



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Isilda Catarina da Silva Amorim

Identificação e quantificação dos produtos de eletrólises efetuadas em condições fisiológicas e estudo da sua atividade toxicológica utilizando leveduras como modelos celulares

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

Trabalho efetuado sob a orientação de

Professora Doutora Maria de Fátima Malveiro Bento

e de

Professor Doutor João Carlos Ramos Nunes Marcos

janeiro de 2016

DECLARAÇÃO

Nome: Isilda Catarina da Silva Amorim

Título da dissertação:

Identificação e quantificação dos produtos de eletrólises efetuadas em condições fisiológicas e estudo da sua atividade toxicológica utilizando leveduras como modelos celulares

Orientadora:

Professora Doutora Maria de Fátima Malveiro Bento

Co-orientador:

Professor Doutor João Carlos Ramos Nunes Marcos

Ano de conclusão: 2016

Designação do Mestrado: Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidade do Minho, 29 de Janeiro de 2016

Assinatura: _____

Agradecimentos

Em primeira instância, queria demonstrar todo o meu apreço aos meus orientadores, Professora Doutora Fátima Bento e Professor Doutor João Carlos Marcos pela orientação, acompanhamento, incentivo, apoio, transmissão de conhecimentos e a confiança depositada em mim.

Um agradecimento especial, ao Doutor Professor Rui Oliveira pela disponibilidade, apoio e discussão que foram essenciais para a concretização dos estudos realizados com as células.

Aos meus colegas de laboratório, pelo bom ambiente e disposição e pelo companheirismo.

Aos meus amigos e namorado, por tudo o que representam, pelo ânimo, motivação e incentivo.

Por último agradeço profundamente aos meus pais e irmãs. Obrigada por terem possibilitado o concretizar de mais uma etapa. Obrigada pelo amor e apoio incondicional e por durante o trajeto que fiz até hoje escolarmente e pessoalmente me terem sempre ajudado na superação de obstáculos, alertado e encorajado. Obrigada por permanecermos unidos nos piores e melhores momentos da vida!

O meu sucesso deve-se a todos vocês.

Resumo

O tratamento eletroquímico (EChT) é uma modalidade alternativa para o tratamento de tumores com base na aplicação de uma corrente elétrica contínua no tecido tumoral, por meio de dois ou mais eletrodos colocados na zona do tumor ou nas áreas circundantes. Há relato de resultados promissores em ensaios clínicos realizados na China que mostram a regressão dos tumores, e em alguns casos a própria remissão total. Apesar destes resultados, tem havido muita relutância no mundo ocidental em aceitar este tratamento. A falta de evidências de natureza científica acerca do funcionamento destes tratamentos é uma das causas que pode justificar a falta de interesse pela medicina ocidental. Como resultado direto das eletrólises galvanostáticas que resultam da passagem de corrente elétrica nos tecidos, há referência à evolução de O_2 no ânodo e de H_2 no cátodo, provenientes da eletrólise da água. A maioria dos estudos *in vitro* reporta os efeitos relacionados com a acidificação na região do ânodo e da alcalinização na região do cátodo. Apesar de na presença de Cl^- ser referida a evolução de Cl_2 no ânodo, a sua detecção é normalmente realizada de uma forma qualitativa através do cheiro. A dissolução do Cl_2 dá origem à formação do HOCl, que é por sua vez um potente agente oxidante com capacidade para reagir com diferentes componentes celulares.

Este trabalho visa contribuir para o esclarecimento do papel do HOCl na eficiência do EChT. De modo a quantificar o HOCl produzido durante as eletrólises foi otimizado um método espectrofotométrico, baseado na reação com a curcumina. Este método permitiu a quantificação de quantidades muito reduzidas de HOCl em meio fisiológico (PBS) tendo sido utilizado posteriormente para quantificar esta espécie em diferentes condições experimentais relevantes na aplicação do EChT.

Os ensaios realizados mostraram que a produção de HOCl depende fortemente das condições experimentais da eletrólise. Dos efeitos estudados, o pH do meio mostrou ser o mais importante na medida em que pode limitar a produção de HOCl mesmo em condições em que a dose aplicada é elevada (tempo longos e intensidade de corrente altas). A acidificação junto ao ânodo, que tende a aumentar com a dose do tratamento, reduz a extensão de formação do HOCl, tornando o processo menos eficiente. Quando existe comunicação entre os produtos formados no ânodo e no cátodo ocorre um efeito de alcalinização do meio. Este aumento de pH demonstrou ser efetivo na solubilização do Cl_2 produzido no ânodo contribuindo para a formação de quantidades superiores de HOCl tanto por aumento da intensidade de corrente como do tempo de eletrólise.

O efeito em células vivas do HOCl produzido nas eletrólises foi testado utilizando culturas da levedura *S. Cerevisiae* como modelo. Observou-se que baixas concentrações de HOCl afetam drasticamente a viabilidade celular. Esta espécie demonstrou ter efeitos citotóxicos provocando a oxidação intracelular.

Abstract

The electrochemical treatment (EChT) is an alternative approach for the treatment of tumours by applying a continuous electric current to the tumour by means of two or more electrodes placed in the tumour area or at its surroundings. There are reports on positive results in clinical trials conducted in China, showing the regression, and in some cases the complete remission of tumours. Despite these results, the Western world is reluctant to accept this treatment. The lack of scientific evidence on the mechanism of action of this treatment is one of the causes that may justify lack of interest for this treatment by Western medicine.

As result of electric current, galvanostatic electrolysis of the extracellular medium occurs, taking place the O₂ evolution at the anode and the H₂ evolution at the cathode. The majority of the *in vitro* studies report the effect of acidification in the anode region and of alkalization at the cathode region. Although in the presence of Cl⁻, Cl₂ evolution is known to take place at the anode its production is reported following its odour detection.

This work aims to contribute to the clarification of the role of HOCl in EChT efficiency. The dissolution of Cl₂ gives rise to the formation of HOCl, which in turn is a potent oxidizing agent capable of reacting with different cellular material. In order to quantify the HOCl produced during electrolysis a spectrophometric method based on reaction with curcumin has been optimized. This method allowed the quantitation of small amounts of HOCl at the physiological medium (PBS) and was used to quantify this species formed in different experimental conditions that are relevant for EChT.

Results show that the amount of HOCl produced depends strongly on the experimental conditions of the electrolysis. The pH demonstrated to be the most important variable that can limit the production of HOCl, even for a high dose (long time and high current intensity). The medium acidification that increases during the treatment reduces the extent of HOCl formation and makes the process less effective. When the electrolysis is carried out in conditions that enable the mixture between the products formed at the anode and at the cathode, the medium alkalizing is noticed. The pH increase, which takes place with increasing current intensity and electrolysis time, is effective for solubilisation of the Cl₂ produced at the anode and contributes to formation of higher amounts of HOCl.

The effect in living cells of the HOCl produced by electrolysis was evaluated using culture of the yeast *S. cerevisiae* as model. It was observed that low concentrations of HOCl dramatically affect cell viability. This species was shown to have cytotoxic effects by causing intracellular oxidation.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo.....	iii
Abstract	v
Índice.....	vii
Índice de Tabelas.....	ix
Índice de Figuras	xi
Lista de Esquemas	xv
Lista de Abreviaturas.....	xvii
1. Introdução.....	3
1.1 Terapias convencionais contra o cancro	3
1.2 Tratamentos não convencionais contra o cancro	4
1.3 Tratamentos baseados em correntes elétricas.....	5
1.4 Resultados Clínicos.....	6
1.5 Estudos em sistemas biológicos.....	13
1.5.1 Animais.....	13
1.5.2 Tecidos.....	17
1.5.3 Células	19
1.6 Mecanismos de ação induzidos pelo EChT.....	23
1.6.1 Efeitos associados ao pH.....	25
1.6.2 Efeitos associados ao ácido hipocloroso	26
2 Parte Experimental.....	33
2.1 Reagentes.....	33
2.2 Preparação das soluções	33
2.2.1 Soluções tampão	33
2.2.2 Solução de hexacianoferrato(III) de potássio.....	34
2.2.3 Preparação de soluções de curcumina.....	34
2.3 Materiais e Métodos	35
2.4 Procedimentos experimentais	36
2.4.1 Método de quantificação do HOCl por reação com a Curcumina	36
2.4.2 Ensaio eletroquímico.....	38
2.4.3 Ensaio com células	39
3 Resultados e Discussão	45

3.1	Otimização do sistema de quantificação do HOCl pelo método da Curcumina	45
3.2	Geração eletroquímica e quantificação do HOCl	49
3.2.1	Eletrólises em célula com compartimentos separados, tempos curtos	51
3.2.2	Eletrólises em célula com compartimento único, tempos curtos.....	54
3.2.3	Comparação da produção de HOCl nas diferentes configurações da célula	57
3.2.4	Efeito do pH do meio na extensão da formação de HOCl.....	60
3.2.5	Efeito do tempo de eletrólise.....	62
3.3	Ensaio com células.....	63
4	Conclusões.....	71
5	Bibliografia	75

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Distribuição do tamanho dos tumores de pulmão ¹²	7
Tabela 1.2 - Eficácia a curto prazo do cancro do pulmão. RC = Resposta completa; RP = Resposta parcial; SA = sem alterações; DP = doença progressiva ¹²	7
Tabela 1.3- Eficácia a curto prazo (6 meses) do EChT em tumores malignos superficiais. RC = Resposta completa; RP = Resposta parcial; SA = sem alterações; DP = doença progressiva ¹⁸	9
Tabela 1.4 - Eficácia a longo prazo (1 – 5 anos) do EChT em tumores malignos superficiais ¹⁸	9
Tabela 1.5 - Eficácia a curto prazo (6 meses) do EChT em tumores malignos viscerais. RC = Resposta completa; RP = Resposta parcial; SA = sem alterações; DP = doença progressiva ¹⁸	10
Tabela 1.6 - Eficácia a longo prazo (1 – 5 anos) do EChT em tumores malignos viscerais ¹⁸	10
Tabela 1.7 - Eficácia a curto prazo (6 meses) do EChT em tumores benignos. RC = Resposta completa; RP = Resposta parcial; SA = sem alterações; DP = doença progressiva ¹⁸	11
Tabela 1.8 - Eficácia a longo prazo (1 – 5 anos) do EChT em tumores benignos ¹⁸	11
Tabela 1.9 - Tipos de tumores dos pacientes, dose aplicada a cada tumor e percentagem da redução do tumor obtida após o EChT ²⁰	12
Tabela 1.10 - Volume dos tumores antes e após o tratamento. GCD = Grupo controlo doente (sem tratamento); GT= grupo tratado ²³	14
Tabela 1.11 - Resultados de sobrevivência em função da dose do EChT ²⁵	16
Tabela 1.12 - Taxas de sobrevivência obtida para ratos C3H/HeJ para diferentes configurações de elétrodos ¹⁷	17
Tabela 1.13 - Efeito da EChT no ensaio clonogénico de células humanas KB ¹⁶	21
Tabela 1.14 – Efeito da corrente e tempo no EChT ¹⁶	22
Tabela 2.1 - Volumes usados na preparação por diluições sucessivas das soluções de CUR (v = 10 ± 0,025 mL)	35
Tabela 2.2 – Volumes de eletrolisado retirados para tempos de eletrólises previamente definidos usando diferentes concentrações de CUR	37
Tabela 3.1 – Volumes de eletrolisado adicionados a 3 mL de CUR 10 µM, após 600 segundos de eletrólise em PBS 140 mM a I = 0,45 A	46
Tabela 3.2 – Observações registadas para os diferentes solventes utilizados na preparação da solução de CUR	46
Tabela 3.3 – Valores de desvio padrão relativo (DPR) obtidos considerando as medidas de absorvância obtidas a diferentes tempos de leitura	49
Tabela 3.4 - Efeito da concentração de ião cloreto na eficiência da reação de produção HOCl em eletrólises efetuadas em célula de dois compartimentos, I = 0,45 A, para um tempo de eletrólise de 200	

segundos. Os intervalos de confiança correspondem aos desvios padrão calculados a partir dos resultados de pelo menos 2 eletrólises.....	52
Tabela 3.5 - Efeito da intensidade de corrente na eficiência da reação de produção HOCl em eletrólises efetuadas em célula de dois compartimentos, [Cl⁻] = 140 mM e um tempo de eletrólise de 200 s. Os intervalos de confiança correspondem aos desvios padrão calculados a partir dos resultados de pelo menos 2 eletrólises.....	54
Tabela 3.6 - Efeito da concentração de íão cloreto na eficiência da reação de produção HOCl em eletrólises efetuadas em célula de compartimento único, a uma intensidade de corrente de 0,45 A, para um tempo de eletrólise de 200 segundos. Os intervalos de confiança correspondem aos desvios padrão calculados a partir dos resultados de pelo menos 2 eletrólises.....	55
Tabela 3.7 - Efeito da intensidade de corrente na eficiência da reação de produção HOCl em eletrólises efetuadas em célula de dois compartimentos, [Cl⁻] = 140 mM e um tempo de eletrólise de 200 s. Os intervalos de confiança correspondem aos desvios padrão calculados a partir dos resultados de pelo menos 2 eletrólises.....	57
Tabela 3.8 - Concentração de HOCl produzido para os diferentes tempos de eletrólise e utilizado para o tratamento com as células. Soluções PBS com [Cl⁻] = 140 mM foram eletrolisadas na célula de compartimento único, I = 0,45 A.....	64
Tabela 3.9 - Concentração de HOCl produzido por diferentes tempos de eletrólise e viabilidades obtidas para a concentração de HOCl utilizada no tratamento com as células, num tempo de incubação de 5 min. As soluções PBS com [Cl⁻] = 70 mM foram eletrolisadas na célula de compartimento único, I = 0,45 A.....	65
Tabela 3.10 - Viabilidades obtidas para as concentrações de HOCl utilizadas no tratamento das células, proveniente de diluições do eletrolisado de 95 s, num tempo de incubação de 5 min. Soluções PBS com [Cl⁻] = 70 mM foram eletrolisadas na célula de compartimento único, I = 0,45 A.....	65

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Pacientes de cancro do pulmão: 1 – 5 anos de taxas de sobrevivência no geral após o tratamento eletroquímico ¹²	8
Figura 1.2 - 1A: Criança de 16 anos com múltiplos hemangiomas na língua, lábios e maxilo-facial. 1B: Um mês após o EChT. 2A: Homem de 32 anos, com hemangioma no corpo da língua. 2B: Dez meses após o EChT ¹⁹	12
Figura 1.3 - Posição dos elétrodos de platina no tumor ²²	13
Figura 1.4 - Taxa de sobrevivência antes (-□-) e depois (-Δ-) do tratamento do EChT em ratinhos com o tumor induzido do cancro da mama (A) e em ratinhos com fibrossarcoma (B) ²²	14
Figura 1.5 - Efeito do EChT na curva de crescimento dos tumores Ehrlich e Fibrossarcoma ²⁴	15
Figura 1.6 - Volume total de necrose em função da carga elétrica com diferentes espaçamentos entre os dois elétrodos ²⁹	18
Figura 1.7 - Efeito do EChT na produção de células mortas, horas após o tratamento. HL-60, EOL-1, linfócitos e células PMN que foram tratadas com DC (5 mA) para 0 (●), 1 (◇), 3 (□) ou 7 (Δ) minutos ³⁰	20
Figura 1.8 - Circuito de alimentação da EChT no sistema de exposição in vitro. A fonte de alimentação DC fornece uma corrente constante. O ajustador foi conectado ao ânodo na DC do fornecimento de energia, que foi ligado a um dos elétrodos. O outro elétrodo foi ligado ao cátodo da fonte de alimentação DC ¹⁶	20
Figura 1.9 – Efeito do EChT na citotoxicidade dependente da dose em células tumorais de humanos KB. As doses de 0,15, 0,3, 0,6, 1,2 e 2,4 C/mL foram resultantes de 4,5 V, 600 μA em 5 mL para 20,8, 41,7, 83,3, 166,7 e 333,3 minutos, respetivamente ¹⁶	21
Figura 1.10 – Representação esquemática das câmaras acrílicas usadas para o tratamento eletroquímico. Neste sistema as células são expostas diretamente às reações anódicas (CA), reações catódicas (CC) ou a um fluxo de iões na camara intermédia (CI) ³²	22
Figura 1.11 - Perfil eletroforético de DNA em gel de agarose. Controlo (a); tratamento catódico (b), tratamento na IC (c) e tratamento anódico (d) ³¹	23
Figura 1.12 – Curva de distribuição das espécies de cloro em soluções aquosas.....	25
Figura 2.1 – Reação da curcumina com o HOCl ⁶⁸	36
Figura 3.1 – Reta de calibração da absorvância em função da concentração de CUR.....	47
Figura 3.2 – Espectros de absorvância obtidos nos diferentes tempos de eletrólise para as diferentes concentrações iniciais de CUR em EtOH/PBS (1:1).....	48
Figura 3.3 – Quantidade de HOCl produzida em eletrólises realizadas nas eletrólises galvanostáticas (I = 0,45 A), em diferentes concentrações de [Cl ⁻], em célula de dois compartimentos e para um tempo de eletrólise de 200 segundos. Os resultados estão apresentados sob a forma $n_{HOCl} \pm$ desvio padrão, obtido a partir de pelo menos 2 eletrólises.....	52

