Análise de GSH e GSSG por HPLC

Após oxidação de GSH por AAPH como descrito anteriormente, 50 μ L da mistura de reação foi adicionada à 1 mL de uma solução de 0,1% EDTA em 0,1 M Na₂HPO₄ pH 8,0. À uma alíquota de 20 μ L desta solução adicionou-se 300 μ L da solução 0,1% EDTA em 0,1 M Na₂HPO₄ pH 8,0 e 20 μ L de uma solução metanólica 0,1% de aldeído orto-ftálico (OPA). A mistura foi incubada à 25°C por 15 min no escuro em tubos de microcentrifugação fechados. Finalmente, 20 μ L desta mistura foi injetado no HPLC.

Para análise da glutatona oxidada (GSSG), 200 μ L da mistura de reação foi incubada com 200 μ L de uma solução de *N*-etilmaleimina (NEM) por 25 min, no escuro à 25°C. Este procedimento tem como objetivo eliminar GSH remanescente do meio de reação. Na sequência, adicionou-se 750 μ L de 0,1 M NaOH à mistura. O meio alcalino

tem por objetivo facilitar a interação entre GSSG e OPA. Então 20 µL desta solução final foi utilizada para análise conforme o procedimento para análise de GSH como descrita anteriormente, mas trocando a solução constituída de 300 µL da solução 0,1% EDTA em 0,1 M Na_2HPO_4 pH 8,0 por 300 µL de 0,1 M NaOH. As análises cromatográficas foram realizadas usando como fase móvel uma mistura de metanol/solução 25 mM Na_2HPO_4 pH 6,0 (15%/85%). Os comprimentos de ondas foram: excitação 350 nm, emissão 420 nm (VIJAYALAXMI et al., 1995).

4.4.4 Obtenção de eritrócitos

Amostras de sangue periférico (5 mL) foram obtidas de doadores saudáveis por meio de punção venosa e adicionadas em tubos contendo heparina como substância anticoagulante. As amostras de sangue foram centrifugadas (372 G) por 10 minutos. O plasma sanguíneo e a camada celular superior rica em leucócitos foram descartados. A camada inferior, constituída por eritrócitos, foi lavada três vezes com solução salina tamponada (PBS). A cada lavagem os eritrócitos foram centrifugados (663 G) por 10 minutos e ressuspensos a 20% (v/v) em PBS.

4.4.5 Quantificação da concentração intracelular de GSH

À suspensão de eritrócitos (20%) foi incubada com AAPH (25 mM em PBS) na presença ou ausência dos antioxidantes em tubos de microcentrifugação. Ao controle negativo foi adicionado apenas PBS. As amostras foram incubadas a 37°C sob homogeneização suave e constante (homogeneizador rotatório) por 2 horas e 30

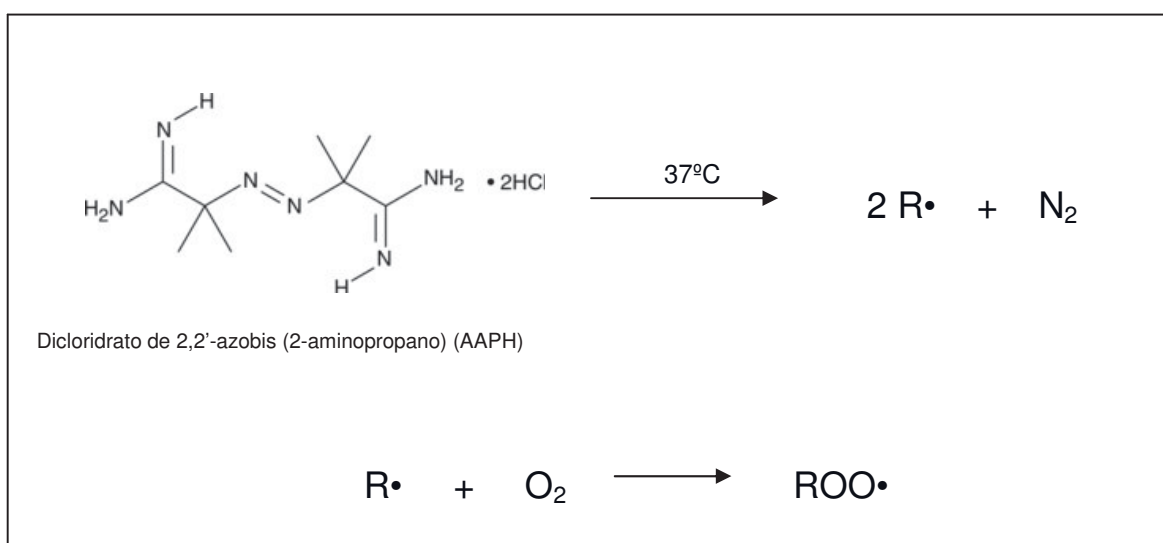
minutos. Após incubação foram adicionados 800 μL de PBS e as amostras centrifugadas (896 G) por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e ao “pellet” adicionado 700 μL de água destilada para a lise das células. Na sequência, as proteínas do meio foram precipitadas pela adição de 700 μL da solução de ácido metafosfórico e a mistura submetida à vigorosa homogeneização (vortex). Após 5 minutos de incubação as amostras foram centrifugadas (10976 G) por 10 minutos. À 450 μL do sobrenadante foram adicionados 450 μL da solução 300 mM de Na_2HPO_4 e 100 μL de uma solução de DTNB. A absorbância foi lida em 412 nm contra um branco onde a alíquota de 450 μL de Na_2HPO_4 foi substituído por 450 μL de H_2O (KO et al., 2007).