Figura 3.4 – Rendimento da produção de HOCl em função da concentração de íão cloreto presente na solução de PBS.	53
Figura 3.5 – Quantidade de HOCl produzida em eletrólises realizadas numa solução de PBS a diferentes intensidades de corrente, $[Cl^-] = 140 \text{ mM}$, em célula de dois compartimentos e para um tempo de eletrólise de 200 segundos. Os resultados estão apresentados sob a forma $n_{HOCl} \pm$ desvio padrão, obtido a partir de pelo menos 2 eletrólises.	54
Figura 3.6 - Quantidade de HOCl produzida em eletrólises realizadas nas eletrólises galvanostáticas ($I = 0,45 \text{ A}$), em diferentes concentrações de $[Cl^-]$, em célula de um compartimento e para um tempo de eletrólise de 200 segundos. Os resultados estão apresentados sob a forma $n_{HOCl} \pm$ desvio padrão, obtido a partir de pelo menos 2 eletrólises.	55
Figura 3.7 - Rendimento da produção de HOCl em função da concentração de íão cloreto presente na solução de PBS.	56
Figura 3.8 - Quantidade de HOCl produzida em eletrólises realizadas numa solução de PBS a diferentes intensidades de corrente, $[Cl^-] = 140 \text{ mM}$, em célula de compartimento único e para um tempo de eletrólise de 200 segundos. Os resultados estão apresentados sob a forma $n_{HOCl} \pm$ desvio padrão, obtido a partir de pelo menos 2 eletrólises.	56
Figura 3.9 - A) Valores de pH obtidos para as eletrólises realizadas em PBS com diferentes teores de cloreto, numa célula de dois compartimentos, a uma intensidade de corrente $0,45 \text{ A}$, para um tempo de eletrólise de 600 segundos. B) Valores de pH obtidos para as eletrólises realizadas a diferentes intensidades de corrente, a uma concentração de $[Cl^-] = 140 \text{ mM}$, numa célula de dois compartimentos, para um tempo de eletrólise de 600 segundos.	58
Figura 3.10 - A) Valores de pH obtidos para as eletrólises realizadas em PBS com diferentes teores de cloreto, numa célula de compartimento único, a uma intensidade de corrente $0,45 \text{ A}$, para um tempo de eletrólise de 600 segundos. B) Valores de pH obtidos para as eletrólises realizadas a diferentes intensidades de corrente, a uma concentração de $[Cl^-] = 140 \text{ mM}$, numa célula de compartimento único, para um tempo de eletrólise de 600 segundos.	58
Figura 3.11 – Comparação entre a quantidade de HOCl produzida na célula eletroquímica de dois compartimentos e de compartimento único, em eletrólises galvanostáticas, para um tempo de eletrólise de 600 segundos, nas diferentes variáveis: A) Intensidade de corrente, $[Cl^-] = 140 \text{ mM}$; B) Concentração de cloreto, $I = 0,45 \text{ A}$. Os resultados estão apresentados sob a forma $n_{HOCl} \pm$ desvio padrão, obtido a partir de pelo menos 2 eletrólises.	60
Figura 3.12 - Estudo do efeito da intensidade de corrente na extensão da reação, por comparação do número de moles obtidos (μmol) de HOCl nas eletrólises efetuadas a diferentes intensidades de corrente com e sem acerto de pH. Os resultados estão apresentados sob a forma $n_{HOCl} \pm$ desvio padrão, obtido a partir de pelo menos 2 eletrólises.	61
Figura 3.13 - Estudo do efeito da configuração da célula eletroquímica na extensão da reação, por comparação entre o número de moles de HOCl obtidos nas eletrólises efetuadas na célula de um e de dois compartimentos com e sem acerto de pH. Os resultados estão apresentados sob a forma $n_{HOCl} \pm$ desvio padrão, obtido a partir de pelo menos 2 eletrólises.	61
Figura 3.14 - A) Número de moles de HOCl produzidos ao longo dos diferentes tempos de eletrólise para as diferentes concentrações de íão cloreto. B) Número de moles de HOCl produzidos ao longo dos diferentes tempos de eletrólise para as diferentes intensidades de correntes aplicadas. Os resultados estão apresentados sob a forma $n_{HOCl} \pm$ desvio padrão, obtido a partir de pelo menos 2 eletrólises, numa célula eletroquímica de dois compartimentos.	62

Figura 3.15 - A) Número de moles de HOCl produzidos ao longo dos diferentes tempos de eletrólise para as diferentes concentrações de íão cloreto. B) Número de moles de HOCl produzidos ao longo dos diferentes tempos de eletrólise para as diferentes intensidades de correntes aplicadas. Os resultados estão apresentados sob a forma $n_{\text{HOCl}} \pm$ desvio padrão, obtido a partir de pelo menos 2 eletrólises, numa célula eletroquímica de compartimento único.....63

Figura 3.16 – Efeito do HOCl presente na solução de PBS eletrolisado ($I = 0,45$ A, $[\text{Cl}^-] = 70$ mM, $t = 95$ s) diluída num fator de diluição de 0,1 e do PBS eletrolisado para um tempo de eletrólise de 30 s, na viabilidade das células, para diferentes tempos de incubação. A viabilidade foi calculada tomando como referência o tempo de incubação com PBS eletrolisado para $t = 0$. Os dados representados correspondem à média \pm o desvio padrão de três experiências independentes.66

Figura 3.17 - Oxidação intracelular de células *S.Cerevisiae* expostas a HOCl. Células carregadas com H_2DCFDA foram incubadas com PBS eletrolisado diluído num fator de diluição de 0,1 durante 1 e 3 minutos e subsequentemente a fluorescência intracelular foi medida. A solução de PBS, $[\text{Cl}^-] = 70$ mM foi eletrolisada durante 95 segundos numa célula de compartimento único, a $I = 0,45$ A e diluída de seguida num fator de diluição de 0,1. Os dados são representativos de três experiências independentes.67

Lista de Esquemas

Esquema 1.1- Tipos de terapias não convencionais, com maior relevância para as terapias baseadas em energia.5

Esquema 1.2 – Reação do HOCl com as diferentes moléculas biológicas. Muitas destas reações levam à formação de radicais livres, com consequentes efeitos biológicos⁵⁰.30

Lista de Abreviaturas

Δ [CUR]	Varição da concentração de curcumina
AC	Corrente alternada (do inglês, <i>Alternating Current</i>)
A.C.	Adenocarcinoma
ATP	Adenosina trifosfato (do inglês, <i>Adenosine Triphosphate</i>)
CA	Câmara anódica
CC	Câmara catódica
C.E.	Carcinoma de células escamosas
CI	Câmara intermediária
C.I.	Carcinoma indiferenciado
CUR	Curcumina
DC	Corrente contínua (do inglês, <i>Direct Current</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DO	Densidade ótica
DP	Doença progressiva
DPR	Desvio padrão relativo
EChT	Tratamento eletroquímico (do inglês, <i>Electrochemical Treatment</i>)
g	Força centrífuga
GCD	Grupo controlo doente
GSH	Glutationa
GT	Grupo tratado
H ₂ DCFDA	Diacetato de diclorofluoresceína
I	Intensidade de corrente
LDD	Limite de deteção
LDQ	Limite de quantificação

LHG	Hemangioma Lingual (do inglês, <i>Lingual Hemangioma</i>)
n_e	Número de moles de elétrões
$n_{HOCl,ad}$	Número de moles de HOCl, adicionado ao volume de curcumina
$n_{HOCl,t}$	Número total de moles de HOCl
PB	Tampão fosfato (do inglês, <i>Phosphate Buffer</i>)
PBS	Tampão fosfato salina (do inglês, <i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PMN	Células polimorfonucleares
p/v	Peso/volume
RC	Resposta completa
RP	Resposta parcial
r	Coefficiente de correlação
SA	Sem Alterações
UV-vis	Ultravioleta visível
v	Volume
$V_{Cél}$	Volume da célula eletroquímica
V_{CUR}	Volume de curcumina
V_{aliq}	Volume da alíquota de eletrolisado

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

No presente capítulo é realizada uma revisão bibliográfica dos trabalhos desenvolvidos mais relevantes para a compreensão do tema.

1.1 Terapias convencionais contra o cancro

O cancro é uma doença que afeta milhões de pessoas em todo o mundo e, por isso, a investigação nesta área é uma constante de modo a perceber as suas origens, como progride, assim como as formas de prevenir, detetar e de a tratar. A melhoria da qualidade de vida e sobrevivência dos pacientes durante e após os tratamentos é também sempre considerada paralelamente com a eficácia das terapias¹.

As terapias convencionais, nomeadamente a quimioterapia e a radioterapia, são os planos de tratamento mais utilizados na cultura ocidental atual. A quimioterapia é um tipo de tratamento de cancro, que utiliza fármacos que matam as células cancerígenas e/ou limitam o seu crescimento. Os fármacos podem ser administrados ao paciente por via oral, em forma de comprimidos, ou através de injeções intravenosas. No entanto, este tipo de tratamento pode afetar do mesmo modo as células normais. Por isso mesmo, a quimioterapia tem vários efeitos secundários, incluindo a perda de cabelo, infertilidade, problemas na bexiga e rins, modificações na pele e unhas, fadiga e cansaço, entre outros².

Por sua vez, a radioterapia consiste no uso de radiações de elevada energia para matar as células cancerígenas, impedindo a divisão das mesmas. A radiação também pode afetar as células normais que rodeiam a zona a ser tratada³ e os seus efeitos colaterais dependem muito da zona onde são aplicadas as radiações. Por exemplo, se a radiação incidir na zona abdominal pode provocar náuseas, vômitos e diarreia, mas se incidir na zona do pescoço e da cabeça pode provocar perda de apetite, boca seca, saliva espessa, dor ao engolir e ao mastigar⁴.

Devido aos efeitos adversos que a quimioterapia e a radioterapia possuem, há interesse no desenvolvimento de novas metodologias de tratamento menos invasivas e geralmente mais acessíveis, denominados por terapias não convencionais, que podem ser complementares ou mesmo substituir as terapias convencionais.

1.2 Tratamentos não convencionais contra o cancro

Os tratamentos não convencionais são cada vez mais procurados por doentes com cancro. Estas terapias, ditas alternativas, baseiam-se em diferentes recursos/aproximações (**Esquema 1.1**). De acordo com a classificação apresentada, estas podem dividir-se em diferentes grupos, nomeadamente em terapias ao corpo e à mente, tratamentos com recurso a produtos naturais, tratamentos baseados na dieta e nutrição, terapias baseadas em células, e em terapias baseadas em energia.

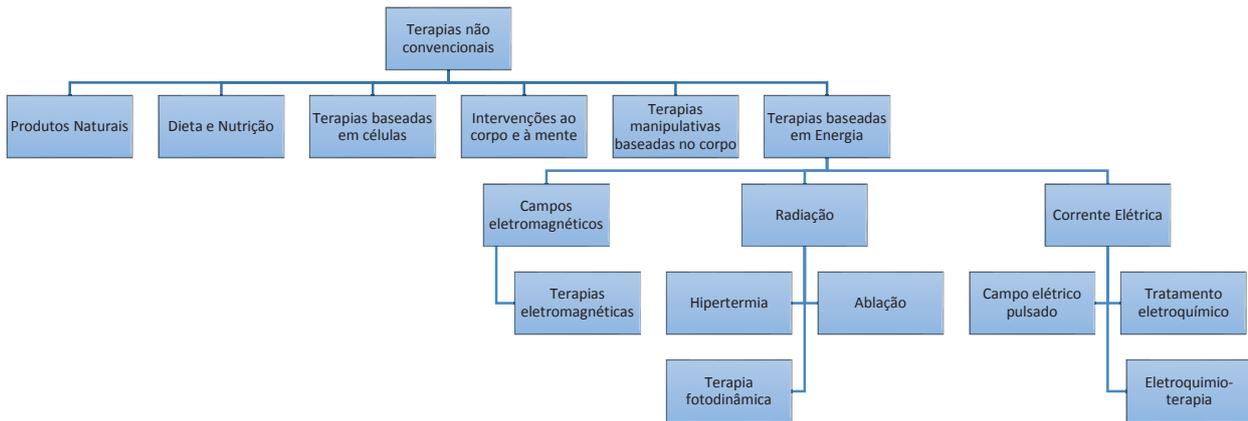
As terapias ao corpo e à mente são todas as aproximações que se baseiam no aumento da capacidade mental, de modo a alterar a função biológica do corpo. As terapias ao corpo e à mente incluem aproximações psicológicas, emocionais, sociais, expressivas e espirituais. As terapias manipulativas e baseadas no corpo consistem na manipulação física do corpo, por exemplo, utilizando as mãos ou pés.

Os tratamentos com recurso a produtos naturais faz uso de substâncias que se encontram na natureza que possuem uma atividade biológica ou farmacológica e que são originárias de várias fontes como plantas, animais, bactérias ou fungos.

Os tratamentos baseados na dieta e nutrição, baseiam-se na ingestão controlada de alimentos e bebidas específicas com a intenção de influenciar a evolução da doença.

As terapias baseadas em células, envolvem a administração de células humanas manipuladas do próprio paciente, ou não, e por isso estão divididas em duas classes: Terapia de células autólogas, que abrange os tratamentos em que os glóbulos brancos do sangue são isoladas a partir do paciente, manipuladas em laboratório e subsequentemente administradas ao paciente; As terapias de células homólogas cobrem tratamentos nos quais células humanas que não são do próprio paciente são manipuladas no laboratório e subsequentemente administradas ao paciente.

As terapias baseadas em energia podem dividir-se de acordo com o tipo de energia que utilizam, nomeadamente, campos eletromagnéticos, radiação (incluindo ondas de rádio, micro-ondas e raios infravermelhos) e corrente elétrica⁵. Por sua vez, as terapias baseadas no uso de eletricidade, estão subdivididas em terapias baseadas em campos elétricas pulsados, tratamentos eletroquímicos (EChT) e eletroquímio-terapia.



Esquema 1.1- Tipos de terapias não convencionais, com maior relevância para as terapias baseadas em energia.

1.3 Tratamentos baseados em correntes elétricas

A corrente elétrica consiste num fluxo de eletrões, que pode ser corrente alternada (AC, do inglês *Alternating Current*) ou corrente contínua (DC, do inglês *Direct Current*). A corrente alternada descreve o fluxo de carga que muda de direção periodicamente e a corrente contínua descreve o fluxo de carga elétrica que ocorre apenas numa direção e é constante.

A corrente alternada é usada na terapia de desfibrilhação, que é um dos tratamentos mais eficazes contra a fibrilhação ventricular⁶ (descoordenação da contração dos ventrículos do coração) e também tem sido também usada na investigação do controlo motor em pacientes com a doença de Parkinson⁷. Este tipo de corrente também é usada no tratamento de tumores. Os campos elétricos alternados usados nestes tratamentos são tipicamente na gama de 1-6 V/cm, com frequências entre os 100-300 kHz^{8,9}.

As correntes contínuas são também amplamente usadas na medicina existindo estudos extensivos sobre o seu uso na área da oncologia. Nos casos em que os elétrodos são inseridos subcutaneamente, as correntes aplicadas dão origem a reações eletroquímicas na região dos tumores e a terapia é designada de tratamento eletroquímico (EChT, do inglês *Electrochemical Treatment*) ou eletroterapia (**Esquema 1.1**).

A eficácia do EChT é conhecida desde o século XIX no seguimento do trabalho do médico sueco Bjorn Nordenström particularmente no tratamento de cancro do pulmão¹⁰. Desde então, baseados nas experiências de Nordenström, o professor Xin Yu-Ling e outros investigadores publicaram muitos estudos interessantes, baseados numa grande quantidade de dados clínicos com pacientes na China^{11,12,13}. A terapia consiste na passagem de corrente elétrica contínua

através de dois ou mais elétrodos inseridos localmente no tecido tumoral^{14,15} ou numa vizinhança próxima¹⁵, de modo a induzir a regressão do tumor¹⁶. A DC pode influenciar o crescimento e a biologia celular de vários sistemas e, por isso, tem sido usada no tratamento de tumores¹⁷. Na verdade, a destruição dos tecidos foi avaliada numa ampla gama de tumores sólidos¹⁴.

O EChT tem um custo relativamente baixo, sendo considerado seguro e com um efeito traumático mínimo¹⁴. Têm sido relatados alguns efeitos colaterais desta terapia, como por exemplo, dor local e febre¹⁸. Mesmo assim, é uma opção de tratamento eficaz sendo especialmente adequada para pacientes que não são indicados para cirurgia ou pacientes cujos tumores não respondem à rádio ou à quimioterapia¹⁴.

1.4 Resultados Clínicos

Vários investigadores reportaram resultados encorajadores relativamente ao EChT, nomeadamente efeitos anti tumorais em vários tipos de tumores que incluem o cancro do pulmão, do fígado, da mama, da próstata e cancro da pele¹⁴. A maioria dos estudos foram realizados há mais de 10 anos atrás, muitos deles na China, onde foi relatado um grande número de pacientes tratados. Um estudo piloto do EChT foi conduzido com 386 pacientes com cancro do pulmão¹², em que 287 destes casos eram do sexo masculino, 99 eram do sexo feminino e a idade dos pacientes variava entre os 28 e 78 anos. Exames patológicos revelaram que 203 casos eram carcinomas de células escamosas (cancro da pele), 138 casos eram adenocarcinomas (neoplasia epitelial do tecido que tem origem glandular) e 45 eram carcinomas indiferenciados. Os tumores variavam em tamanho conforme a **Tabela 1.1**.

Os elétrodos utilizados no tratamento eletroquímico eram de platina, o ânodo era colocado no centro do tumor enquanto o cátodo era colocado na periferia do mesmo. Os parâmetros usados no tratamento eram de 40 – 80 miliampères (mA) e uma carga de 100 C por centímetro de diâmetro da massa tumoral. A eficácia terapêutica foi avaliada num curto prazo (6 meses depois da aplicação do tratamento) e a longo prazo (1 a 5 anos depois da aplicação do EChT).

De acordo com a **Tabela 1.2** verificou-se que o tipo de cancro para qual o tratamento foi mais eficaz foi o carcinoma das células escamosas, com uma eficácia total, resposta completa (RC) + resposta parcial (RP), de 83 %. No global dos 386 casos de tumores, apurou-se uma eficácia total de 72 %.

Os autores deste estudo também concluíram que a eficácia total do tratamento era maior para tumores de menores dimensões. Para tumores entre os 4,0 – 6,0 cm obtiveram uma eficácia total de 87 %. Para os tumores entre 8,1 – 10,0 cm e maiores do que 10,0 cm obtinham uma resposta de 63 e 37 % respetivamente.

Tabela 1.1 - Distribuição do tamanho dos tumores de pulmão¹².

Tipo de cancro	Nº de casos	4,0 – 6,0 cm		6,1 – 8,0 cm		8,1 – 10,0 cm		> 10 cm	
		n	%	n	%	n	%	n	%
C.E.	203	47	23,2	86	42,4	47	23,2	23	11,3
A.C.	138	34	24,6	63	45,7	28	20,3	13	9,4
C.I.	45	1	2,2	4	8,9	27	60,0	13	28,9
Total	386	82	21,2	153	39,6	102	26,4	49	12,7

C.E., Carcinoma de células escamosas; A.C., Adenocarcinoma; C.I., Carcinoma indiferenciado

Tabela 1.2 - Eficácia a curto prazo do cancro do pulmão. RC = Resposta completa; RP = Resposta parcial; SA = sem alterações; DP = doença progressiva¹².

Tipo de cancro	Nº de casos	RC		RP		SA		DP		RC + RP	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
C.E.	203	65	32,0	104	51,2	23	11,3	11	5,4	169	83,3
A.C.	138	32	23,2	56	40,6	23	16,7	27	19,6	88	63,8
C.I.	45	2	4,4	19	42,2	13	28,9	11	24,4	21	46,7
Total	386	99	25,6	179	46,4	59	15,3	49	12,7	278	72

C.E., Carcinoma de células escamosas; A.C., Adenocarcinoma; C.I., Carcinoma indiferenciado

As taxas de sobrevivência a longo prazo foram de aproximadamente 86, 60 e 30 % para 1, 3 e 5 anos respetivamente. (**Figura 1.1**). Estes autores compararam estes resultados com os obtidos anteriormente para o cancro do pulmão utilizando metodologias de tratamento diferentes. A cirurgia tem uma taxa de sobrevivência superior ao EChT (89,4, 61,1 e 42,5 % para o 1º, 3º e 5º ano respetivamente). As taxas de sobrevivência da quimioterapia de 71,5 % para o 1º ano, 23,4 % para o 3º ano e de apenas 16,5 % para o 5º ano são inferiores às obtidas com o EChT.

Xin *et al.*, reportaram em 1998, no segundo simpósio internacional sobre o tratamento eletroquímico, realizado em Pequim, resultados promissores do EChT em vários tipos de tumores tratados no período de 1987 a 1997¹⁸. De acordo com os dados recolhidos a partir de 156 hospitais, 8240 pacientes foram tratados com EChT, onde 7642 deles sofriam de tumores malignos (em que 3802 tinham tumores malignos superficiais e 3840 tinham tumores malignos viscerais) e os restantes 598 padeciam de tumores benignos.

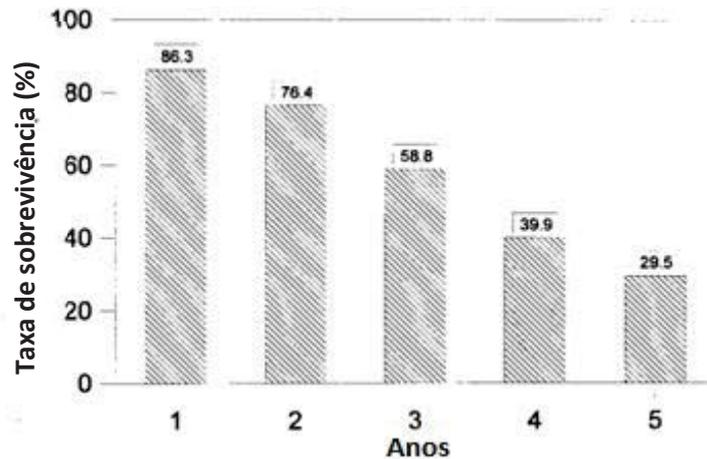


Figura 1.1 - Pacientes de cancro do pulmão: 1 – 5 anos de taxas de sobrevivência no geral após o tratamento eletroquímico¹².

Os parâmetros do tratamento usados foram diferentes de acordo com o tipo de tumor. Por exemplo, aos tumores sólidos malignos foi aplicada uma dosagem de 80-100 C/cm do diâmetro do tumor, enquanto os tumores benignos eram tratados com uma dosagem de 30-40 C/cm do diâmetro do tumor.

Relativamente a neoplasias superficiais, a eficácia total, resposta completa (RC) + resposta parcial (RP), a curto prazo (6 meses) variou entre os 47 % e 100 % sendo que o cancro da pele, o cancro oral (língua e lábios) e o cancro da parótida demonstraram uma resposta eficaz ao tratamento (**Tabela 1.3**). Por sua vez, o melanoma maligno foi o tipo de cancro para qual o tratamento se mostrou menos eficiente. Num panorama geral verificou-se uma eficácia de 80 %. A taxa de eficácia a longo prazo, nomeadamente no 5º ano (**Tabela 1.4**), variou entre 0 % e 80 %, sendo que os tumores que apresentaram melhor taxa de resposta ao tratamento foram o cancro da pele, o cancro oral e o cancro da parótida, o que está em concordância com os resultados obtidos para curto prazo. Por sua vez, o melanoma maligno e o rabdomiossarcoma, apresentaram resultados muito desanimadores, com uma taxa de sobrevivência de 0 %, no 5º ano. Já para os tumores viscerais obteve-se uma eficácia total a curto prazo de 72 %, sendo que o carcinoma da laringe foi o tumor que melhor respondeu ao tratamento eletroquímico (**Tabela 1.5**). Por sua vez, a taxa de sobrevivência a longo prazo, nomeadamente no 5º ano, variou entre os 13 % e 67 %. A taxa de sobrevivência era pior para pacientes com cancro no esófago e com cancro no fígado, mas os resultados já eram mais animadores para pacientes com cancro da laringe e da próstata (**Tabela 1.6**).

Tabela 1.3- Eficácia a curto prazo (6 meses) do EChT em tumores malignos superficiais. RC = Resposta completa; RP = Resposta parcial; SA = sem alterações; DP = doença progressiva¹⁸.

Tipo de cancro	Nº de casos	RC		RP		SA		DP		RC + RP	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Cancro da pele	958	611	64	347	36	0	0	0	0	958	100
Melanoma maligno	227	79	35	27	12	27	12	94	41	106	47
Tumores do queixo e faciais	361	135	37	145	40	57	16	24	7	280	78
Cancro oral (língua ou lábios)	138	46	33	75	54	11	8	6	4	121	88
Rabdomiossarcoma	133	27	20	49	37	38	29	19	14	76	57
Metástases do peito abdominal	172	44	26	81	47	29	17	8	10	125	73
Cancro da vulva (pénis ou vagina)	237	91	38	111	47	21	9	14	6	202	85
Cancro da mama	644	180	28	296	46	64	10	104	16	476	74
Carcinoma da tiróide	250	89	36	110	44	36	14	15	6	199	80
Carcinoma da parótida	84	28	33	46	55	6	7	4	5	74	88
Outros tumores superficiais	598	154	26	280	47	99	17	65	11	434	73
Total	3802	1484	39	1567	41	388	10	363	10	3051	80

Tabela 1.4 - Eficácia a longo prazo (1 – 5 anos) do EChT em tumores malignos superficiais¹⁸.

Tipo de cancro	Nº de casos	1 Ano		2 Anos		3 Anos		4 Anos		5 Anos	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Cancro da pele	958	958	100	958	100	890	93	890	93	767	80
Melanoma maligno	227	194	85	157	69	91	40	19	8	0	0
Tumores do queixo e faciais	361	336	93	295	82	258	71	184	51	139	39
Cancro oral (língua ou lábios)	138	129	93	124	90	111	80	99	72	85	62
Rabdomiossarcoma	133	121	91	88	66	51	38	9	7	0	0
Metástases do peito abdominal	172	140	81	130	76	115	67	102	59	74	43
Cancro da vulva (pénis ou vagina)	237	223	94	209	88	188	79	188	79	104	44
Cancro da mama	644	618	96	568	88	404	63	404	63	323	50
Carcinoma da tiróide	250	242	97	232	93	132	77	191	77	133	53
Carcinoma da parótida	84	78	93	76	90	67	80	59	70	45	54
Outros tumores superficiais	598	501	84	428	72	338	57	327	55	245	41
Total	3802	3540	93	3265	86	2705	71	2472	65	1915	50

Tabela 1.5 - Eficácia a curto prazo (6 meses) do EChT em tumores malignos viscerais. RC = Resposta completa; RP = Resposta parcial; SA = sem alterações; DP = doença progressiva¹⁸.

Tipo de cancro	Nº de casos	RC		RP		SA		DP		RC + RP	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Cancro do esófago	1595	348	22	766	48	319	20	162	10	1114	70
Cancro do pulmão	1113	412	37	445	40	155	14	101	9	857	77
Cancro do fígado	961	240	25	427	44	210	22	84	9	667	69
Cancro da laringe	21	9	43	9	43	2	10	1	5	18	86
Cancro da próstata	20	8	40	7	35	3	15	2	10	15	75
Outros tumores viscerais	130	39	30	51	39	20	15	20	15	90	69
Total	3840	1056	28	1705	44	709	19	370	10	2761	72

Tabela 1.6 - Eficácia a longo prazo (1 – 5 anos) do EChT em tumores malignos viscerais¹⁸.

Tipo de cancro	Nº de casos	1 Ano		2 Anos		3 Anos		4 Anos		5 Anos	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Cancro do esófago	1595	1285	81	969	61	483	30	233	15	205	13
Cancro do pulmão	1113	1063	96	933	84	746	67	600	54	432	39
Cancro do fígado	961	771	80	577	60	209	22	184	19	145	15
Cancro da laringe	21	21	100	21	100	19	90	17	81	14	67
Cancro da próstata	20	20	100	19	95	18	90	16	80	10	50
Outros tumores viscerais	130	124	95	99	76	99	76	71	55	31	24
Total	3840	3284	86	2618	68	1574	41	1121	29	837	22

Para os pacientes que sofrem de tumores benignos, a eficácia total variou entre os 76 a 99 %, sendo que o cancro da tiróide e os hemangiomas foram os que melhor responderam ao tratamento (**Tabela 1.7**). Por outro lado, os resultados a longo prazo (**Tabela 1.8**) foram coincidentes com os de curto prazo, sendo que a taxa de sobrevivência ao 5º ano era elevada (71 – 100 %).

Os resultados mostraram que a terapia eletroquímica foi mais favorável para os tumores benignos e superficiais em relação às neoplasias viscerais.

Tabela 1.7 - Eficácia a curto prazo (6 meses) do EChT em tumores benignos. RC = Resposta completa; RP = Resposta parcial; SA = sem alterações; DP = doença progressiva¹⁸.

Tipo de cancro	Nº de casos	RC		RP		SA		DP		RC+ RP	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Hemangioma	296	202	68	90	30	4	1	0	0	292	99
Tumor da tiróide	192	127	66	60	31	5	3	0	0	187	97
Hipertrofia da próstata	110	51	46	33	30	23	21	3	3	84	76
Total	598	380	64	183	31	32	5	3	1	563	94

Tabela 1.8 - Eficácia a longo prazo (1 – 5 anos) do EChT em tumores benignos¹⁸.

Tipo de cancro	Nº de casos	1 Ano		2 Anos		3 Anos		4 Anos		5 Anos	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Hemangioma	296	296	100	296	100	296	100	296	100	296	100
Tumor da tiróide	192	192	100	192	100	192	100	190	99	190	99
Hipertrofia da próstata	110	110	100	108	98	91	83	88	80	78	71
Total	598	598	100	596	100	579	97	574	96	564	94

Entre 1996 e 2002 foram tratados 36 pacientes, 15 homens e 21 mulheres, com idades compreendidas entre os 11 e os 40 anos, com hemangioma lingual (LHG)¹⁹. Os autores usaram uma corrente de 100 – 120 mA e uma carga total de 100 C/cm de diâmetro do tumor. O ânodo ficava no centro do tumor enquanto o cátodo ficava na periferia do mesmo.

A eficácia do tratamento foi classificada segundo a minimização do tamanho do LHG. Quando o hemangioma reduzia as suas dimensões pelo menos em 76 %, em relação ao tamanho do LHG antes do EChT, foi classificado como nível I. Nível II foi atribuído para reduções entre os 50 – 75 %, nível III para reduções entre os 26 – 50 % e nível V para reduções inferiores a 25 %.

Verificou-se que a eficácia dos tratamentos de 29 dos 36 pacientes foram classificados com nível I e o dos 7 restantes com nível II, sendo que em todos os pacientes foi possível repor a função e a forma da língua (**Figura 1.2**). No entanto, houve recorrência do tumor em 4 pacientes entre o 1º e o 2º ano após o tratamento, tendo sido necessário repetir o tratamento eletroquímico.



Figura 1.2 - 1A: Criança de 16 anos com múltiplos hemangiomas na língua, lábios e maxilo-facial. 1B: Um mês após o EChT. 2A: Homem de 32 anos, com hemangioma no corpo da língua. 2B: Dez meses após o EChT¹⁹.

Jarquer *et al.*²⁰ realizaram um estudo com 4 pacientes portadores de tumores malignos, nomeadamente: carcinoma ductal invasivo da mama direita; carcinoma ductal invasivo da mama esquerda; lipossarcoma de parede torácica posterior na zona escapular direita das costas e metástase de um carcinoma nasofaríngeo indiferenciado. A gama de intensidade de corrente usada nos tratamentos variou entre 40 e 100 mA, dependendo do tamanho e tipo de tumor. A quantidade de carga elétrica total administrada situou-se entre 80 e 100 C/cm de diâmetro do tumor. Verificou-se uma redução do tumor em todos os casos, conforme apresentado na **Tabela 1.9**. O paciente 1 e o paciente 2 permaneceram vivos após 21 meses da aplicação do EChT, enquanto o paciente 3 e 4 faleceram 6 e 7 meses após a aplicação do EChT, respetivamente.

Tabela 1.9 - Tipos de tumores dos pacientes, dose aplicada a cada tumor e percentagem da redução do tumor obtida após o EChT²⁰.

	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4
Tipo de tumor	Carcinoma ductal invasivo da mama direita	Carcinoma ductal invasivo da mama esquerda	Lipossarcoma	Carcinoma nasofaríngeo
Dose	500 C	1000 C	2000 C	500 C
Redução do tumor no 7º mês de tratamento (%)	80	90	45	90

Na Alemanha, foi realizado um estudo utilizando o EChT em 44 homens com cancro na próstata, com idades compreendidas entre os 49 e 78 anos. Os elétrodos eram colocados conforme a localização do tumor, se o tumor estivesse localizado na periferia da glândula da próstata, o ânodo era colocado no centro do tumor e o cátodo na periferia, mas se o tumor estivesse localizado no centro da próstata os elétrodos eram colocados na periferia. Os pacientes receberam entre 80 a 150 C/cm do diâmetro do tumor e os valores de corrente variavam entre 10 e 30 mA.

Dos 44 pacientes que se submeteram a um exame, três meses após a terapia, oito (18 %) tiveram remissão e redução parcial do volume do tumor de mais de 30 %, trinta e quatro pacientes (77 %) foram classificados como tendo a doença estável, dois pacientes (5 %) mostraram progressão da doença com um aumento no tamanho do tumor de pelo menos 30 %. Um ano após a terapia, um homem (2 %) mostrou remissão completa do tumor, 18 homens (41 %) apresentaram remissão parcial, 23 pacientes (52 %) mostraram doença estável e dois pacientes mostraram doença progressiva (5 %)²¹.

1.5 Estudos em sistemas biológicos

1.5.1 Animais

De modo a quantificar a eficácia do EChT foram realizados diferentes estudos *in vivo*. Estes estudos também permitiram compreender melhor como a eficácia dos tratamentos está dependente de parâmetros tais como a dose, em termos da carga elétrica, ou o espaçamento entre os elétrodos.

O efeito anti tumoral do EChT foi avaliado em ratinhos com tumores mamários ou com fibrossarcoma²². Foi realizado um estudo com 20 ratinhos C3H com crescimento do cancro mamário, e com 20 ratinhos BALB/c com crescimento do tumor do fibrossarcoma. Ambos os grupos foram divididos aleatoriamente em dois subgrupos: o subgrupo de controlo (sem tratamento) e o subgrupo experimental tratado com EChT. O tratamento foi aplicado quando os tumores atingiam 9 – 10 mm de diâmetro e os elétrodos utilizados eram de platina. Tanto o ânodo como o cátodo eram inseridos no tumor a uma distância de 4 mm entre si (**Figura 1.3**).

A diferença de potencial aplicada foi de 6 – 7 V gerando-se uma intensidade de corrente entre 5 – 21 mA. Foi usada uma carga de 80 C para cada tumor durante o tempo de tratamento de 1,5 a 2,5 horas.



Figura 1.3 - Posição dos elétrodos de platina no tumor ²².

Observou-se que os tumores mamários dos ratos tratados foram significativamente inibidos em comparação com os ratos não tratados, observando-se por isso, um aumento do tempo de sobrevivência maior para os ratos tratados com EChT (**Figura 1.4 A**). Em nenhum dos casos foi observada regressão completa do tumor. Efeitos semelhantes foram obtidos em ratinhos induzidos com fibrossarcoma (**Figura 1.4 B**). Pode verificar-se que o tratamento foi mais eficaz para o fibrossarcoma do que para o tumor mamário, o que indica que a eficácia terapêutica depende do tipo de tumor.

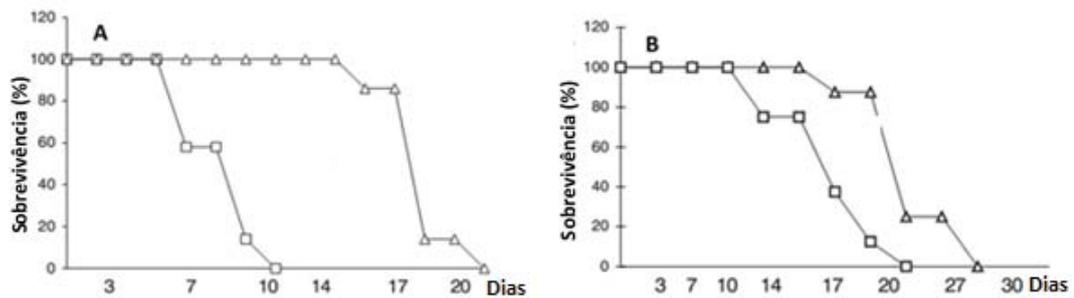


Figura 1.4 - Taxa de sobrevivência antes (-□-) e depois (-Δ-) do tratamento do EChT em ratinhos com o tumor induzido do cancro da mama (A) e em ratinhos com fibrossarcoma (B)²².

Estudos macroscópicos e microscópicos dos tumores dos ratinhos tratados com EChT mostraram áreas distintas de necrose de coagulação (a estrutura morfológica dos núcleos das células ainda está intacta e as membranas celulares são claramente visíveis) na parte central dos tumores, tanto no 1º como no 6º dia após o tratamento.

Luis Cabrales *et al.*²³ também relatam um aumento da percentagem de necrose no tumor de Ehrlich (carcinoma mamário em ratos) após o EChT, o que explica a diminuição do volume dos tumores observada relativamente ao grupo controlo (**Tabela 1.10**). A dose de tratamento foi de 4 mA durante 21 minutos, usando 4 eléctrodos no tratamento, um ânodo no centro do tumor e três cátodos na periferia do tumor.

Tabela 1.10 - Volume dos tumores antes e após o tratamento. GCD = Grupo controlo doente (sem tratamento); GT= grupo tratado²³.

Grupos experimentais	Volume dos tumores (mm ³)			
	Dia Zero	24 h após o tratamento	48 h após o tratamento	72 h após o tratamento
GCD	850,4 ± 3,7	910,0 ± 8,2	1038 ± 13,5	1317 ± 17,9
GT	849,8 ± 5,5	383,2 ± 4,5	333,6 ± 5,2	174,2 ± 3,1

Ciria *et al.*²⁴ utilizando ratinhos com tumores de Ehrlich e fibrossarcomas transplantados, demonstraram que a eficácia anti tumoral do EChT aumenta quanto maior a dose de carga elétrica aplicada para ambos os tumores (**Figura 1.5**). A configuração dos elétrodos de platina consistia em dois ânodos e dois cátodos inseridos perpendicularmente ao tumor. Os ratinhos foram divididos em três grupos de dez, de modo a testar três doses diferentes para cada tipo de tumor. Para o tumor Ehrlich os ratinhos foram divididos num grupo controlo (CG1), sem tratamento, num grupo tratado com uma carga elétrica de 36 C/cm³ (TG1-1), num grupo tratado com uma carga elétrica de 63 C/cm³ (TG1-2) e num grupo tratado com uma carga elétrica de 92 C/cm³ (TG1-3). Por sua vez, os ratinhos com o tumor fibrossarcoma formaram um grupo controlo (CG2), sem tratamento, um grupo tratado com uma carga elétrica de 36 C/cm³ (TG2-1), um grupo tratado com uma carga elétrica de 63 C/cm³ (TG2-2); e por um grupo tratado com uma carga elétrica de 80 C/cm³ (TG2-3).