4.4.6 Sistema oxidante peroxidase (HRP/ H_2O_2)

Foram realizados ensaios via sistema oxidante peroxidase (HRP/ H_2O_2), na presença e ausência de melatonina. Quando presente a melatonina era adicionada no início da reação. As reações foram realizadas com um volume final de 1 mL, ao controle negativo eram adicionados 100 μM glutathiona, 0,5 μM HRP e 50 μM H_2O_2 em PBS pH-7,4. E ao controle positivo, além dos reagentes acima foram feitas reações adicionando 10 μM e 100 μM de melatonina. As amostras eram incubadas a 37°C em banho-maria durante 15 minutos. Após a reação era parada adicionando 10 $\mu\text{g/mL}$ de catalase.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Inicialmente mediu-se a reatividade da melatonina com os radicais peroxila gerados pela termólise do AAPH, como demonstrado no esquema 1.



Esquema 1 – Formação do Radical Peroxila

Sendo assim a melatonina (1 mM) foi incubada com AAPH (40 mM) , ambas concentrações finais e a 37°C, que é a temperatura necessária para a termólise do AAPH. Realizou-se experimentos com diferentes tampões e em diferentes concentrações, porém não foram observadas diferenças significativas no que diz respeito ao rendimento da reação, ou seja, o consumo de melatonina. Para a realização destes experimentos, tinha-se como base a utilização de padrões de melatonina que eram injetados no HPLC nas mesmas condições daquelas onde as reações eram conduzidas. Entre os tampões analisados destacam-se o fosfato, Tris e PBS. Um

cromatograma típico, obtido pela injeção de uma alíquota de 20 μL da mistura de reação após 4 horas de incubação, é mostrado na Fig. 4.

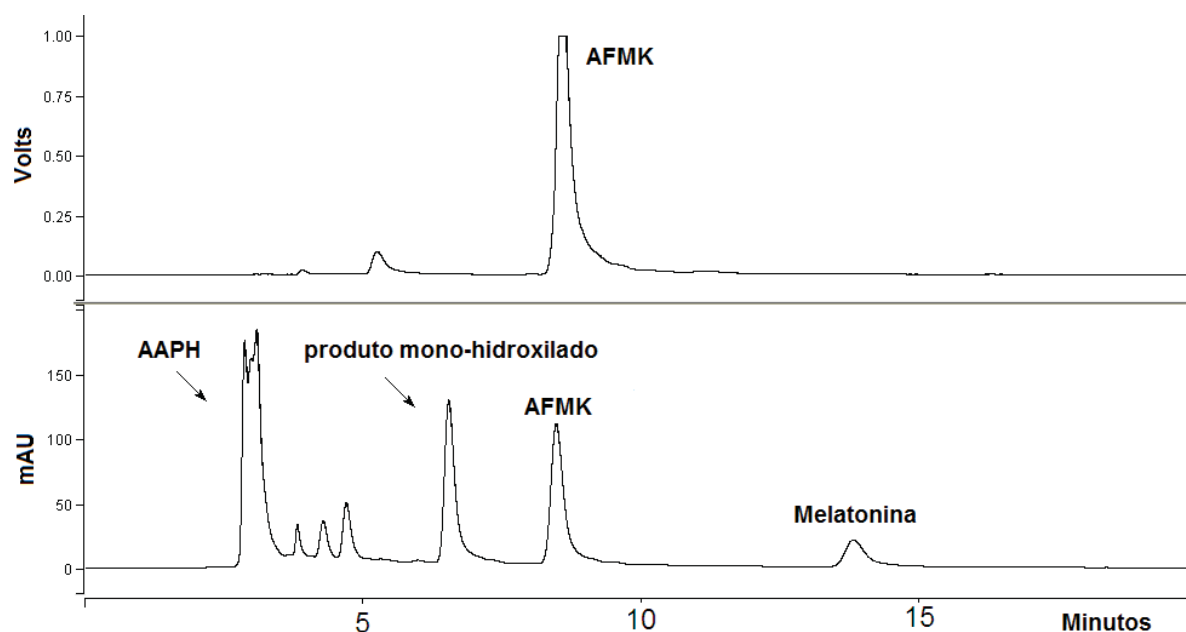
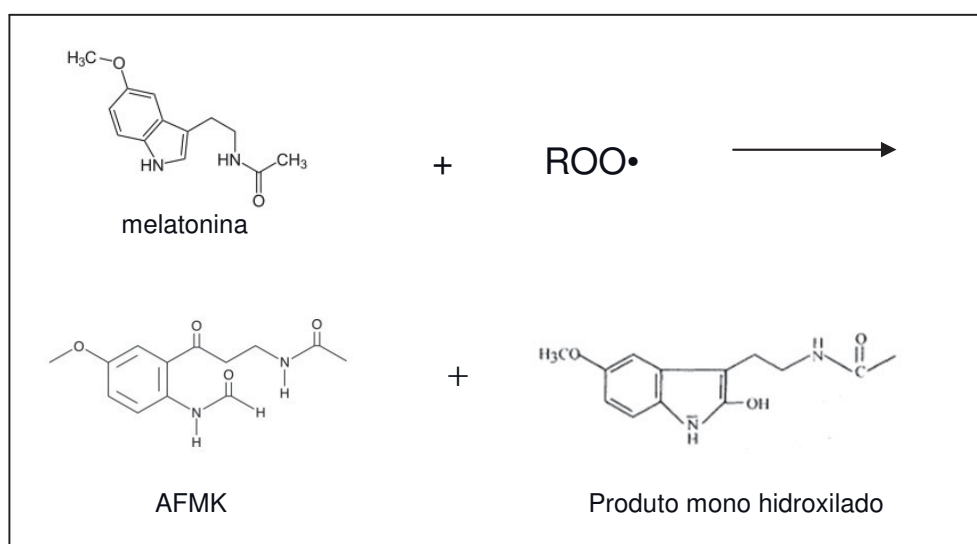


Figura 4 - Separação dos produtos de oxidação da melatonina. A melatonina foi oxidada por $\text{ROO}^\bullet$ e seus produtos separados por HPLC. Condições de reação: melatonina (1 mM), AAPH (40 mM), tampão fosfato de sódio (0,05 M) pH 7,4 e 37°C . O sobrenadante foi injetado após 4 h do início da reação. Os detectores foram UV-Vis (inferior) e fluorescência (superior).