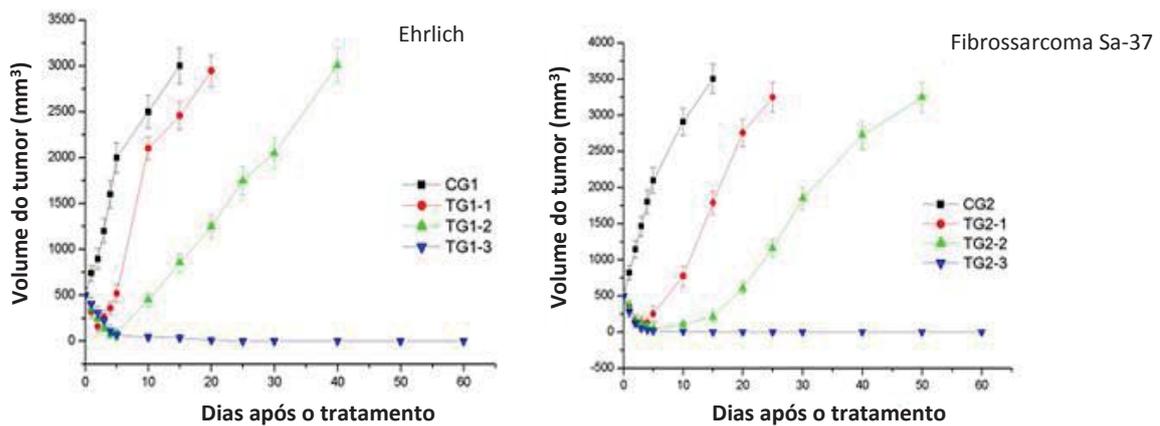


Figura 1.5 - Efeito do EChT na curva de crescimento dos tumores Ehrlich e Fibrossarcoma²⁴.

Os resultados do estudo apresentados na **Figura 1.5** demonstraram que a eficácia depende não só da quantidade de carga usada no tratamento como também do tipo de tumor, uma vez que foi possível observar uma maior sensibilidade ao EChT para o fibrossarcoma do que para o tumor Ehrlich, já que para a mesma quantidade de carga (por exemplo, TG1-2 e TG2-2) observava-se uma maior redução do tumor para o fibrossarcoma do que para o de Ehrlich. Também foi observada uma extensa área de necrose nos tumores após o EChT e o padrão morfológico da massa celular mostrou, mais uma vez, necrose coagulativa.

Ren *et al.*²⁵ também demonstraram para tumores mamários MTF-7 em ratos que a resposta do EChT era dependente da dose, uma vez que quanto maior era a dose, maior o tempo de sobrevivência (**Tabela 1.11**). Os autores verificaram também que a terapia induz a necrose, e que a percentagem de necrose é aumentada com o aumento da dose. Além disso, os tipos de

necrose encontrada junto aos elétrodos eram diferentes. Junto do ânodo observava-se necrose coagulativa e junto ao cátodo necrose coliquativa (as membranas celulares não são detetadas e os núcleos das células perdem a sua função bioquímica). Estas observações vão ao encontro das reportadas por Henrik Euler e colaboradores²⁶. Estes últimos mostraram, no entanto, que também ocorre a apoptose nos tecidos em torno do ânodo.

Tabela 1.11 - Resultados de sobrevivência em função da dose do EChT²⁵.

Dose (C)	Nº de ratos	Tempo de sobrevivência (dias)
0	10	8,2 ± 0,86
40	30	19,7 ± 1,99
60	30	46,3 ± 8,42
80	30	67,4 ± 9,56
100	30	70,4 ± 9,55

Ren e colaboradores²⁵ mostraram ainda, que o espaçamento de eletrodo (3, 5 e 10 mm) não afetou significativamente as respostas tumorais relativamente ao EChT dentro da mesma dose. No entanto, estudos realizados por Wemyss-Holden *et al.* mostraram que o volume de necrose foi menor quando a distância entre os elétrodos foi reduzida²⁷.

Chou *et al.*¹⁷ estudaram a posição e o número de elétrodos, relativamente ao tumor, de modo a averiguar qual proporciona maior eficácia em termos de sobrevivência, usando ratos C3H/HeJ, implantados com fibrossarcomas induzidos por radiação, subcutaneamente em 157 fêmeas. Assim, 79 ratos foram tratados com dois elétrodos de platina perpendiculares ao tumor, em posição vertical; 42 ratos foram tratados com cinco elétrodos perpendiculares ao tumor, em que no centro do tumor ficava o ânodo ou o cátodo, e os outros elétrodos em torno do tumor tinham polaridade oposta; 6 ratos foram tratados com dois elétrodos paralelos ao eixo do corpo – posição horizontal – com o cátodo inserido na base do tumor e o ânodo no centro do tumor; 27 ratos foram tratados com quatro elétrodos, que consistiam em dois cátodos inseridos na base do tumor e dois ânodos inseridos no centro do tumor (todos paralelos ao tumor); e por fim, 3 ratos serviram de controlo, em que não recebiam nenhum tratamento eletroquímico.

Três meses após o EChT, o maior tempo de sobrevivência foi obtido para a configuração de quatro elétrodos, posicionados horizontalmente ao tumor, obtendo-se uma taxa de sobrevivência de 59 %, seguida da configuração de dois elétrodos posicionados também

horizontalmente ao tumor (**Tabela 1.12**). Por sua vez, a configuração que obteve uma menor taxa de sobrevivência foi a de cinco elétrodos inseridos verticalmente no tumor.

Tabela 1.12 - Taxas de sobrevivência obtida para ratos C3H/HeJ para diferentes configurações de elétrodos¹⁷.

	Dimensão da amostra	Volume do tumor (mm ³)	Carga (C)	Sobrevivência após 3 meses (%)
Controlo	3	329,27	0,00	0,0
2 elétrodos verticais	79	299,15	8,21	29,1
5 elétrodos verticais	42	218,00	12,57	26,2
2 elétrodos horizontais	6	390,23	11,07	33,3
4 elétrodos horizontais	27	298,36	6,90	59,3

Estes resultados obtidos, indicando que a posição horizontal será mais eficiente que a posição vertical foram corroborados por Mikhailovskaya *et al.*²⁸, que obtiveram uma maior percentagem de regressão completa do tumor sarcoma M-1 em ratos, quando os elétrodos eram inseridos horizontalmente (RC = 92 %) do que quando eram inseridos verticalmente (RC = 58 %).

Os resultados referidos usando modelos animais apontam não só para a eficiência do EChT, em conformidade com os resultados obtidos com pacientes humanos, indicando que este é um método com efeito local, clinicamente eficaz e seguro. Para além deste resultado, os estudos demonstram que a forma como o tratamento é realizado condiciona os resultados obtidos, sendo fatores determinantes a dose e a posição dos elétrodos.

1.5.2 Tecidos

Ralf Czymek *et al.*²⁹ testaram o efeito do EChT usando como modelo uma perfusão de fígado isolado de porco. Neste estudo utilizaram cargas de 50, 100, 200, 400 e 600 C, a partir da aplicação de uma intensidade de corrente de 50 mA e um potencial de 25 V. A relação dose – resposta foi avaliada usando diferentes números de elétrodos de platina, nomeadamente dois ou quatro elétrodos, bem como a variação do espaçamento entre os elétrodos (1, 2 e 4 cm).

Quando foram usados apenas dois elétrodos, os autores verificaram que um maior espaçamento entre os elétrodos estava associado a um aumento significativo no volume de necrose induzida, e que a área de ablação aumentou com a carga aplicada (**Figura 1.6**).

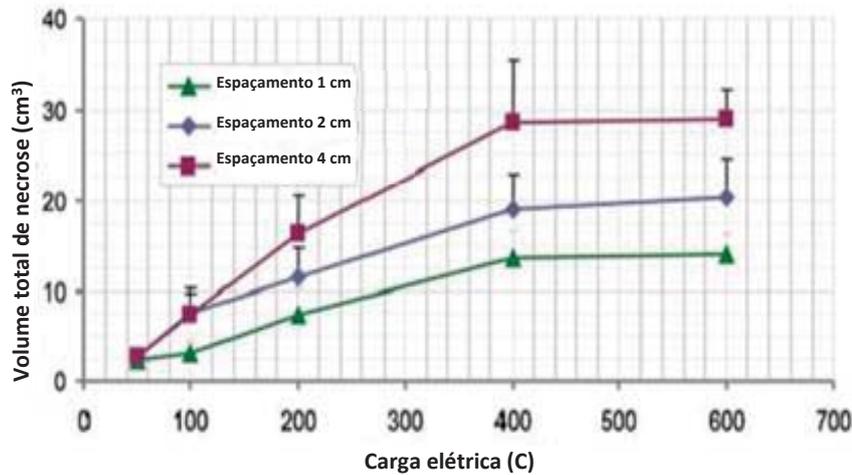


Figura 1.6 - Volume total de necrose em função da carga elétrica com diferentes espaçamentos entre os dois elétrodos²⁹.

Estes autores verificaram também diferentes tipos de necrose em torno dos dois tipos de elétrodos, reportando que na região do cátodo ocorria necrose coliquativa, enquanto que junto ao ânodo o tipo de necrose era coagulativa. Por outro lado, os resultados obtidos com o tratamento realizado com dois elétrodos mostraram que a área de ablação aumentou com a carga elétrica usada.

Quando o tratamento eletroquímico era realizado com quatro elétrodos (dois ânodos e dois cátodos), o espaçamento dos elétrodos pareceu não influenciar significativamente as áreas abrangidas pela necrose. Também se verificou que a necrose coliquativa ocorreu junto aos cátodos enquanto que a necrose coagulativa ocorreu junto aos ânodos. Os autores deste estudo, também referem que a área de ablação criada quando se usaram quatro elétrodos era significativamente maior do que a produzida por dois elétrodos.

1.5.3 Células

Os estudos experimentais *in vitro* são muito importantes para avaliar o efeito direto do EChT em linhas celulares de cultura. Nestes estudos, os elétrodos são imersos no meio de cultura.

A regressão do tumor da linha de células leucémicas de humano (HL-60, ML-1, U-937, MOLT-4, EOL-1) foi detetada por Kurokawa *et al.* em 1997³⁰, usando corrente contínua durante períodos de tempo entre 0 – 90 min e diferentes intensidades de corrente (0,03, 0,2, 0,5, 2, 4 e 5 mA). O efeito do tratamento usando uma intensidade de corrente de 5 mA durante 7 minutos, também foi avaliado usando linfócitos e células polimorfonucleares (PMN) – células de defesa do organismo. Os autores referem apenas os resultados dos diferentes parâmetros para as células HL-60, mostrando que o tempo de exposição necessário para induzir a fragmentação do DNA (indicador de apoptose) diminui de 90 minutos para 4 minutos quando a intensidade de corrente usada aumenta de 0,03 mA para 5 mA. Utilizando uma intensidade de corrente de 5 mA, verificou-se a fragmentação do DNA das células ML-1, U-937 e MOLT-4, que era mais acentuada quanto maior o tempo de exposição ao tratamento. Quando as células foram tratadas usando uma intensidade de corrente de 5 mA, durante 7 minutos, verificou-se a fragmentação do DNA das células EOL-1, mas em menor extensão do que o das células HL-60 nas mesmas condições. Em contraste, não foi induzida qualquer fragmentação de DNA nos linfócitos e nas células polimorfonucleares.

A percentagem de células mortas também foi avaliada para as células HL-60, EOL-1, linfócitos e células polimorfonucleares, para diferentes tempos de tratamento (0, 3, 5 e 7 minutos). Verificou-se que quanto maior o tempo de tratamento maior a percentagem de células mortas, e que o número relativo de células mortas atingiu um nível máximo após 5 – 6 h do tratamento. Além disso, o EChT mostrou ser mais citotóxico para as células HL-60 e EOL-1 quando comparado com as células de defesa (**Figura 1.7**).

Yen *et al.* investigaram os fatores que influenciam a eficácia do EChT em células tumorais orofaríngeas de mamífero KB¹⁶. Foram utilizados elétrodos de platina, em forma de L, fixados sobre a tampa da placa de cultura de seis poços (**Figura 1.8**). Foram aplicadas diferentes cargas elétricas, variando a intensidade de corrente e a duração do tratamento.

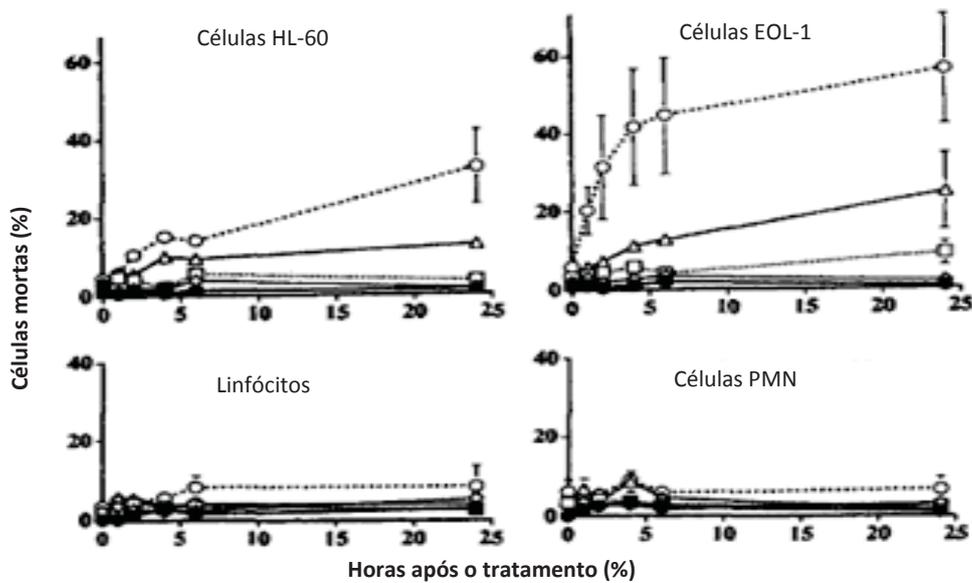


Figura 1.7 - Efeito do EChT na produção de células mortas, horas após o tratamento. HL-60, EOL-1, linfócitos e células PMN que foram tratadas com DC (5 mA) para 0 (●), 1 (○), 3 (□) ou 7 (Δ) minutos³⁰.

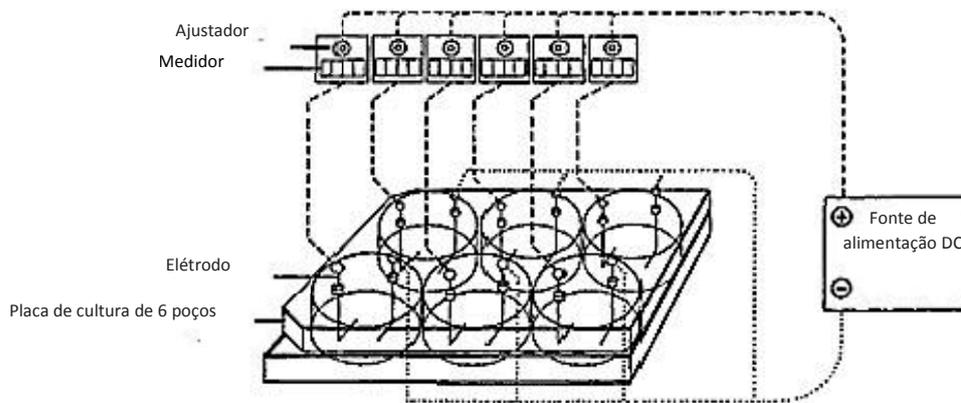


Figura 1.8 - Circuito de alimentação da EChT no sistema de exposição in vitro. A fonte de alimentação DC fornece uma corrente constante. O ajustador foi conectado ao ânodo na DC do fornecimento de energia, que foi ligado a um dos eléctrodos. O outro eléctrodo foi ligado ao cátodo da fonte de alimentação DC¹⁶.

De modo a estudar o efeito do EChT na curva de crescimento das células tumorais de humanos KB, os autores aplicaram diferentes doses, nomeadamente 0,075, 0,15, e 0,3 C/mL (resultantes da aplicação de 3 V e 400 μ A, aplicados a 5 mL de suspensão de células durante 16, 31 e 63 minutos, respetivamente). Foi observado um decréscimo na taxa de crescimento como resultado do tratamento, sendo que este decréscimo foi muito mais acentuado relativamente ao controlo para a dose de 0,3 C/mL. Nestas condições, o tempo de duplicação na fase exponencial aumentou de $39,26 \pm 3,66$ horas para $90,74 \pm 5,87$ horas. A citotoxicidade induzida

pelo EChT nas células tumorais foi avaliado para as doses de 0,15, 0,3, 0,6 1,2 e 2,4 C/mL através da percentagem de células sobreviventes após 24 horas o EChT, tendo-se verificado que o tratamento nas células KB mostrou um efeito citotóxico claramente dependente da dose (**Figura 1.9**).

De acordo com os resultados reportados na **Tabela 1.13** verifica-se uma diminuição da viabilidade celular em comparação com o controlo, quanto maior a dose aplicada, demonstrando mais uma vez que o efeito citotóxico é dependente da dose.

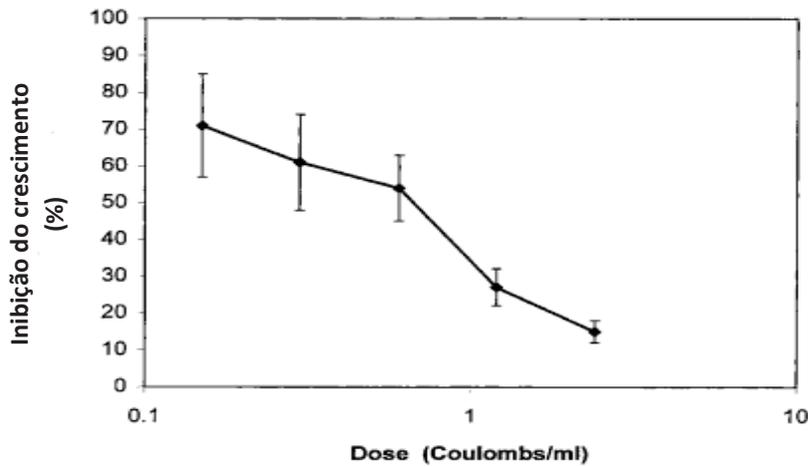


Figura 1.9 – Efeito do EChT na citotoxicidade dependente da dose em células tumorais de humanos KB. As doses de 0,15, 0,3, 0,6, 1,2 e 2,4 C/mL foram resultantes de 4,5 V, 600 μ A em 5 mL para 20,8, 41,7, 83,3, 166,7 e 333,3 minutos, respetivamente¹⁶.

Tabela 1.13 - Efeito da EChT no ensaio clonogénico de células humanas KB¹⁶.

Carga elétrica (C/mL)	Nº de colónias	Formação de colónias (%)	% de inibição
0	184 ± 23	-	-
0,00625	123 ± 16	66,8	33,2
0,0125	105 ± 13	57,1	42,9
0,025	90 ± 11	48,9	51,1
0,05	68 ± 9	36,9	63,1
0,1	21 ± 6	11,4	88,6
0,2	6 ± 3	3,3	96,7

Uma vez que a carga elétrica é determinada por dois fatores, nomeadamente, o tempo e a intensidade de corrente ($C = I \times t$), os investigadores estudaram o efeito de cada uma destas duas variáveis, usando diferentes intensidades de corrente e tempos, mantendo fixa a dose em 0,6 C/mL. Verificaram que intensidades de corrente mais baixas (associadas a tempos de

tratamento mais longos) provocavam uma diminuição mais acentuada da viabilidade celular (Tabela 1.14) do que intensidades de corrente mais elevadas (associadas a tempos de tratamento mais curtos). Assim, a carga elétrica a ser usada nos tratamentos deve ter sempre em conta a corrente a ser aplicada e o tempo de tratamento como variáveis relevantes, para além do efeito da dose em absoluto.

Tabela 1.14 – Efeito da corrente e tempo no EChT¹⁶.

Grupo	Carga elétrica (C/mL)	Corrente (µA)	Tempo (min)	Viabilidade (%)
A	0,6	500	100	54 ± 4,2
B	0,6	1000	50	67 ± 5,1
C	0,6	2000	25	73 ± 4,6

As reações celulares geradas pelo tratamento EChT foram avaliadas por Veiga *et al.*^{31,32}, onde estes autores desenvolveram uma abordagem experimental de modo a avaliar o efeito da polaridade dos elétrodos separadamente.

Neste modelo, as suspensões celulares foram distribuídas num sistema de três câmaras acrílicas (2 ml de suspensão de células por câmara), ligadas em série por pontes de papel de filtro, e equipadas com elétrodos de platina nas suas extremidades (Figura 1.10).

Nestas condições, foi aplicado um campo elétrico de cerca de 1 V/cm, e as suspensões de células foram expostas diretamente às reações anódicas (CA), às reações catódicas (CC), e a um fluxo de iões, sem contacto com os elétrodos na câmara intermédia (CI).

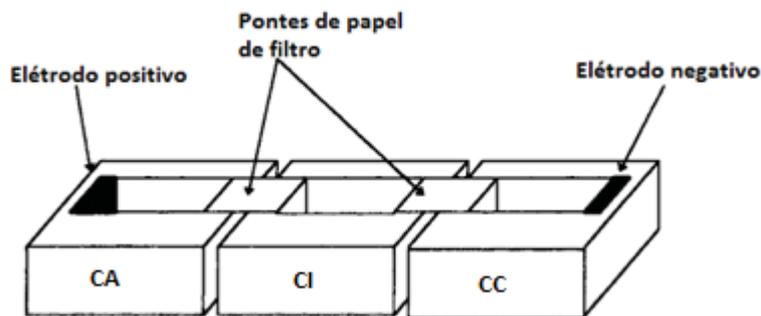


Figura 1.10 – Representação esquemática das câmaras acrílicas usadas para o tratamento eletroquímico. Neste sistema as células são expostas diretamente às reações anódicas (CA), reações catódicas (CC) ou a um fluxo de iões na camara intermédia (CI)³².

Utilizaram uma intensidade de corrente de 2 mA, durante 0, 2, 4, 6, 8 e 10 minutos em células leucémicas humanas HL-60³¹ e em células de mastocitoma de rato³² (células P815). Verificaram para ambos os tipos de células tumorais, que o tratamento na câmara catódica induzia predominantemente a lise da célula, ou seja, morte por necrose, a qual foi maior para períodos de tratamento mais longos. Por sua vez, mostraram que na câmara anódica ocorria a morte das células por apoptose. Apesar de na câmara anódica também se ter verificado a lise da célula esta ocorreu em muito menor extensão à verificada na câmara catódica. Este dado foi reforçado pelos resultados obtidos com as células leucémicas humanas HL-60, por eletroforese, onde se verificou a fragmentação do DNA em escada apenas para a estimulação anódica (**Figura 1.11**). Por sua vez, na câmara intermediária não houve evidências de alteração da viabilidade celular. Holandino *et al.*³³ obtiveram resultados muito similares para células leucémicas humanas K562. Estes resultados mostram que os efeitos da estimulação DC na viabilidade das células tumorais está relacionado com a polaridade dos elétrodos, como demonstrado por outros autores^{34,35}.

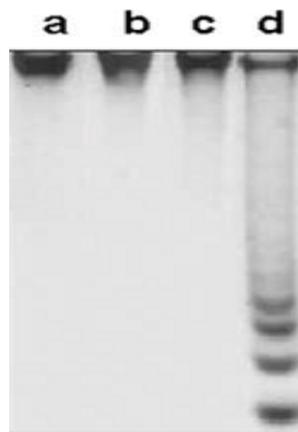


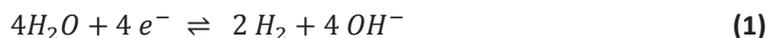
Figura 1.11 - Perfil eletroforético de DNA em gel de agarose. Controle (a); tratamento catódico (b), tratamento na IC (c) e tratamento anódico (d)³¹.

1.6 Mecanismos de ação induzidos pelo EChT

A investigação acerca dos mecanismos de destruição subjacentes ao EChT foi abordada em diferentes estudos. Vários fatores parecem estar envolvidos na destruição de tecidos, nomeadamente, alterações no pH à volta dos elétrodos^{36,37}; alterações do potencial de membrana nas células tumorais³⁸; produção de substâncias tóxicas provenientes das reações eletroquímicas^{39,40}; estimulação do sistema imunitário⁴¹; e extração de água do tecido por eletro-osmose^{37,42}. Esta diversidade de mecanismos propostos demonstra que, apesar da unanimidade de opiniões relativamente à eficiência do EChT, não há consenso no que diz

respeito ao mecanismo da ação anti tumoral. É geralmente aceite que o EChT induz a eletrólise do meio extracelular, podendo induzir a eletro-osmose e a eletroporação em tecidos tumorais, que poderão provocar alterações químicas no microambiente celular do tumor, e no seu metabolismo.

As reações eletrolíticas incluem, no cátodo, a redução da água com evolução do hidrogénio (**Equação 1**) e, no ânodo, ocorre a oxidação da água com consequente evolução do oxigénio (**Equação 2**). Dado que o ião cloreto também se encontra em concentrações elevadas no meio extracelular, a sua oxidação deverá ter lugar dando origem à formação de cloro (**Equação 3**). O cloro molecular formado nesta reação reage eficientemente com a água, ocorrendo a formação de ácido hipocloroso, de acordo com a **Equação 4**. Por sua vez o ácido hipocloroso participa num equilíbrio de dissociação originando o ião hipoclorito (**Equação 5**)⁴⁰.



Por sua vez, a eficácia relativa de formação do HOCl muda significativamente para diferentes níveis de pH (**Figura 1.12**). Quando o pH é menor que 2, o ião cloreto é a espécie principal. Para pH > 7,5 a espécie OCl⁻ torna-se a espécie predominante⁴⁰.

Tendo em conta a ocorrência destes equilíbrios associados à transferência eletrónica em meios biológicos, o efeito das espécies produzidas na destruição dos tumores foi abordado por alguns autores. Particularmente as mudanças de pH que ocorrem em torno dos elétrodos e o ácido hipocloroso foram considerados como espécies relevantes que podem estar na origem no efeito anti tumoral do EChT.

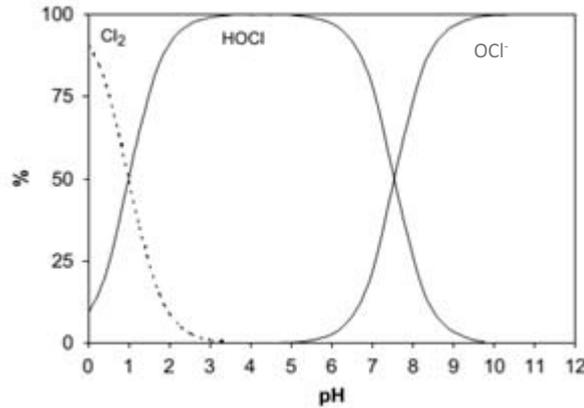


Figura 1.12 – Curva de distribuição das espécies de cloro em soluções aquosas

1.6.1 Efeitos associados ao pH

A presença de gradientes extremos de pH nos tecidos que rodeiam os elétrodos, durante e após o tratamento eletroquímico, foi confirmado em vários estudos^{39,43,44,45}. Os produtos de eletrólise tornam a região em torno do ânodo muito ácido (pH \approx 2), e a região em torno do cátodo fortemente alcalina (pH \approx 12)³⁵. Nestas condições de pH não fisiológico, as proteínas vitais dos tecidos desnaturam e a estrutura celular colapsa, levando eventualmente à morte da célula^{15,44}. Também tem sido relatado, que os baixos valores de pH podem ativar mecanismos citolíticos, através do aumento da atividade de lisossomas, resultando na destruição dos tecidos tumorais. Além disso, foi também mencionado que os valores de pH ácidos inibem a glicólise e a síntese de proteínas, das quais os tecidos malignos são dependentes⁴⁶. Devido a estes gradientes acentuados de pH, na zona do ânodo há uma desidratação do tecido enquanto na área do cátodo há um excesso de hidratação (edema).

De modo a melhor compreender o efeito das mudanças de pH ocorridas durante o EChT, Von Euler *et al.*⁴⁷, realizaram um estudo *in vitro* em células mamárias tumorais de rato, incubando as células em diferentes níveis de pH (3,5, 5, 7, 9, 10, 11), durante 10, 20 e 30 minutos, no meio de cultura. Os estudos de viabilidade mostraram uma diminuição de células viáveis, quer para os meios com valores de pH altos quer para valores de pH baixos. A diminuição da viabilidade observada foi mais acentuada quanto mais ácido ou básico se encontrava o pH, e quanto maior o tempo de incubação.

De modo a verificar qual a via de morte da célula, foi medida a atividade da caspase-3 (sendo que a sua ativação está associada à apoptose). Não foram obtidas diferenças significativas entre o grupo controlo e o grupo tratado com pH alcalinos, no entanto, as células tratadas com pH ácidos revelaram uma atividade significativa da caspase-3, demonstrando que

a morte das células ocorre por apoptose em pH ácido. A detecção da fragmentação do DNA por eletroforese corroborou estes resultados, uma vez que a exposição das células a pH alcalino não provocou a fragmentação do DNA, contrariamente às células expostas a pH ácido.

Estudos morfológicos mostram que as células tratadas com pH neutro apresentam uma morfologia normal. Por sua vez, as células tratadas com pH na zona ácida tinham núcleos picnóticos, cromatina condensada e fragmentação nuclear. No grupo alcalino, as células estavam inchadas, tinham perdido a cromatina, tendo-se observado a disrupção da membrana plasmática para o valor de pH mais alto (pH 11). Assim, os autores sugerem que a morte das células ocorre maioritariamente por apoptose a pH ácido, e por necrose a pH básico.

Veiga *et al.*³² também estudaram a influência do pH na viabilidade celular. O pH da suspensão de células em tampão fosfato salino (PBS) foi ajustado para os mesmos valores obtidos após o tratamento DC e a viabilidade celular foi determinada. Verificaram que nas suspensões a pH mais elevados se observava a lise da célula, enquanto pH mais baixos não influenciam a viabilidade da célula.

De salientar que no EChT, o tratamento anódico resulta numa diminuição acentuada da viabilidade das células, o que não ocorreu quando as células foram incubadas em soluções que apresentam valores de pH idênticos aos observados na sequência da exposição ao tratamento anódico. Esta observação exclui a possibilidade de uma morte celular induzida exclusivamente pelo abaixamento pH produzido pelas reações anódicas.

O efeito deste fator na destruição dos tumores é deste modo controverso não sendo, ainda totalmente compreendido.

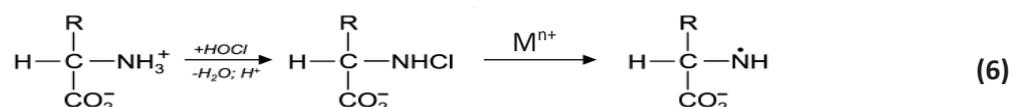
1.6.2 Efeitos associados ao ácido hipocloroso

Alguns investigadores acreditam que a destruição de tecido primário, obtido na vizinhança próxima dos elétrodos, é causada pelas espécies tóxicas produzidas nas reações eletroquímicas durante a eletrólise.

Os produtos da reação eletroquímica podem também reagir com constituintes orgânicos e inorgânicos dos tecidos, para formar novos produtos potencialmente tóxicos. O cloro, por exemplo, reage com a água para formar o ácido hipocloroso e iões de hidrogénio (**Equação 4**)¹⁸. O ácido hipocloroso é um potente agente de cloração e oxidação, com propriedades tóxicas fortes⁴⁸. Ele reage com uma grande variedade de biomoléculas, incluindo, proteínas, ácidos gordos, DNA, nucleótidos e outros compostos intracelulares⁴⁹ (**Esquema 1.2**).

A reação do HOCl com aminas presentes nas proteínas, carboidratos, nucleótidos, fosfolípidos e lipoproteínas, pode levar à formação de cloraminas⁵⁰ (**Equação 6**), que por sua vez

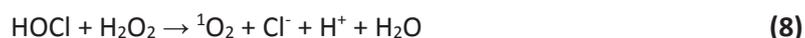
são também fortes oxidantes⁵¹, mas menos reativas que o HOCl. A reação do HOCl com o nitrogénio das amidas presentes em proteínas e em carboidratos dá origem a cloramidas. Tanto as cloraminas como as cloramidas, na presença de um metal de transição podem sofrer clivagem homolítica na ligação N-Cl, levando à formação de espécies reativas de nitrogénio (**Equação 6**), que por sua vez podem sofrer um rearranjo originando radicais centrados no carbono⁵⁰, fator que pode amplificar a formação de radicais de oxigénio, na presença do oxigénio molecular⁵¹.



Já a reação do HOCl com as ligações duplas dos lípidos insaturados, forma cloridrinas⁵² (**Equação 7**). Estes compostos mostraram ter efeitos tóxicos nas células, pois levam à disrupção da membrana⁵³ e à depleção dos níveis de ATP⁵⁴.



O HOCl também pode reagir com o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) originando o oxigénio singlete (**Equação 8**), que consegue oxidar as ligações insaturadas dos lípidos, formando hidroperóxidos⁵⁵, que por sua vez conduzem ao início da peroxidação lipídica⁵⁰. Além disso, o HOCl pode reagir com metais de transição, em particular com o Fe²⁺, formando o radical hidroxilo (**Equação 9**), que é também bastante reativo, sendo capaz de atacar a maioria dos componentes celulares, incluindo o DNA, fator que contribui para uma instabilidade a nível genético⁵⁶. Sabe-se também que o [•]OH é um iniciador eficaz da peroxidação lipídica^{50,55}. Ao mesmo tempo, o HOCl também reage com os hidroperóxidos, formando radicais peroxil, que se transformam em radicais alcoxi, que intensificam as reações da peroxidação lipídica⁵⁰.



Assim, verifica-se que o HOCl é um precursor de radicais livres, provocando um stresse oxidativo letal para a célula.

De modo a averiguar a importância dos produtos formados nas reações eletroquímicas na morte das células *Veiga et al.*³¹, realizaram o tratamento eletroquímico anódico em células leucémicas humanas. Depois da estimulação anódica, as células eram cultivadas em duas situações diferentes: no mesmo meio do tratamento ou em meio fresco, depois da remoção do meio em que ocorreu a estimulação, por centrifugação. Alternativamente, células frescas, que não receberam o tratamento foram adicionadas ao meio em que se deu a estimulação. Foi determinada a percentagem de células não viáveis, nas três situações.

Quando as células eram tratadas no mesmo meio em que foram estimuladas, observava-se um baixo nível de viabilidade. Por sua vez, quando as células estimuladas eram colocadas em meio fresco, ocorreu um aumento da viabilidade. Em adição, quando células não tratadas eram colocadas no meio previamente estimulado, verificou-se um número elevado de células não viáveis. Tendo em conta estes resultados, os autores sugerem que as moléculas tóxicas formadas nas reações anódicas, durante o EChT, nomeadamente o HOCl, são os agentes ativos que geram a morte celular.

Estudos prévios sobre o mecanismo de citotoxicidade induzida por HOCl, em células tumorais, constataram que o principal modo de morte celular é necrótico^{57,58}, com baixos níveis de apoptose na resposta ao tratamento com HOCl⁵⁷. No entanto, Englert *et al.*⁵⁹ propuseram que o mecanismo de morte das células depende do meio em que as células são cultivadas. Como a maioria dos estudos são efetuados tratando as células em tampão fosfato salino e não no meio de crescimento, o efeito do tratamento com HOCl foi avaliado em células tratadas nos dois tipos de meios. Estes autores verificaram que quando as células eram tratadas em tampão fosfato salino, a morte celular ocorria inteiramente por necrose. Contrariamente, quando as células eram tratadas no meio de crescimento, a morte celular ocorria maioritariamente por apoptose. No entanto, os níveis de HOCl necessários para provocar a morte celular são mais elevados no meio de crescimento do que em PBS. Como os meios de crescimento das células de mamífero são ricos em vitaminas, glucose, sais e níveis elevados de aminoácidos, o HOCl pode reagir com este último formando as cloraminas, que são menos reativas. Os autores deste estudo mostram então que a indução da morte celular por apoptose é mediada pela formação de cloraminas. Estes resultados são corroborados por Wagner *et al.*, que também mostraram que as cloraminas são as responsáveis pela indução da apoptose⁶⁰.