A análise para identificação dos produtos principais da reação foi feita por comparação com padrões comerciais e/ou por análise por espectrometria de massa. Dois picos (produtos) se destacaram, como demonstrado no esquema 2: O produto de abertura do anel indólico da melatonina, conhecido como AFMK, que foi facilmente identificado por sua fluorescência característica e visualizado no detector de fluorescência (λ_{ex} 340 nm/ λ_{em} 460 nm) e, adicionalmente, pela comparação com um padrão comercial do mesmo. O segundo pico importante (tempo de retenção 7 min) foi analisado por espectrometria de massa. A relação massa/carga (m/z) do mesmo, obtido

no modo negativo de ionização, foi de $[M-H]^- = 247$, o que se correlaciona com a forma mono-hidroxilada da melatonina, a qual possui massa molar de 248 g/mol. A caracterização por espectrometria de massa foi realizada por meu orientador em uma colaboração com a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara que dispõe do equipamento para realização do mesmo.



Esquema 2 – Esquema de reação da melatonina com radicais peroxila, estes gerados a partir da termólise do AAPH

Além do tipo de tampão utilizado, realizou-se estudo variando o pH da reação. A Figura. 5 mostra que também este fator não alterou o rendimento de oxidação da melatonina, no entanto, causou uma alteração significativa na formação do produto AFMK. Como mostra a Figura. 5, o rendimento de AFMK foi maior no pH neutro se comparado ao levemente ácido. Já para o produto mono-hidroxilado não se observou diferença significativa. Estes resultados estão de acordo com relatos recentes na literatura científica, os quais indicam um aumento na produção de AFMK em função do

aumento de pH quando a melatonina é oxidada por peróxido de hidrogênio em reação catalisada por peroxidase (XIMENES, 2007).

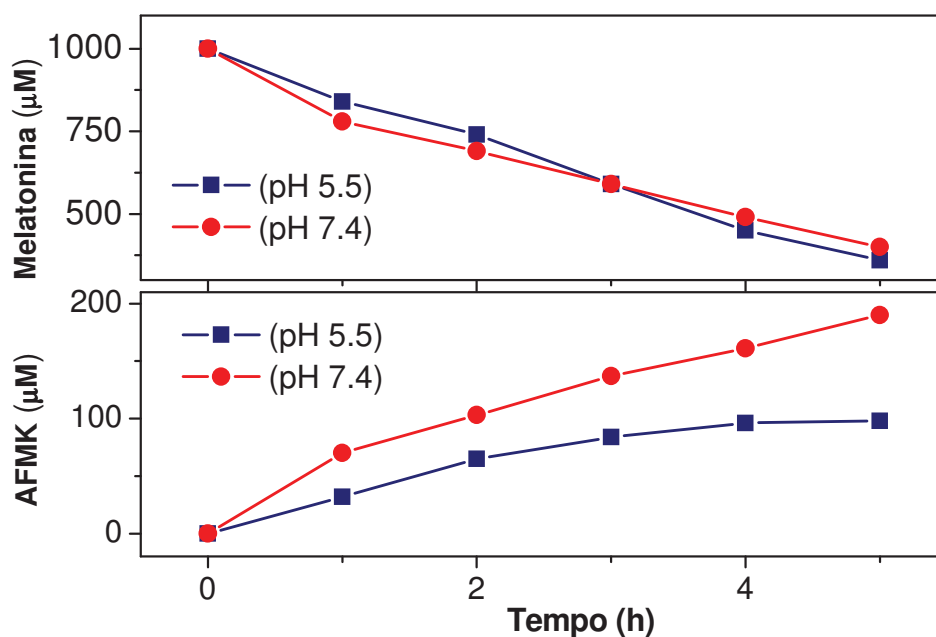


Figura 5 - Efeito de pH na oxidação de melatonina por $\text{ROO}^\bullet$. Condições de reação: melatonina (1 mM), AAPH (40 mM), tampão fosfato de sódio (0,05 M) pH 7,4 e 5,5 a 37°C. As concentrações foram medidas baseadas em padrões de melatonina e AFMK. Os resultados são médias de três experimentos.

Outro parâmetro que analisado foi o efeito da presença ou ausência de oxigênio dissolvido no meio de reação. Para isso, ao meio de reação foi borbulhado oxigênio ou argônio, neste último caso para torná-lo anaeróbico. Novamente não se verificou aumento no consumo de melatonina, no entanto, e igualmente ao estudo anterior, o rendimento de AFMK foi aumentado pela adição de oxigênio ao meio, como mostra a figura 6. Novamente, estes resultados estão de acordo aos estudos utilizando H_2O_2 /peroxidase.

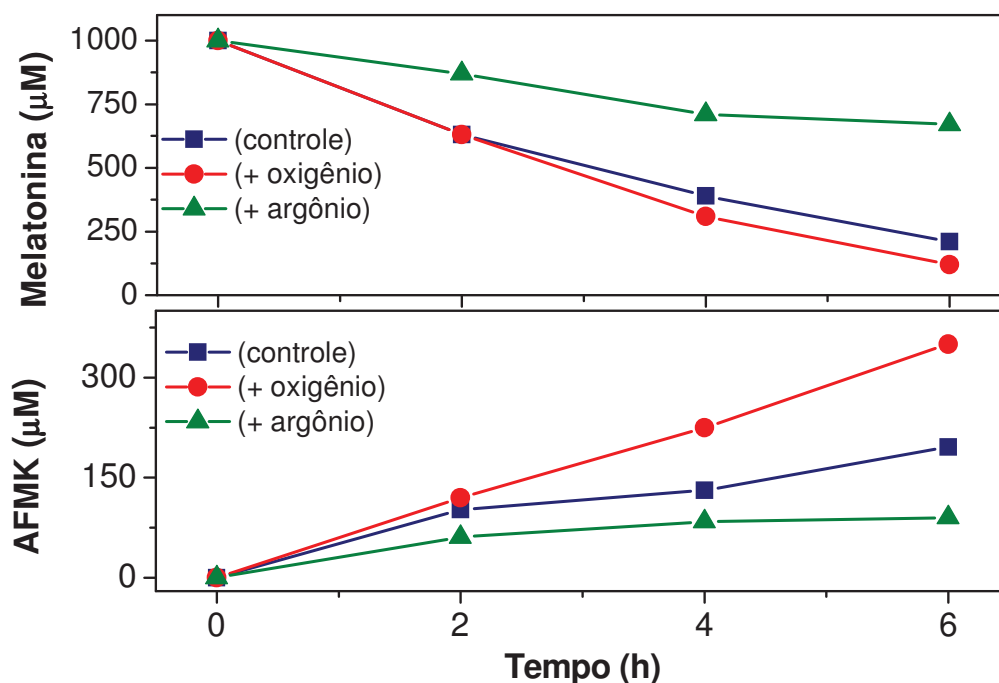


Figura 6 - Efeito de oxigênio dissolvido durante a oxidação da melatonina e produção de AFMK por $\text{ROO}\cdot$. Condições de reação: melatonina (1 mM), AAPH (40 mM), tampão fosfato de sódio (0,05 M) pH 7,4 a 37°C. As concentrações foram medidas baseadas em padrões de melatonina e AFMK. Os resultados são médias de três experimentos.

Os resultados acima permitem afirmar que a melatonina reage prontamente com os radicais peroxila gerados pela termólise do AAPH.

Para a comparação da atividade antioxidante entre a melatonina e o composto antioxidante endógeno glutathione (GSH), inicialmente analisou a oxidação da melatonina e avaliou se o GSH poderia inibir esta oxidação. Para isso, investigou o consumo de melatonina quando oxidada por radicais peroxila e analisou o efeito da adição de GSH (Figura 7). Estes estudos foram realizados por HPLC do mesmo modo que nos experimentos anteriores.

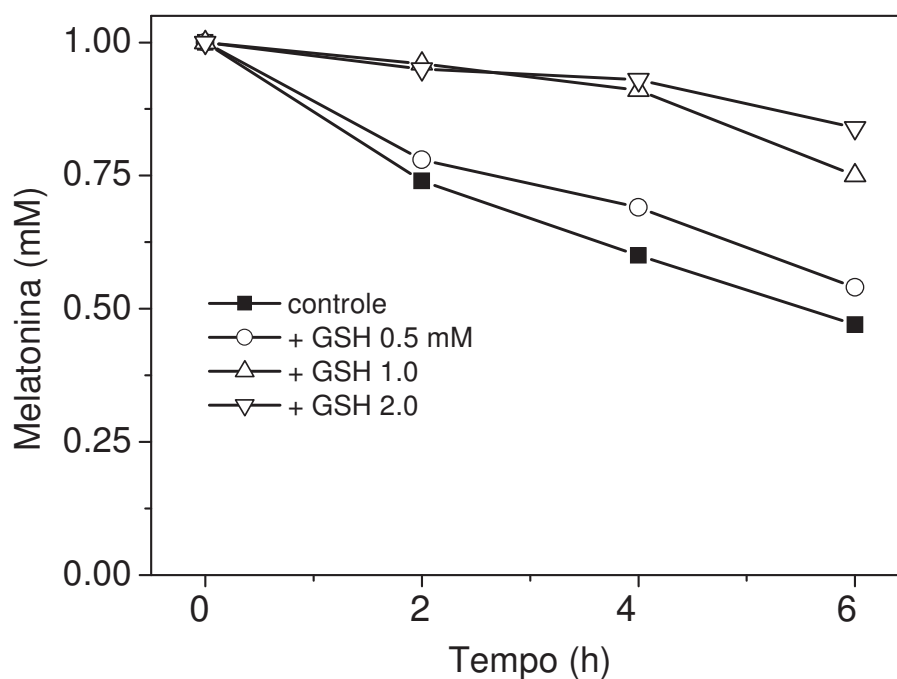
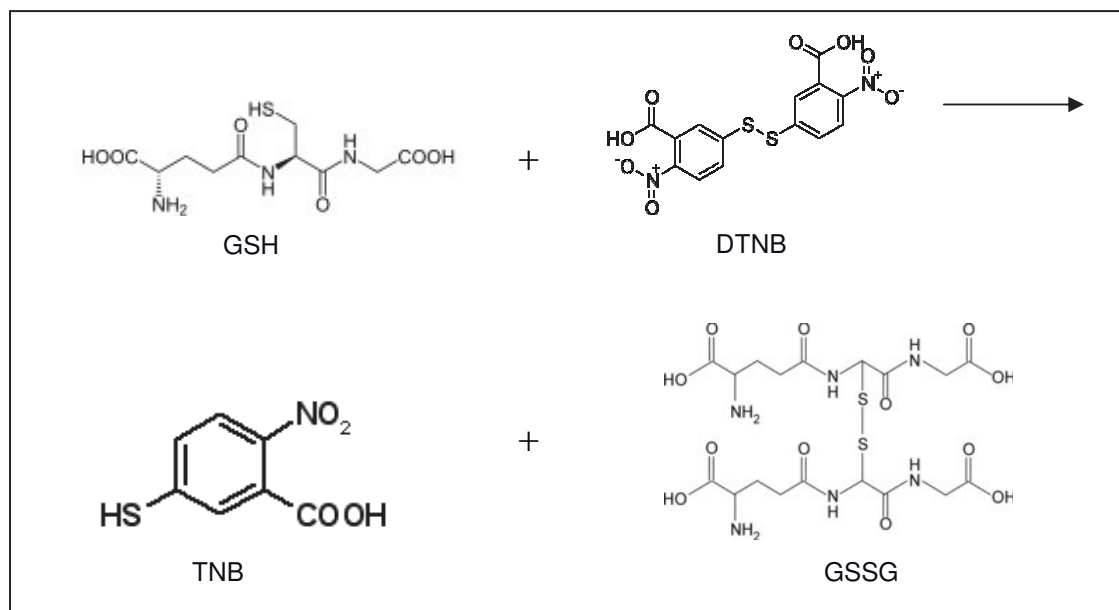


Figura 7 - Efeito de glutatona durante a oxidação da melatonina por $\text{ROO}^\bullet$. Condições de reação: melatonina (1 mM), AAPH (40 mM), tampão fosfato de sódio (0,05 M) pH 7,4 a 37°C. As concentrações foram medidas baseadas em padrões de melatonina. Os resultados são médias de três experimentos.