Outros estudos mostraram que o ácido hipocloroso está envolvido na ativação de uma proteína supressora de tumores, a proteína p53^{61,62}. Na presença de HOCl, os autores observaram um aumento dos níveis da p53 em fibroblastos da pele humana. Por sua vez,

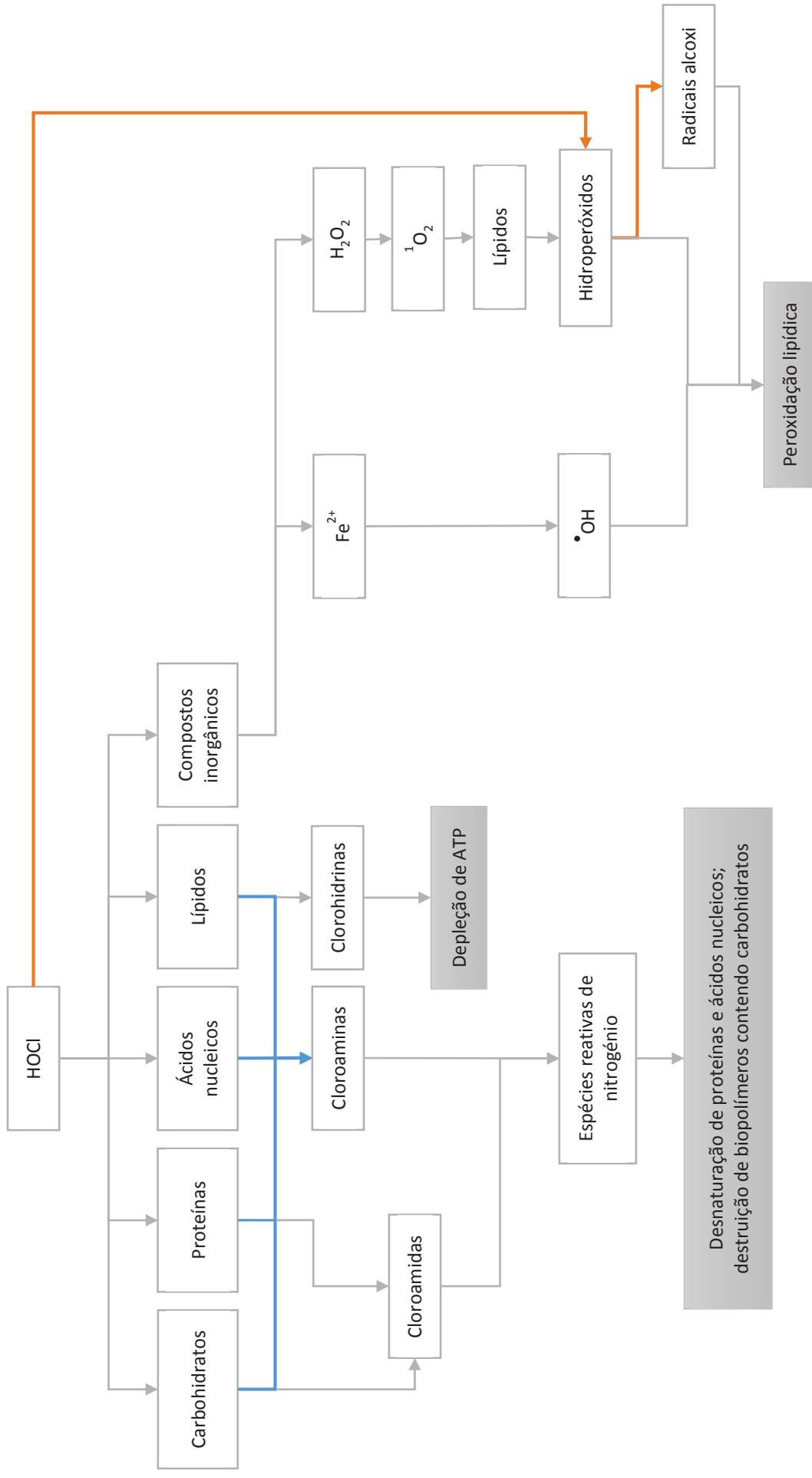
quando adicionam um *scavenger* do ácido hipocloroso verificaram uma inibição no aumento dos níveis do p53, o que indica que o HOCl pode atuar em moléculas-alvo específicas envolvidas na regulação dos níveis de p53⁶¹.

Chiang e colaboradores reportaram que o HOCl desempenha um papel no reforço da resposta do sistema imunitário em células de carcinoma do ovário^{63,64}, oferecendo um outro benefício potencial da abordagem do EChT para a terapia do cancro.

Um estudo mais recente usando macrófagos, derivados de monócitos humanos, demonstrou que o HOCl faz com que estas células entrem em necrose através da ativação de um aumento do fluxo dos canais de cálcio na via citosólica do cálcio nas membranas do plasma e do retículo endoplasmático. O cálcio ativa a calpaína, que conjuntamente com os níveis elevados de cálcio, ativa a formação de poros de transição da permeabilidade mitocondrial levando à perda do seu potencial de membrana. Sem a mitocôndria funcional, há uma perda rápida de ATP e uma destabilização lisossomal⁶⁵.

Como é possível verificar, o mecanismo pelo qual o EChT afeta o crescimento do tumor e a sobrevivência pode resultar de processos múltiplos e de grande complexidade sendo que o HOCl pode estar na sua origem. Por este motivo, é necessário desenvolver uma maior compreensão dos mecanismos fundamentais envolvidos e elaborar uma estratégia para a otimização dos parâmetros experimentais envolvidos no EChT.

Tendo em conta o estado de arte apresentado, este trabalho teve como objetivos a investigação de um método de medição do HOCl e a otimização do seu procedimento de quantificação bem como o estudo do efeito das variáveis eletroquímicas sobre a eficiência de produção desta espécie produzida electroquimicamente em condições fisiológicas. Por fim averiguou-se a atividade toxicológica do HOCl utilizando leveduras *Saccharomyces cerevisiae* como modelo celular.



Esquema 1.2 – Reação do HOCl com as diferentes moléculas biológicas. Muitas destas reações levam à formação de radicais livres, com consequentes efeitos biológicos⁵⁰.

Capítulo 2

Parte Experimental

2 Parte Experimental

Neste capítulo estão apresentados os reagentes, as soluções e os equipamentos utilizados assim como os procedimentos experimentais desenvolvidos no âmbito deste trabalho.

2.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados são de grau analítico. Cloreto de Sódio (*Fischer Scientific*); Cloreto de potássio (*Merck*); Dihidrogenofosfato de sódio (*Merck*); Dihidrogenofosfato de Potássio (*Fischer Scientific*); Hexacianoferrato (III) de potássio (José Gomes Santos); Hidróxido de Sódio (*Eka chemicals*); Ácido Clorídrico (*Panreac*); Ácido fosfórico (*ACROS Organic*); Fosfato de potássio monobásico (*Fischer Scientific*); Curcumina (*Fischer Scientific*); Etanol (*Fischer Scientific*); Glucose (*Sigma*); Agár (*BDH Chemicals*); Extrato de levedura (*BD Biosciences*); Bactopeptona (*BD Biosciences*).

2.2 Preparação das soluções

2.2.1 Soluções tampão

As soluções tampão que foram utilizadas nos ensaios eletroquímicos e no pré-tratamento do elétrodo de platina foram preparadas de acordo com os procedimentos descritos abaixo.

Solução tampão fosfato pH 3,20

Esta solução, utilizada no pré tratamento e ativação do elétrodo de platina, foi preparada por pesagem do sal de fosfato de potássio monobásico, KH_2PO_4 , ($m = 20,41 \text{ g}$), e por adição de 6 mL de uma solução de ácido fosfórico 0,10 M. O pH foi ajustado pela adição de uma solução de NaOH 1,0 M num volume total de 1 L de solução.

Solução de tampão fosfato pH 7,4 (PB)

Esta solução foi preparada por pesagem de cerca de 10,30 g de KH_2PO_4 e de 10,72 g de Na_2HPO_4 , em água ultra-pura para um balão volumétrico de 1 L. O acerto de pH foi realizado usando uma solução de NaOH 1,0 M.

Solução tampão fosfato salina pH 7,4 (PBS)

A solução PBS foi preparada por pesagem de cerca de 8,00 g de NaCl, 0,205 g de KCl, 1,15 g de Na_2HPO_4 e 0,214 g de KH_2PO_4 , com água ultra-pura num balão volumétrico de 1 L. O acerto de pH foi realizado usando uma solução de NaOH 1,0 M.

2.2.2 Solução de hexacianoferrato(III) de potássio

Esta solução foi usada para a determinação da área do eletrodo de trabalho. Esta solução ($1,000 \pm 0,001$ mM) foi preparada por pesagem de $0,0823 \pm 0,0001$ g de hexacianoferrato(III) de potássio e $1,8640 \pm 0,0001$ g de cloreto de potássio em água ultra-pura num balão volumétrico de $250 \pm 0,15$ mL.

2.2.3 Preparação de soluções de curcumina

Foram preparadas soluções hidro-alcoólicas (1:1) de curcumina (CUR) de diferentes concentrações que foram utilizadas na quantificação do HOCl produzido em eletrólises galvanostáticas. Por pesagem do sólido (cerca de 0,0029 g para 25 mL de solução) preparou-se uma solução etanólica mais concentrada ($0,30 \pm 0,01$ mM) que foi posteriormente diluída.

Foram traçadas duas retas de calibração para a CUR, uma em etanol e outra em etanol/água (1:1) numa gama de concentrações de 0,1 a 50 μM . Todas as soluções foram preparadas por diluições sucessivas a partir de uma solução de CUR 0,30 mM. As soluções assim preparadas encontram-se apresentada na **Tabela 2.1**.

Tabela 2.1 - Volumes usados na preparação por diluições sucessivas das soluções de CUR ($v = 10 \pm 0,025$ mL).

	50,0 ±	20,0 ±	10,0 ±	5,0 ±	2,00 ±	1,00 ±	0,50 ±	0,100 ±
[Curc] (µM)	1,7	0,7	0,4	0,2	0,07	0,04	0,02	0,004
Volume (mL)	1,7	4,0	5,0	5,0	4,0	5,0	5,0	2,0
Diluição a partir da solução	0,3 mM	50 µM	20 µM	10 µM	5,0 µM	2,0 µM	1,0 µM	0,5 µM

2.3 Materiais e Métodos

Os estudos realizados basearam-se em ensaios eletroquímicos que foram efetuados utilizando um potencióstato Autolab PGSTAT 30 (Ecochemie) controlado por o software “General Purpose Electrochemical System” versão 4.9.

Os ensaios galvanostáticos foram realizados usando intensidades de corrente de 0,45, 0,225 e 0,15 A, numa célula de um compartimento ($v = 7,0$ mL) e numa célula de dois compartimentos, separados por uma membrana de Nafion, com capacidade de 3,5 mL cada. A solução foi agitada mecanicamente com uma barra de agitação magnética (100 rpm).

O ânodo e o cátodo utilizados são constituídos por uma rede de platina (Pt). Antes de cada experiência o ânodo foi limpo eletroquimicamente numa solução tampão fosfato 0,10 M pH 3,2, durante 600 s, a uma corrente constante de 0,016 A.

A área do elétrodo de trabalho de Pt foi determinada utilizando uma solução 1,00 mM de $K_3Fe(CN)_6$ em 0,10 M KCl, numa experiência de cronoamperometria e obteve-se um valor de $3,61$ cm³.

O pH das soluções tampão e das soluções eletrolisadas foram medidas usando um medidor de pH da *CyberScan 510 pH*, com um elétrodo de vidro combinado da *Hanna Instruments*, que era calibrado pelo menos uma vez por semana, em solução padrão pH 4,01, seguido da solução padrão pH 6,88.

As absorvâncias das soluções foram medidas num espectrofotómetro *Genesys 20*.

A água ultrapura (18,2 MΩcm) foi obtida por purificação de água desionizada num sistema *Milli-Q Simplicity 185 (Millipore)*.

2.4 Procedimentos experimentais

2.4.1 Método de quantificação do HOCl por reação com a Curcumina

A CUR é um pigmento amarelo do açafrão. Este pigmento dissolvido em etanol apresenta um espectro de absorção UV-vis caracterizado por um pico máximo a 430 nm⁶⁶.

Nas últimas décadas foram realizados estudos que indicaram que a CUR possui propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antitumorais, e antimicrobianas importantes⁶⁷.

Yue *et al.*⁶⁸ desenvolveram um método para a detecção do ácido hipocloroso baseado na reação de descoloração da CUR (**Figura 2.1**). Os seus resultados indicaram que a CUR é uma sonda excelente para a detecção do ácido hipocloroso, permitindo a sua detecção, quer por UV-vis quer por fluorescência. A CUR reage com o HOCl, ocorrendo perda da cor característica da CUR e consequente diminuição da absorvância/fluorescência. Esta reação permite a detecção seletiva do HOCl, uma vez que as outras espécies reativas de oxigénio ($\cdot\text{OH}$, H_2O_2 , $\text{ROO}\cdot$, $^1\text{O}_2$, IO_4^- , $\text{O}_2^{\cdot-}$) e de nitrogénio (NO , $\text{ONOO}\cdot$) não induziram perda de cor na CUR. Os autores mostraram também que os valores de absorção de radiação são linearmente relacionados com a concentração de HOCl e que a estequiometria da reação entre o ácido hipocloroso e a CUR é de 1:1 e que a reação é completa.

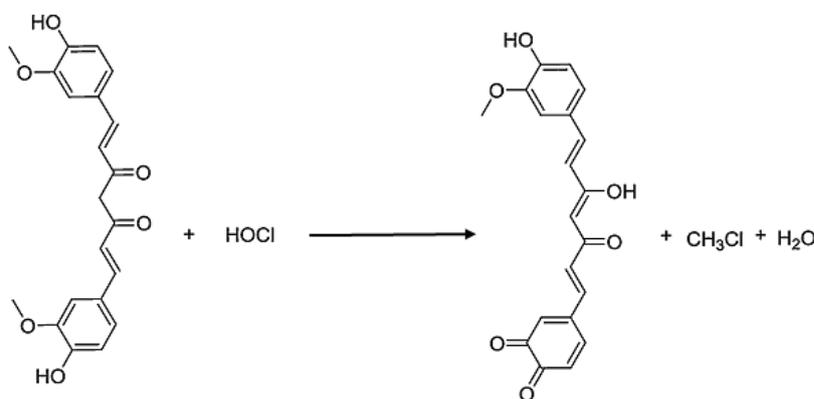


Figura 2.1 – Reação da curcumina com o HOCl⁶⁸.

No presente trabalho a quantificação do HOCl produzido por via eletroquímica foi realizada, utilizando a CUR como sonda ótica para medição indireta do ácido hipocloroso, a um comprimento de onda de 435 nm.

As condições experimentais do método foram otimizadas de modo a definir o procedimento de quantificação adequado às concentrações de HOCl produzidas e aos volumes retirados da célula de eletrólise, que deveriam ser significativamente reduzidos face ao volume

da célula. Os ensaios de otimização foram realizados utilizando o HOCl produzido numa célula de compartimento único, a uma intensidade de corrente de 0,45 A, usando como eletrólito uma solução de PBS ($[Cl^-] = 140 \text{ mM}$).

Uma das variáveis otimizada foi o volume de eletrolisado a retirar da célula de eletrólise. Para tal, fez-se uma eletrólise em PBS durante 600 segundos. Ao fim deste tempo retiraram-se os volumes indicados na **Tabela 2.2**, que foram adicionados a 3 mL de uma solução etanólica de CUR $10 \mu\text{M}$, medindo-se a absorvância das soluções em seguida.

Tabela 2.2 – Volumes de eletrolisado retirados para tempos de eletrólises previamente definidos usando diferentes concentrações de CUR

[CUR] (μM)	Tempos de eletrólise (s)		
	5, 15, 30	100, 200, 400	600
6,0 ± 0,2	60 μL	Não efetuado	Não efetuado
10,0 ± 0,4	Não efetuado	6 μL	6 μL , 60 μL , 1 mL, 2 mL, 3 mL
15,0 ± 0,5	Não efetuado	6 μL	6 μL
20,0 ± 0,7	Não efetuado	6 μL	6 μL
30,0 ± 1,0	Não efetuado	6 μL	6 μL

A concentração da CUR mais adequada para a quantificação do ácido hipocloroso também foi testada. Para isso prepararam-se quatro soluções de CUR com diferentes concentrações (**Tabela 2.2**), adicionando um volume fixo de solução de PBS eletrolisada durante 100, 200, 400 e 600 s. Ao fim de cada um dos tempos foram retirados 6 μL do eletrolisado que foram adicionados a 3 mL da solução de CUR de diferentes concentrações. Foram registados os espetros de absorção. Quando eram realizados tempos de eletrólises mais curtos, para a mais baixa concentração de cloreto em PBS ($[Cl^-] = 14 \text{ mM}$), era usada uma concentração de CUR de 6 μM e um volume de 60 μL , para a quantificação do HOCl.

De modo a minimizar os efeitos associados à evaporação do etanol e a consequente alteração da concentração das soluções de CUR, foi testada a possibilidade de dissolver a CUR em misturas água : etanol. Primeiramente preparou-se uma solução de CUR $15 \mu\text{M}$, por diluição da solução de etanólica $0,3 \text{ mM}$ de CUR usando apenas tampão fosfato e tampão fosfato salina. Prepararam-se ainda outras soluções usando diferentes razões de PBS : etanol, nomeadamente de 1:1, 1:3 e 3:1.

2.4.2 Ensaios eletroquímicos

2.4.2.1 Produção de HOCl

Efeito da intensidade de corrente

De forma a verificar o efeito da corrente na produção de HOCl, realizaram-se eletrólises em soluções de PBS, $[Cl^-] = 140 \text{ mM}$, usando três intensidades de corrente ($I = 0,45, 0,225$ ou $0,15 \text{ A}$). O HOCl produzido foi quantificado retirando $6 \mu\text{L}$ de eletrolisado para tubos contendo a solução de CUR, medindo-se a absorvância das misturas.

Efeito da concentração de cloreto

De maneira a averiguar o efeito da concentração de íão cloreto na produção de HOCl, realizaram-se eletrólises ($I = 0,45 \text{ A}$) em soluções de PBS contendo diferentes concentrações de íão cloreto ($140 \text{ mM}, 70 \text{ mM}$ e 14 mM). O HOCl produzido foi quantificado retirando $6 \mu\text{L}$ de eletrolisado para tubos contendo a solução de CUR, medindo-se a absorvância das misturas.

Efeito do pH

Dado que o pH é uma variável muito importante no que diz respeito às diferentes reações em que HOCl participa, o efeito do pH foi tido em conta nos estudos realizados. Assim, o rendimento da produção de HOCl em diferentes condições experimentais foi comparado após o acerto do pH das soluções para valores idênticos aos obtidos nessas condições, antes de proceder à sua quantificação através da reação com a CUR.

Nomeadamente no estudo do efeito da intensidade de corrente, o eletrolisado produzido a partir de soluções de PBS, contendo 140 mM de íão cloreto, usando $0,45 \text{ A}$, durante 600 s ($\text{pH } 9,73$) numa célula de um só compartimento, foi analisado após o acerto do pH para os valores de $\text{pH } 8,66$ e de $\text{pH } 8,15$ (correspondentes ao pH do eletrolisados produzido nas mesmas condições usando intensidades de corrente de $0,225 \text{ A}$ e de $0,15 \text{ A}$, respetivamente).

O ensaio correspondente ao controlo foi realizado a partir da eletrólise ($I = 0,45 \text{ A}$) de uma solução tampão fosfato ($[Cl^-] = 0$), cujo pH era de $7,4$ ao fim dos 600 s . O acerto do pH das soluções foi realizado adicionando volumes muito pequenos de soluções de NaOH e de HCl 1 M , de modo a evitar a diluição das soluções.

Efeito da configuração da célula de eletrólise

Os aspetos relacionados com a configuração da célula são de grande importância, podendo condicionar a eficiência com que os produtos da eletrólise são produzidos. A comunicação entre os produtos formados nas reações anódicas e catódicas entre si e com os eléctrodos com polarização inversa à usada na formação das espécies são fatores muito importantes. No caso da eletroterapia, a separação dos compartimentos e a ausência de comunicação entre os produtos das reações anódica e catódica pretende simular a situação em que os eléctrodos se encontram posicionados a grandes distância entre si, enquanto que a célula de um só compartimento simula as condições em que o tratamento é realizado com os eléctrodos posicionados a pequenas distâncias.

A configuração da célula de eletrólise, utilizando um ou dois compartimentos foi testada dividindo a célula utilizada ($v = 7,0$ mL) com uma membrana de Nafion. A membrana utilizada, com a referência Nafion® 117, espessura de 0,018 cm, foi tratada por imersão da membrana em solução de ácido nítrico 10 % em ebulição durante 30 minutos, seguido por enxaguamento e lavagem em água destilada e finalmente imersão em água destilada em ebulição durante 30 minutos⁶⁹.