Como pode ser observado, apesar da boa reatividade entre a melatonina e os radicais peroxila, GSH inibe eficientemente esta oxidação.

Na sequência inverteu-se o experimento, ou seja, foi estudado o efeito da melatonina durante a oxidação da GSH. Para isso, foi montado um procedimento analítico para dosagem de GSH baseado na redução de DTNB, um esquema do método de DTNB é demonstrado no esquema 3 (KO et al., 1997).



Esquema 3 – Método de redução do DTNB

Como pode ser observado, nas condições de reação, encontrou-se uma boa cinética de oxidação do GSH por radicais peroxila (Figura 8). E como deveríamos esperar considerando os resultados anteriores, a melatonina não afetou a reação.

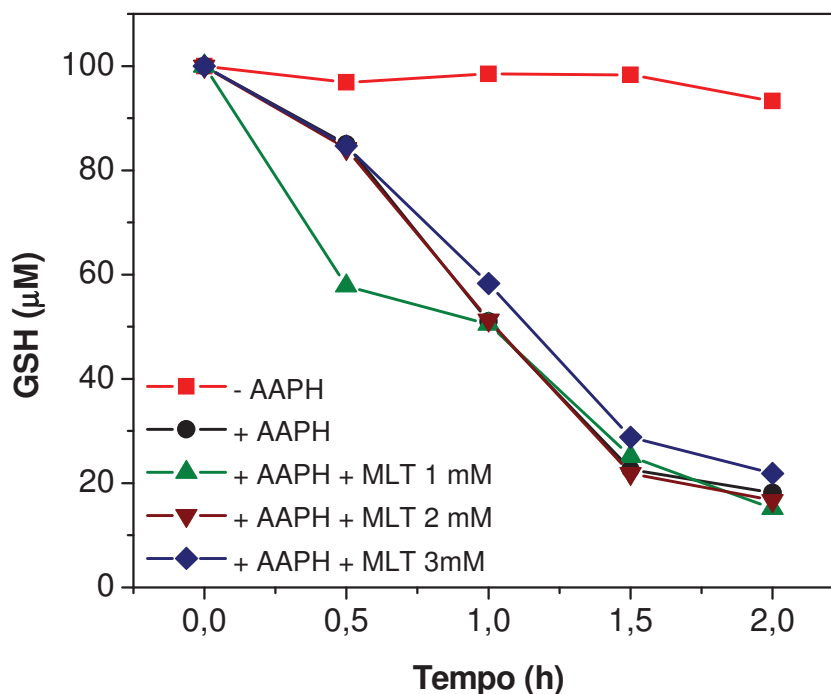


Figura 8 - Efeito da melatonina durante a oxidação da glutathiona por $\text{ROO}\cdot$. Condições de reação (controle positivo): GSH (100 μM), AAPH (2,5 mM), tampão fosfato de sódio (0,05 M) pH 7,4 a 37°C. Quando presente, melatonina foram adicionadas no início da reação. As concentrações foram medidas baseadas em soluções padrões de GSH. Os resultados são médias de três experimentos.

Os resultados dos dois últimos experimentos podem sugerir dois fenômenos: i) que de fato a GSH seja um melhor supressor de radicais peroxila do que a melatonina; ii) que ao ser formado, os radicais de melatonina possam também reagir com GSH, o que revelaria uma propriedade pró-oxidante da melatonina. Em ambos os casos seriam observados uma ausência de efeito da melatonina na oxidação de GSH, e de modo oposto, a GSH inibindo a oxidação da melatonina. Para estudar estes fenômenos em separado foi necessário utilizar outro sistema oxidante no lugar do AAPH. Isto se dá, pois a termólise do AAPH, e conseqüente geração de radicais peroxila, é um processo

lento se comparado a velocidade de reação entre estes radicais e substâncias oxidáveis de modo geral (NIKI, 1990). Assim, as velocidades de todos os eventos posteriores ficam limitadas à velocidade de termólise.

Para tentar resolver esta questão, foi realizado estudos da oxidação de GSH via o sistema oxidante peroxidase (HRP)/H₂O₂. A vantagem deste sistema é que a oxidação da GSH pelo mesmo é ineficiente se comparado a velocidade de oxidação da melatonina. Assim, caso fosse observado um aumento na velocidade de oxidação do GSH quando realizada na presença de melatonina, seria a indicação de uma reação entre radicais de melatonina e GSH. Os resultados mostrados na figura 9 comprovam que os radicais de melatonina gerados durante a sua oxidação, são capazes de oxidar GSH.

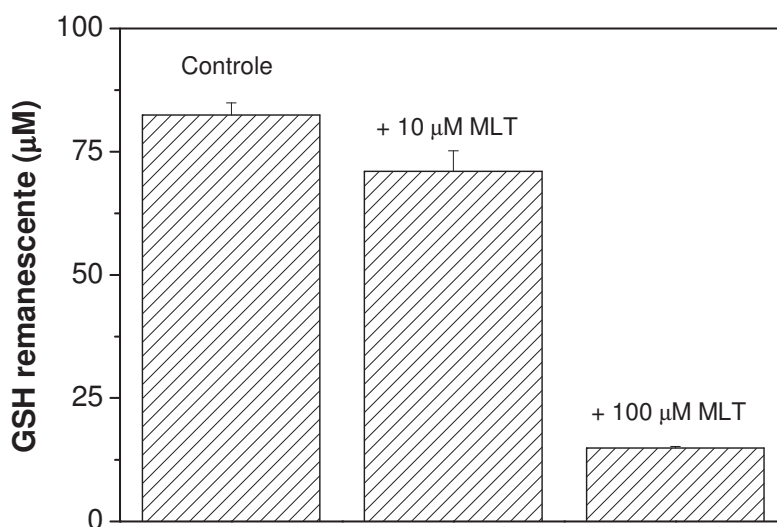


Figura 9 – Gráfico do efeito da melatonina durante a oxidação da glutatona por HRP/H₂O₂. Condições de reação (controle positivo): glutatona (100 μM), 0,5 μM HRP, 50 μM H₂O₂ em tampão PBS pH 7,4 a 37°C. A reação foi conduzida por 15 min e parada pela adição de catalase 10 μg/mL. Quando presente, melatonina foi adicionada no início da reação. As concentrações foram medidas baseadas em padrões de glutatona. Os resultados são médias de três experimentos.

No ensaio acima a concentração de GSH remanescente após oxidação foi medida pelo método da redução do composto DTNB (vide materiais e métodos). Para reforçar e melhorar a qualidade do resultado, analisou o consumo de GSH utilizando uma metodologia por HPLC acoplado ao detector de fluorescência (KAND'ÁR et al., 2007). A vantagem deste procedimento é que podemos também medir a formação de glutatona oxidada (GSSG). Os cromatogramas apresentados na figura 10 mostram o efeito da melatonina durante a oxidação do GSH.

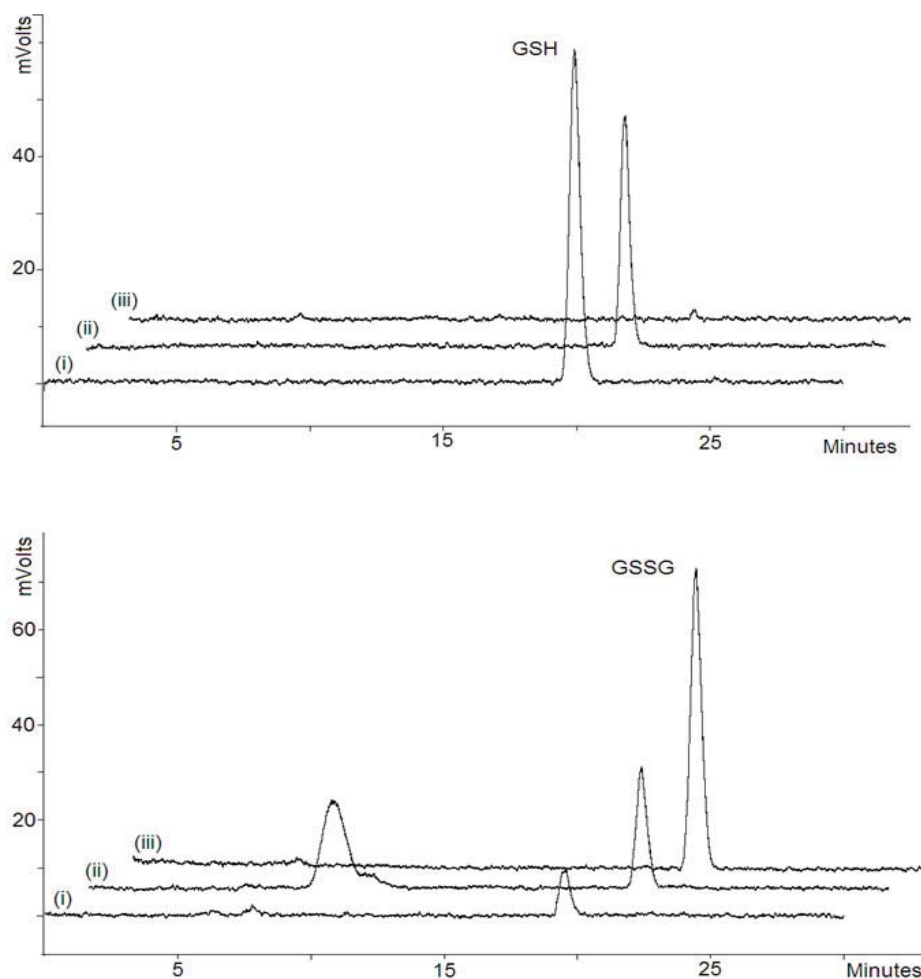


Figura 10 – Cromatograma do efeito da melatonina durante a oxidação da glutatona por HRP/H₂O₂. Condições de reação (controle positivo): glutatona (100 μ M), 0,5 μ M HRP, 50 μ M H₂O₂ em tampão PBS pH 7,4 a 37°C. A reação foi conduzida por 15 min e parada pela adição de catalase 10 μ g/mL. Quando presente, a melatonina (100 μ M) foi adicionada no início da reação. Os cromatogramas superiores representam as análises de GSH remanescente: i) padrão de GSH 100 mM, ii) reação na ausência de melatonina, iii) reação na presença de melatonina. Os cromatogramas inferiores representam as análises de GSSG: i) padrão de GSH 100 mM, ii) reação na ausência de melatonina, iii) reação na presença de melatonina.

Considerando que a melatonina, ou melhor, radicais de melatonina gerados durante a sua oxidação foram capazes de oxidar GSH, realizou-se ensaios para avaliar qual seria o efeito da mesma sobre o conteúdo de GSH presente em eritrócitos e submetidos a uma simulação de estresse oxidativo. Basicamente, os eritrócitos foram incubados com o AAPH na presença ou ausência de melatonina. A concentração final de GSH foi medida pela redução do DTNB após hemólise e precipitação de proteínas. O procedimento encontra-se na seção de materiais e métodos.