O efeito da separação dos compartimentos foi avaliado a partir de eletrólises realizadas em PBS, $[Cl^-] = 140$ mM, usando uma intensidade de corrente $I = 0,45$ A, $t = 600$ s usando uma célula com um compartimentos ($v = 7,0$ mL). Ao fim do tempo de eletrólise, acertou-se o pH do eletrolisado obtido na eletrólise com a célula de um compartimento (pH 9,73) para o valor de pH 0,80 que é idêntico ao obtido na eletrólise de dois compartimentos usando uma solução de HCl.

2.4.3 Ensaios com células

2.4.3.1 Estirpe de levedura, meio de cultura, condições de crescimento e preparação das amostras

Em todas as experiências, a estirpe selvagem de *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A (*MAT α* , *ade2*, *his3*, *leu2*, *trp1*, *ura3*, *can1*) foi usada. As culturas de reserva foram mantidas em meio YPDA sólido (1 % p/v de extrato de levedura, 2 % p/v, peptona, 2 % de glicose p/v e 1,5 % p/v de ágar) a 4°C. As culturas foram crescidas em meio YPD líquido (1 % p/v de extrato de levedura, 2 % p/v de peptona e 2 % p/v de glicose), num agitador orbital a 30°C e 200 rotações

por minuto (rpm). O crescimento das culturas foi monitorizado por medição da densidade ótica a 640 nm (DO_{640}).

Os pré-inóculos foram preparados a partir de 1-2 colónias em meio YPD e foram incubados durante a noite a 30°C e 200 rpm. Os pré-inóculos foram diluídos com meio fresco para se obter culturas com DO_{640} de 0,1 que foram incubadas sob as mesmas condições até uma DO_{640} de 0,4-0,8 (fase exponencial), para assegurar o mínimo de duas gerações de células no crescimento da cultura. As células foram recolhidas por centrifugação a 5000 x *g*, a 4 °C (Sigma 4K10) durante 5 minutos e lavadas duas vezes com PBS, pH 7,4 e ressuspensas no mesmo tampão.

2.4.3.2 Ensaio de viabilidade

Num ensaio preliminar, 200 mL de cultura de células foi incubada até uma DO_{640} de 1,0, de forma a acompanhar a curva de crescimento. As células foram centrifugadas duas vezes a 5000 x *g*, 5 min a 4°C, lavadas duas vezes com água desionizada fria (4°C), ressuspensas em 100 mL de água desionizada e divididas em 10 tubos de polipropileno de 15 mL, centrifugadas novamente nas mesmas condições para eliminação do sobrenadante, cujo *pellet* foi congelado a -20°C.

Com estas células congeladas foram realizados ensaios preliminares do efeito do HOCl gerado electroquimicamente a 0,45 A em tampão PBS a pH 7,4, esterilizado, contendo 140 mM de ião cloreto, numa célula de compartimento único. As células foram previamente descongeladas à temperatura ambiente, às quais foi adicionado um volume rigoroso de PBS eletrolisado ou PBS não eletrolisado (controlo). Foram testados tempos de eletrólise de 600, 60, 30, 15 e 5 s. Após a adição de PBS (eletrolisado ou não eletrolisado), foram removidos 100 µL da suspensão, diluído em série até 10 000 vezes, em H₂O desionizada esterilizada e da última diluição foram retirados 100 µL da suspensão que foram espalhados em placa com YPDA (YPD com 1,5% p/v de agár).

Após os estudos preliminares, nos ensaios utilizaram-se sempre células preparadas de fresco conforme descrito no tópico 2.4.3.1. 50 µL do HOCl gerado electroquimicamente a 0,45 A em PBS ($[Cl^-] = 70$ mM), numa célula electroquímica de compartimento único, para vários tempos de eletrólise (30, 40, 55, 75 e 95 s), foi adicionado a 1 mL de suspensão de células que foram incubadas durante 5, 15 e 60 min. O HOCl gerado para um tempo de eletrólise de 95 segundos foi diluído em fatores de diluição de 0,5, 0,25, 0,1, 0,02 e 0,01 e o mesmo procedimento de adição e incubação foi realizado. Subsequentemente, um volume de 100 µL da suspensão de células foi recolhido, diluído em série até 10 000 vezes em H₂O desionizada esterilizada. Foram

espalhados 100 μL da suspensão em placa com YPDA. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 horas e as colónias contadas. As taxas de sobrevivência foram calculadas como percentagem de unidades formadoras de colónias em relação à situação controlo (sem HOCl).

2.4.3.3 Citometria de fluxo

A suspensão de células foi diluída até uma DO_{640} de 0,02 e 500 μL foram retirados para a medição autofluorescência. A suspensão restante foi incubada com diacetato de diclorofluoresceína (H_2DCFDA) 50 μM a 30 °C, 200 rpm, durante 1 h no escuro. Alíquotas de 1 mL foram misturadas com 50 μL de PBS eletrolisado ($[\text{Cl}^-] = 70 \text{ mM}$) diluído 10 vezes, obtido a partir de uma eletrólise de 95 s, a uma intensidade de corrente de 0,45 A, e incubadas durante 1 e 3 min.

Vinte mil células de cada amostra foram analisadas por citometria de fluxo num citómetro Epics® XLTM (*Beckman Coulter*) equipado com um laser de ião árgon que emite um feixe de 488 nm, a 15 mW. A fluorescência verde foi recolhida através de um filtro bloqueador a 488 nm, um passador dicróico longo a 550 nm e um filtro passador de banda a 225 nm. Os dados foram analisados e os histogramas foram construídos com o *Flowing Software* 2.5.1.

Capítulo 3

Resultados e Discussão

3 Resultados e Discussão

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados em três secções. Na primeira estão apresentados os resultados da otimização do método espectrofotométrico para a quantificação do ácido hipocloroso usando CUR. Na segunda secção estão apresentados os resultados relativos ao estudo da geração eletroquímica de ácido hipocloroso em meio biológico, sendo analisado o efeito de variáveis experimentais relevantes. Na terceira secção é avaliado o efeito do ácido hipocloroso gerado eletroquimicamente na viabilidade de células, usando leveduras como modelo celular.

3.1 Otimização do sistema de quantificação do HOCl pelo método da Curcumina

O método espectrofotométrico para a determinação de HOCl baseado na reação com a CUR foi testado e otimizado de forma a ser usado na quantificação desta espécie produzida por eletrólise. Foram consideradas as variáveis experimentais tais como o volume de solução de HOCl, a concentração da solução de CUR, o solvente e o tempo de reação.

Relativamente ao volume de eletrolisado a adicionar à CUR, a otimização foi realizada considerando um volume de solução de CUR de 3 mL e uma concentração da solução de CUR em etanol de 10 μM . Este valor foi selecionado atendendo à linearidade da curva de calibração de absorvância vs [CUR] neste solvente. Foi testada a adição de diferentes volumes de eletrolisado à solução de CUR, tendo-se verificado que o volume mais adequado seria 6 μL , como se apresenta na **Tabela 3.1**. Este volume mostrou ser o mais adequado, pois para além de permitir medir uma variação apreciável de absorvância, é suficientemente baixo para que seja possível desprezar a diluição causada pela sua adição à solução de CUR (simplificando os cálculos) e simultaneamente prosseguir com a eletrólise sem que ocorra uma variação apreciável do volume da solução na célula. Relativamente aos restantes volumes observava-se uma perda de cor muito acentuada. Nestes ensaios as medições foram realizadas para o tempo de eletrólise mais longo (600 s) de modo a garantir que a quantidade de CUR disponível era suficiente para reagir com todo o HOCl produzido.

Tabela 3.1 – Volumes de eletrolisado adicionados a 3 mL de CUR 10 μ M, após 600 segundos de eletrólise em PBS 140 mM a $I = 0,45$ A.

*3 mL de CUR 10 μ M	Volume de eletrolisado a adicionar					
	3 mL	2 mL	1 mL	600 μ L	60 μ L	6 μ L
	Perda de cor acentuada					✓

*solução etanólica

Nos primeiros estudos realizados usou-se etanol na preparação de todas as soluções de CUR devido a questões de solubilidade. Assim, quer da solução preparada a partir do sólido, (0,3 mM) quer as preparadas por diluição destas eram todas soluções etanólicas. No entanto, a volatilidade do etanol pode dar origem a variações acentuadas da concentração das suas soluções. De modo a minimizar este problema, foi testado o uso de soluções aquosas (tampão fosfato e tampão fosfato salino) e misturas destas com etanol na preparação das soluções diluídas de CUR, a partir da 0,3 mM em etanol. Como indicado na **Tabela 3.2**, quando se utilizou tampão fosfato ocorria a perda de cor amarela característica da CUR. Esta observação está de acordo com o referido por Wang *et al.* que referem a degradação da CUR em solução de tampão fosfato⁷⁰. Dada esta evidência, já não foram testadas as misturas de PB com etanol. Surpreendentemente, quando se usa o tampão fosfato salino não se observa a perda de cor da solução. No entanto observou-se a turvação da solução e a alteração da cor característica da CUR que passava de amarela a cor de laranja intenso. Relativamente às misturas etanol : PBS, esta alteração só se fez notar na solução com 25 % etanol. Relativamente às soluções com maior percentagem de etanol, 50 e 75 %, estes problemas deixaram de surgir, apresentando a solução a sua cor amarela característica. Face a estes resultados optou-se por usar a solução com maior percentagem de água, pois à partida esta terá menos problemas relacionados com a evaporação do solvente. A **Tabela 3.2** sumaria as condições testadas e as observações deste estudo.

Tabela 3.2 – Observações registadas para os diferentes solventes utilizados na preparação da solução de CUR.

	Etanol (%)			
	0	25	50	75
Tampão fosfato (PB)	Perda de cor	Não testado	Não testado	Não testado
Tampão fosfato salino (PBS)	Turvação Alteração da cor	Turvação Alteração da cor	✓	✓

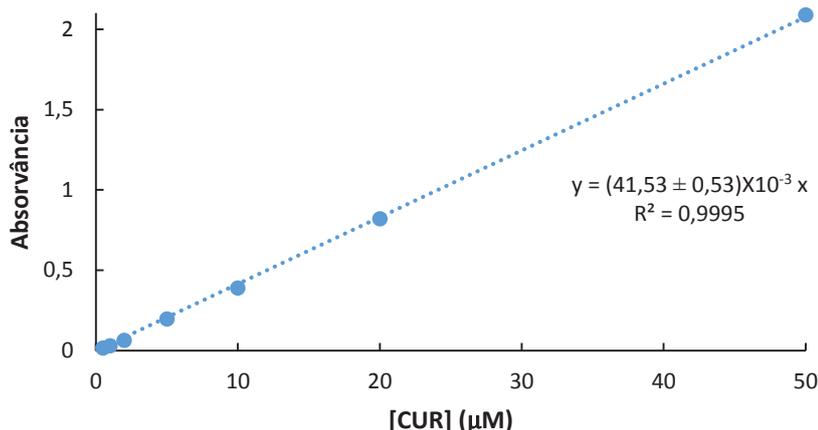


Figura 3.1 – Reta de calibração da absorvância em função da concentração de CUR.

Após a seleção do meio mais adequado foi traçada a curva de calibração da CUR de forma a estabelecer as concentrações mais adequadas à realização deste estudo. Por outro lado, a curva de calibração é um instrumento essencial para a posterior quantificação da quantidade de CUR consumida na reação com o HOCl e conseqüente determinação deste composto. Na **Figura 3.1** está apresentada a curva de calibração no intervalo onde a resposta é linear para a detecção da CUR em soluções etanol: PBS, a 50%. O coeficiente de correlação é bastante bom ($r = 0,9997$), não havendo desvios significativos dos pontos experimentais à reta, e portanto pode-se aceitar esta reta como uma função linear adequada. A partir desta reta, e utilizando a lei de Lambert-Beer ($A = c.l.\epsilon$), é possível estimar um valor para a absorvidade molar para a CUR de $41530 \pm 530 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. O valor de limite de detecção (LDD) para a curcumina foi determinado obtendo-se um valor de $0,72 \mu\text{M}$. Já o valor do limite de quantificação (LDQ) obtido foi de $2,15 \mu\text{M}$. Estes parâmetros foram estimados a partir dos parâmetros das retas de calibração do composto em estudo utilizando as **equações 10 e 11**, respetivamente, em que $S_{y/x}$ corresponde ao desvio padrão residual da curva de calibração, e b ao declive.

$$LDD = \frac{3,3S_{y/x}}{b} \quad (10)$$

$$LDQ = \frac{10S_{y/x}}{b} \quad (11)$$

Utilizando uma solução de CUR 10 μM foi registado o espectro de absorção, após a adição da solução do eletrolisado de uma solução de PBS, obtido para diferentes tempos de eletrólise. Como se observou um decréscimo muito acentuado da cor da CUR logo para o ensaio em que se usou o eletrolisado obtido para 100 segundos de eletrólise, optou-se por testar concentrações mais elevadas de CUR (**Figura 3.2**). Assim, preparam-se soluções 15, 20 e 30 μM de CUR. Tal como se pode verificar pelos resultados apresentados, a solução de 15 μM mostrou ser a mais adequada para a quantificação do HOCl, pois permite observar uma variação mais acentuada nos valores de absorvância em função dos tempos de eletrólise.

De acordo com os espectros apresentados na **Figura 3.2** é possível verificar que o máximo de absorvância se mantém aproximadamente inalterado após a adição do eletrolisado. Este resultado é interessante no sentido em que permite que a quantificação seja efetuada a comprimento de onda fixo (435 nm). O facto de o meio estar tamponado permite que as variações de pH não sejam apreciáveis na solução de CUR e deste modo não ocorra um desvio significativo do máximo de absorvância.

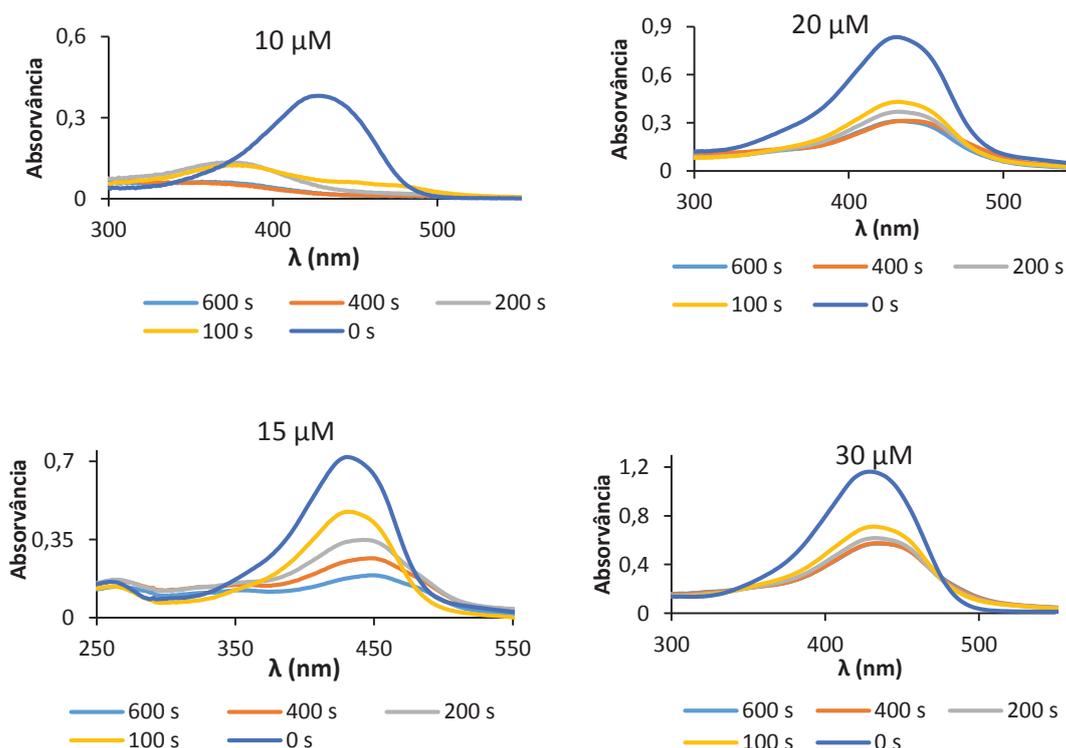


Figura 3.2 – Espectros de absorvância obtidos nos diferentes tempos de eletrólise para as diferentes concentrações iniciais de CUR em EtOH/PBS (1:1).

Para averiguar o efeito do tempo de espera, após a adição de eletrolisado, nas leituras de absorvância, realizou-se uma eletrólise em PBS sendo recolhidos 6 μL de eletrolisado a diferentes tempos de eletrólise (100, 200, 400 e 600 s). Para cada tempo, o eletrolisado foi misturado com 3 mL de CUR 15 μM e mediu-se a absorvância imediatamente, após 30 minutos e após 2 horas. Os resultados das medições realizadas encontram-se apresentados na **Tabela 3.3**, juntamente com o desvio padrão relativo (DPR) do conjunto dos 3 resultados. Os valores obtidos para tempos de espera de 0 e de 30 min apresentam um DPR de cerca de 7 %, aumentando este valor para cerca de 12 a 14 % quando se inclui o tempo de espera mais longo (120 min). Como o DPR obtido, considerando os 3 resultados ($t = 30$ e 120 min), é inferior a 10 % para tempos de eletrólise iguais ou inferiores a 200 s, pode considerar-se que não há diferenças muito importantes entre estes resultados. Em oposição, para tempos de eletrólise de 400 e 600 s, os resultados parecem indicar que a estabilidade da solução diminui e a absorvância da solução baixa ao longo do tempo. Este resultado demonstra que, especialmente quando a absorvância das soluções é mais baixa, se deve ter em atenção ao tempo de espera entre o momento em que é feita a mistura do eletrolisado com a solução de CUR e a leitura de absorvância, mantendo sempre que possível um tempo constante.

Tabela 3.3 – Valores de desvio padrão relativo (DPR) obtidos considerando as medidas de absorvância obtidas a diferentes tempos de leitura.

Tempo de eletrólise (s)	Absorvância				
	0	100	200	400	600
t = 0 min	0,725	0,484	0,402	0,284	0,277
t = 30 min	0,703	0,458	0,372	0,253	0,251
t = 120 min	0,688	0,418	0,338	0,214	0,216
DPR (0-30 min)	2 %	4 %	5 %	8 %	7 %
DPR (0-120 min)	3 %	7 %	9 %	14 %	12 %

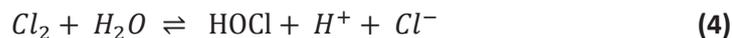
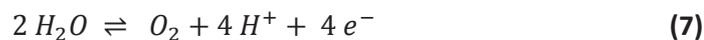
3.2 Geração eletroquímica e quantificação do HOCl

A geração eletroquímica de ácido hipocloroso foi realizada com recurso a eletrólises galvanostáticas, isto é, aplicando uma intensidade de corrente constante. Foram estudadas diferentes variáveis experimentais, de modo a averiguar como essas variáveis influenciam a produção de HOCl que é um dos produtos que se formam em meios fisiológicos no decurso do EChT.