A figura 11 confirmou as expectativas, uma vez que novamente a presença de melatonina exacerbou a depleção do conteúdo intracelular de GSH.

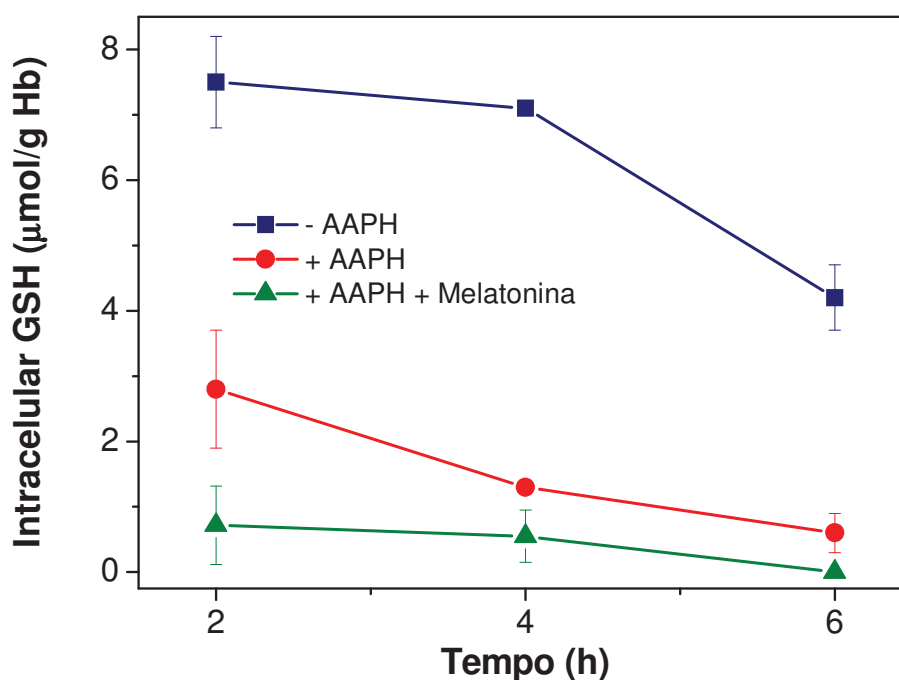


Figura 11 - Efeito da melatonina sobre a depleção de GSH intracelular em eritrócitos causada pela oxidação por radicais peroxila. Condições de reação (controle positivo): suspensão de eritrócitos 10% (v/v), 25 mM AAPH em PBS pH 7,4 a 37°C. Quando presente a concentração de melatonina foi de 100 μ M. A mistura de reação foi incubada por 2,5 h. A concentração remanescente de GSH foi determinada como descrito em materiais e métodos.

6. CONCLUSÕES

Este trabalho teve como principal justificativa uma aparente contradição entre os efeitos antioxidantes da melatonina e da glutathione. Em específico tratava-se a incapacidade da melatonina em inibir depleção do conteúdo intracelular de glutathione (GSH) provocado pelo AAPH, mas por outro lado, se mostrando um melhor antioxidante do que o GSH em modelos *in vitro* (TESORIERE et al., 1999; SOFIC et al., 2005). Foi estudado de modo comparativo a reatividade de ambas as moléculas GSH e melatonina com AAPH. Por meio destes estudos verificou-se que radicais intermediários gerados durante a oxidação da melatonina são capazes de oxidar a própria GSH e isto justificaria os trabalhos que mostram a incapacidade da melatonina em inibir a oxidação de GSH em células. Estes achados mostram que a melatonina possui propriedades pró-oxidantes, aqui em específico, a sua capacidade de oxidar grupos SH. A proposta é que a melatonina ao ser oxidada por EROs, sendo assim levada ao seu intermediário radicalar, poderia por sua vez, oxidar outras biomoléculas, ao invés de simplesmente neutralizar as EROs. Nossos achados não são a primeira evidência de uma possível propriedade pró-oxidante da melatonina. De fato, resultado similar foi relatado para a oxidação de NADPH por melatonina radical. O que temos de novo aqui é o seu efeito sobre grupos SH. Finalmente, nossos achados podem auxiliar na explicação de trabalhos recentes onde a melatonina foi descrita como capaz de depletar o conteúdo de GSH em células em cultura similar a macrófagos (células U937) (ALBERTINI et al., 2006).

7. REFERÊNCIAS

ABREU, Carla Sofia Valente. Electro-remediação de solos contaminados com pesticidas: caso da bentazona. 2008. (**Dissertação**). Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

AGUIAR, Lissiana Magna Vasconcelos. Efeitos comportamentais e neuroquímicos da melatonina em ratos submetidos à lesão estriatal com 6-OHDA. 2002. (**Dissertação**). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE.

ALBERTINI, M.C. et al. Intracellular pro-oxidant activity of melatonin deprives U937 cells of reduced glutathione without affecting glutathione peroxidase activity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, n. 1091, p. 10-16, 2006.

ALLEGRA, M. et al. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. **Journal of Pineal Research**, v. 34, p. 1-10, 2003.

ANTOLÍN, I. et al. Protective effect of melatonin in a chronic experimental model of Parkinson's disease. **Brain Research**, v. 943, p. 163–173, 2002.

ANTUNES, F. et al. On the antioxidant activity of melatonin. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p.117-128, 1999.

BARTSCH, C.; BARTSCH, H. The anti-tumor activity of pineal melatonin and cancer enhancing life styles in industrialized societies. **Cancer Causes Control**, v. 17, p. 559–571, 2006.

BLANCHARD, B.; POMPON, D.; DUCROQ, C. Nitrosation of melatonin by nitric oxide end peroxynitrite. **Journal of Pineal Research**, v. 29, p. 184-192, 2000.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Introdução a métodos cromatográficos. 6ª ed., Editora da Unicamp, 1995.

DEEPA, S. et al. Melatonin: new places in therapy. **Bioscience Reports**, v. 27 p. 299–320, 2007.

DZIEGIEL, P.; OKOLOW-PODHORSHA, M.; ZABEL, M. Melatonin: Adjuvant therapy of malignant tumors. **Medical Science Monitor**, v. 14, p. 64-70, 2008.

FORREST, C.M. et al. Inflammatory status and kynurenine metabolism in rheumatoid arthritis treated with melatonin. **British Journal of Clinical Pharmacology**. n. 64, v. 4, p. 517-426, 2007

GUPTA, M. et al. Effects of add-on melatonin administration on antioxidant enzymes in children with epilepsy taking carbamazepine monotherapy: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Epilepsia**, v. 45, p. 1636–1639, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, JMC. Free radicals in biology and medicine. **Oxford University Press**, Oxford, 1999.

IANAS, O.; OLIVESCU, R.; BADESCU, I. Melatonin involvement in oxidative processes. **Journal of Endocrinology**, v. 29, p. 117-123, 1991.

JOVANOVIĆ, S.V.; STEENKEN, S. Substituent effect on the spectral, acid base and redox properties of indolyl radicals: a pulse radiolysis study. **Journal of Physical Chemistry**, v. 96, p. 6674-6679, 1992.

KAND'ÁR, R. et al. Determination of reduced and oxidized glutathione in biological samples using liquid chromatography with fluorimetric detection, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 1382-1387, 2007.

KARASEK, M.; WINCZYK, K. Melatonin in humans. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 57, p. 19-39, 2006.

KERENYI, N.A.; PANDUKA, E.; FEUER, G. Why the incidence of cancer is increasing: the role of "light pollution". **Medical Hypotheses**, v. 33, p. 75-78, 1990.

KLEBANOFF, S.J. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, 2005.

KO, F.N.; HSIAO, G.; KUO, Y.H. Protection of oxidative hemolysis by demethyldiisoeugenol in normal and beta-thalassemic red blood cells, **Free Radical Biology & Medicine**, v. 22, p. 215-222, 1997.

LISSONI, P. et al. Clinical results with the pineal hormone melatonin in advanced cancer resistant to standard antitumor therapies. **Oncology**, v.48, p. 448-450, 1991.

MAESTRONI, G.J.M. et al.; Does melatonin play a disease-promoting role in rheumatoid arthritis?. **Journal of Neuroimmunology**, v. 158, p. 106-111, 2005.

MAHAL, H.S.; SHARMA, H.S.; MUKHERJEE, T. Antioxidant properties of melatonin: a pulse radiolysis study. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 557-565, 1999.

MAHARAJ, D.S. et al. Melatonin generates singlet oxygen on laser irradiation but acts as a quencher when irradiated by lamp photolysis. **Journal of Pineal Research**, v.38 p.153-156, 2005.

MARSHALL, K.A. et al. Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 21, p. 307-315, 1996.

MÜHLEN, C.V.; LANÇAS, F.M. Cromatografia Unificada. **Química Nova**, v.27, n. 5, p. 747-753, 2004.

NIKI, E. Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals. **Methods Enzymol.** v. 186 p. 100-108, 1990.

PIERI, C. et al. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. **Life Sciences**, v. 55, p. 271–276, 1994.

POEGGELER, B. et al. Melatonin – a high potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole assessed in vitro. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 738, p.419-420, 1974.

POEGGELER, B. et al. Melatonin and structurally related, endogenous indoles act as potent electron donors and radical scavengers in vitro. **Redox Report**, v. 2, p.179-184, 1996.

REITER, R.J. et al. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. **Journal of Biomedical Science**, v. 7, p.444-458, 2000.

REITER, R.J. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. **Progress Neurobiology**, v.56, p. 359-384, 1998.

ROBERTS, J.E.; HU, D.N.; MARTINEZ, L. Photo physical studies on melatonin and its receptor agonists. **Journal of Pineal Research**. v. 29, p. 94-99, 2000.

SCHERNHAMMER, E.S; HANKINSON, S.E. Light at night: a novel risk factor, 2003.

SOFIC, E. et al. Antioxidant capacity of the neurohormone melatonin. **Journal of Neural Transmission**, n. 112, v.3, p. 349-58, 2005.

SRINIVASAN, V. et al. Melatonin in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. **Behavioral and Brain Functions**, 2006.

TAN, D.X. et al. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. **Free Radical Biology & Medicine** v. 29, p. 1177-1185, 2000.

TAN, D.X. et al. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. **Journal of Endocrinology**, v.1, p. 57-60, 1993.

TAN, D.X. et al. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species?. **Journal of Pineal Research**, v. 42, p. 28-42, 2007.

TESORIERE, L. et al. Melatonin protects human red blood cells from oxidative hemolysis: new insights into the radical-scavenging activity. **Journal of Pineal Research**. n. 27, v.2 p. 95-105, 1999.

TONHI, E. et al. Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE–FR) Baseadas em Superfícies de Óxidos Inorgânicos Funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.

TURJANSKI, A.G. et al. O.E. N-nitrosomelatonin. **Acta Crystallographica Section C**, v. 56, p. 682-683, 2000.

VIJAYALAXMI, et al. Melatonin as a radioprotective agent: a review. **International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics**, v. 59, p. 639-653, 2004.

WU, Y.H.; SWAAB, D.F. The human pineal gland and melatonin in aging and Alzheimer's disease. **Journal of Pineal Research**, v. 38, p. 145-152, 2005.

XIMENES, V.F. et al. The effect of pH on horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of melatonin: production of N1-acetyl-N2-5-methoxykynuramine versus radical-mediated degradation. **Journal of Pineal Research**. v. 42. p. 291-296, 2007.

ZHOU, J.N. et al. Alterations in the circadian rhythm of salivary melatonin begin during middle-age. **Journal of Pineal Research**. v. 34, p. 11–16, 2003.