Uma das variáveis estudadas foi a configuração da célula eletroquímica. Nas condições em que o tratamento é aplicado nos seres vivos, a distância entre o ânodo e o cátodo determina a possibilidade de mistura entre os fluidos eletrolisados pelos dois eletrodos. Assim, quando os eletrodos estão muito próximos há possibilidade de haver mistura entre estes, enquanto que, nos casos em que a distância entre estes é mais elevada, os tecidos limitam a difusão das espécies formadas através das eletrólises dos fluídos extracelulares. Foram realizadas eletrólises numa célula de compartimentos separados e de compartimento único, de modo a averiguar como a interação entre os produtos das reações anódicas e catódicas podem influenciar a eficiência da produção de HOCl.

Outra das variáveis estudadas é a concentração do íão cloreto presente na solução de PBS. Apesar de à partida este efeito ser previsível, o estudo serve para confirmar a importância desta variável na eficiência dos tratamentos.

A influência da extensão da eletrólise, muitas vezes referida por dose, que pode ser controlada quer pela intensidade de corrente quer pelo tempo, foi também estudada. De modo a utilizar condições próximas das descritas na bibliografia, optou-se por aplicar intensidades de corrente suficientemente elevadas de modo a polarizar o eletrodo em potenciais suficientemente elevados para que ocorra a evolução de H₂ no cátodo (**Equação 1**) e de O₂ no ânodo (**Equação 2**). A evolução destes gases é descrita pelos vários autores, que também referem a evolução do cloro no ânodo (**Equação 3**)⁷¹. No seguimento da passagem de corrente, para além das reações eletroquímicas que dão origem aos produtos referidos, deverão ocorrer as reações de solubilização do cloro (**Equação 4**) e o equilíbrio de ionização do HOCl (**Equação 5**). Todos estes processos determinam a eficiência da produção do HOCl.



A quantificação do HOCl formado é realizada indiretamente, a partir de medidas espectralométricas usando a da função de calibração linear definida para a CUR (**Figura 3.1**). Na determinação da [HOCl] é considerada uma estequiometria de reação entre o HOCl e a CUR de 1:1⁶⁸. Desta forma, a concentração de HOCl produzida ao fim de um tempo t de eletrólise foi

calculada a partir da diferença entre as concentrações: $[CUR]_0 - [CUR]_t$, sendo que as concentrações de CUR são obtidas a partir da curva de calibração. A quantidade de HOCl na célula de eletrólise foi calculada atendendo aos volumes da solução usados na quantificação, V_{CUR} (volume correspondente à solução de CUR), V_{aliq} (volume da alíquota de eletrolisado) e $V_{cél}$ (volume da célula de eletrólise), atendendo à **Equação 12** e à **Equação 13**.

$$n_{HOCl,ad} = \Delta [CUR] \times V_{CUR} \quad (12)$$

$$n_{HOCl,t} = \frac{n_{HOCl,ad}}{V_{aliq}} \times V_{cél} \quad (13)$$

3.2.1 Eletrólises em célula com compartimentos separados, tempos curtos

No EChT, o ânodo e o cátodo estão normalmente separados espacialmente, sendo reportado que na maioria das vezes o ânodo é colocado no centro do tumor e o cátodo na sua periferia, como referido no capítulo 1. Consequentemente a difusão das espécies é limitada, assim como a interação entre os produtos da eletrólise formados nas reações eletroquímicas durante o tratamento. Esta configuração assemelha-se a uma célula eletroquímica com dois compartimentos. Desta forma, decidiu-se iniciar o estudo eletroquímico usando uma célula com esta configuração.

3.2.1.1 Efeito da concentração de íão cloreto

O íão cloreto encontra-se em abundância tanto no interior das células como no meio extracelular. O tampão fosfato salino usado na preparação de meios biológicos contém uma concentração de íão cloreto de 140 mM que é idêntica à fisiológica. Para o estudo desta variável foram realizadas eletrólises em solução PBS, com diferentes concentrações de íão cloreto, nomeadamente de 70 mM, 14 mM e 0 mM, para além de 140 mM. A intensidade de corrente usada nas eletrólises foi de 0,45 A durante 200 s. Os resultados obtidos nestes ensaios encontram-se apresentados na **Figura 3.3**, onde está representado o número de moles de HOCl produzido em função da concentração de Cl^- no meio. Assim, tal como era de esperar, verifica-se que quanto maior a concentração de Cl^- presente na solução de PBS maior é a quantidade de HOCl produzida. É de notar que na eletrólise realizada na ausência de íão cloreto não se observou a descoloração da CUR, tal como era de esperar.

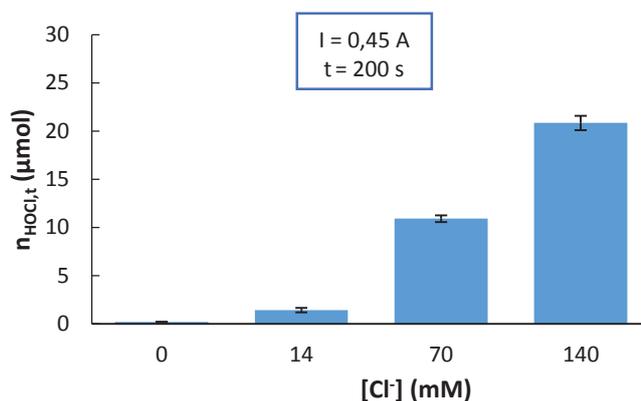


Figura 3.3 – Quantidade de HOCl produzida em eletrólises realizadas nas eletrólises galvanostáticas ($I = 0,45 \text{ A}$), em diferentes concentrações de $[\text{Cl}^-]$, em célula de dois compartimentos e para um tempo de eletrólise de 200 segundos. Os resultados estão apresentados sob a forma $n_{\text{HOCl},t} \pm$ desvio padrão, obtido a partir de pelo menos 2 eletrólises

A eficiência da reação relativamente à produção de HOCl é relativamente baixa (**Tabela 3.4**). A carga gerada durante a eletrólise é de 90 C ($= 200 \text{ s} \times 0,45 \text{ A}$), o que corresponde a $9,3 \times 10^{-4}$ mol de eletrões. Atendendo a que para a geração de uma mole de HOCl são necessários 2 mol de eletrões, a quantidade de HOCl produzida seria, para uma eficiência de 100 %, de 465 μmol. Os valores obtidos são de cerca de uma a duas ordens de grandeza abaixo deste valor, mostrando que a reação de evolução de oxigénio no ânodo ocorre com uma extensão apreciável. O efeito do aumento da concentração de ião cloreto traduz-se no aumento do rendimento desta reação, que passa de 0,31 %, quando $[\text{Cl}^-] = 14 \text{ mM}$, para 4,5 % quando $[\text{Cl}^-] = 140 \text{ mM}$ (**Tabela 3.4**). Este aumento do rendimento decorre do aumento da eficiência da reação que ocorre em competição com a evolução de oxigénio, sendo que ambas as reações ocorrem a potenciais próximos e inferiores ao potencial a que o ânodo está sujeito. Pode ainda observar-se a partir dos resultados apresentados na **Figura 3.4** que o rendimento aumenta linearmente com a concentração de ião cloreto.

Tabela 3.4 - Efeito da concentração de ião cloreto na eficiência da reação de produção HOCl em eletrólises efetuadas em célula de dois compartimentos, $I = 0,45 \text{ A}$, para um tempo de eletrólise de 200 segundos. Os intervalos de confiança correspondem aos desvios padrão calculados a partir dos resultados de pelo menos 2 eletrólises.

[Cl ⁻] (mM)	n _{HOCl,t} (μmol)	Rendimento da reação (%)
14	1,43 ± 0,24	0,31 ± 0,05
70	10,9 ± 0,4	2,34 ± 0,09
140	20,8 ± 0,7	4,47 ± 0,15

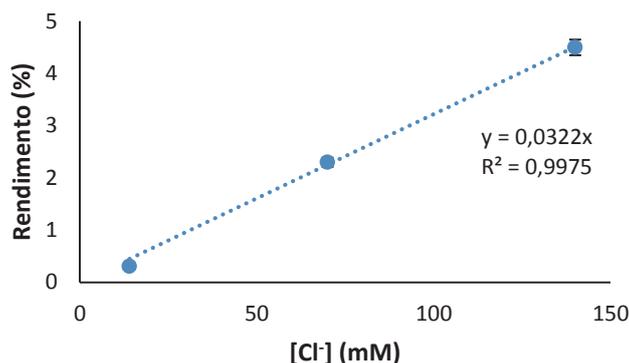


Figura 3.4 – Rendimento da produção de HOCl em função da concentração de íon cloreto presente na solução de PBS.

3.2.1.2 Efeito da intensidade de corrente

Nestes ensaios, as eletrólises foram realizadas em PBS, com uma concentração de íon cloreto fixa, 140 mM, variando-se a intensidade de corrente aplicada entre o ânodo e o cátodo. As intensidades de correntes testadas foram 0,45 A, 0,225 A e 0,15 A. Esta variável é muito importante, como já foi referido, pois influencia diretamente a dose aplicada nos tratamentos eletroquímicos.

Pela **Figura 3.5** pode verificar-se que a quantidade de HOCl formada é superior quando a intensidade de corrente aplicada é maior. Como a extensão das reações eletroquímicas numa eletrólise depende da quantidade de carga, para um intervalo de tempo fixo, esta aumenta com a intensidade de corrente. Assim, é gerada uma maior quantidade de cloro (**Equação 3**) e consequentemente forma-se uma maior quantidade de HOCl (**Equação 4**).

A possibilidade de difusão de HOCl através da membrana que dividia os dois compartimentos da célula eletroquímica foi avaliada recorrendo à reação com a CUR. Após as eletrólises foi retirado do compartimento catódico uma alíquota que foi adicionada à solução de CUR. Os valores de absorvância obtidos mantiveram-se aproximadamente iguais ao valor de absorvância lido para o controlo, correspondente a um tempo de eletrólise igual a zero, o que indica que não é possível detetar HOCl neste compartimento.

A partir da análise da **Tabela 3.5**, pode observar-se que apesar de ocorrer um aumento da quantidade de HOCl produzida quando aumenta a intensidade de corrente, o rendimento da reação diminui, passando de 7,5 %, quando a intensidade de corrente usada na eletrólise é de 0,15 A, para 4,5 % quando se usa 0,45 A.

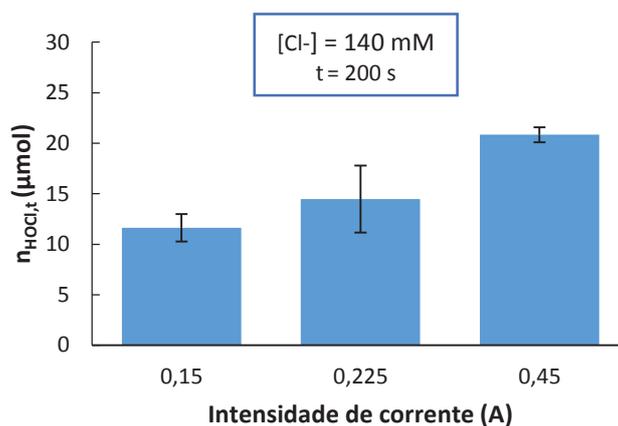


Figura 3.5 – Quantidade de HOCl produzida em eletrólises realizadas numa solução de PBS a diferentes intensidades de corrente, $[\text{Cl}^-] = 140 \text{ mM}$, em célula de dois compartimentos e para um tempo de eletrólise de 200 segundos. Os resultados estão apresentados sob a forma $n_{\text{HOCl}} \pm$ desvio padrão, obtido a partir de pelo menos 2 eletrólises.

Tabela 3.5 - Efeito da intensidade de corrente na eficiência da reação de produção HOCl em eletrólises efetuadas em célula de dois compartimentos, $[\text{Cl}^-] = 140 \text{ mM}$ e um tempo de eletrólise de 200 s. Os intervalos de confiança correspondem aos desvios padrão calculados a partir dos resultados de pelo menos 2 eletrólises.

I (A)	n_e (μmol)	$n_{\text{HOCl},t}$ (μmol)	Rendimento da reação (%)
0,15	310	11,61 ± 1,36	7,5 ± 0,9
0,225	466	14,48 ± 3,31	6,2 ± 1,4
0,45	933	20,85 ± 0,75	4,5 ± 0,2

3.2.2 Eletrólises em célula com compartimento único, tempos curtos

Uma das variáveis importantes do EChT é a distância entre os elétrodos. O aumento da distância pode em primeira análise afetar a eficiência do processo devido ao aumento da queda óhmica associada ao transporte de carga através de um meio resistivo. Por outro lado, este afastamento pode impedir que as espécies formadas no ânodo não sejam reduzidas no cátodo, e vice-versa, podendo ter como consequência o aumento da eficiência do processo.

Em termos do paralelismo com as condições experimentais em que é aplicado o EChT, os resultados obtidos em célula de compartimento único simulam a situação em que há lugar à mistura dos produtos formados no ânodo e no cátodo.

3.2.2.1 Efeito da concentração do íon cloreto

À semelhança do estudo realizado usando a célula de dois compartimentos, realizaram-se eletrólises em solução PBS com diferentes concentrações de íon cloreto usando uma intensidade de corrente de 0,45 A. De uma forma idêntica à observada na célula de 2 compartimentos, verificou-se que quanto maior a concentração de íon cloreto presente na solução de PBS maior é a quantidade de HOCl formada (**Figura 3.6**).

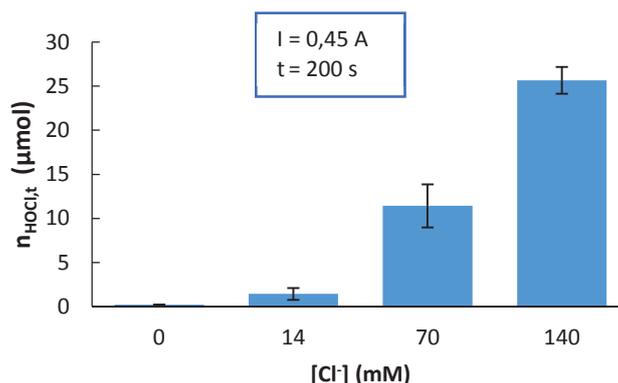


Figura 3.6 - Quantidade de HOCl produzida em eletrólises realizadas nas eletrólises galvanostáticas ($I = 0,45$ A), em diferentes concentrações de $[Cl^-]$, em célula de um compartimento e para um tempo de eletrólise de 200 segundos. Os resultados estão apresentados sob a forma $n_{HOCl,t} \pm$ desvio padrão, obtido a partir de pelo menos 2 eletrólises.

Tal como verificado para as eletrólises realizadas em compartimentos separados, o efeito do aumento da concentração de íon cloreto traduz-se no aumento do rendimento desta reação, que passa de 0,31 %, quando $[Cl^-] = 14$ mM, para 5,5 % quando $[Cl^-] = 140$ mM (**Tabela 3.6**). Pode ainda verificar-se que o rendimento aumentou linearmente com a concentração de íon cloreto, como se encontra apresentado na **Figura 3.7**.

Tabela 3.6 - Efeito da concentração de íon cloreto na eficiência da reação de produção HOCl em eletrólises efetuadas em célula de compartimento único, a uma intensidade de corrente de 0,45 A, para um tempo de eletrólise de 200 segundos. Os intervalos de confiança correspondem aos desvios padrão calculados a partir dos resultados de pelo menos 2 eletrólises.

[Cl ⁻] (mM)	n _{HOCl,t} (μmol)	Rendimento da reação (%)
14	1,43 ± 0,67	0,31 ± 0,14
70	11,4 ± 2,4	2,5 ± 0,5
140	25,6 ± 1,5	5,5 ± 0,3

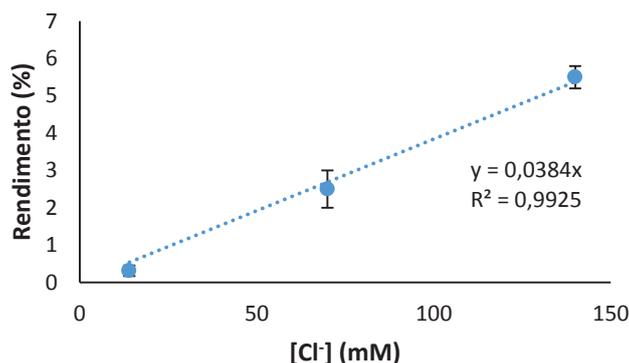


Figura 3.7 - Rendimento da produção de HOCl em função da concentração de íon cloreto presente na solução de PBS.

3.2.2.2 Efeito da intensidade de corrente

Relativamente aos resultados obtidos para as diferentes intensidades de corrente, verifica-se também que quanto maior a intensidade de corrente aplicada maior é a quantidade de HOCl produzida (Figura 3.8).

Os rendimentos das reações estão apresentados na Tabela 3.7. Pode observar-se que apesar do aumento da quantidade de HOCl produzida quando a intensidade de corrente aumenta, o rendimento da reação tem tendência a diminuir, passando de 6,3 % quando $I = 0,15$ A para 5,5% quando $I = 0,45$ A. Comparando este resultados com os das eletrólises realizadas na célula com compartimentos separado, há uma ligeira diminuição da eficiência de produção do HOCl na intensidade de corrente mais baixa e simultaneamente um pequeno aumento do rendimento na intensidade de corrente mais elevada. As diferenças observadas são no entanto muito pequenas.

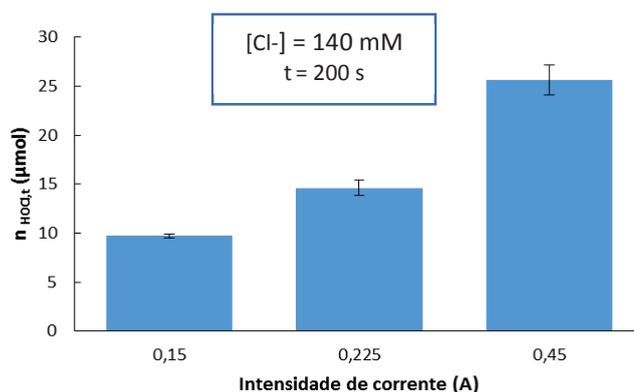


Figura 3.8 - Quantidade de HOCl produzida em eletrólises realizadas numa solução de PBS a diferentes intensidades de corrente, $[Cl^-] = 140$ mM, em célula de compartimento único e para um tempo de eletrólise de 200 segundos. Os resultados estão apresentados sob a forma $n_{HOCl} \pm$ desvio padrão, obtido a partir de pelo menos 2 eletrólises.

Tabela 3.7 - Efeito da intensidade de corrente na eficiência da reação de produção HOCl em eletrólises efetuadas em célula de dois compartimentos, [Cl⁻] = 140 mM e um tempo de eletrólise de 200 s. Os intervalos de confiança correspondem aos desvios padrão calculados a partir dos resultados de pelo menos 2 eletrólises.

I (A)	n _e (μmol)	n _{HOCl,t} (μmol)	Rendimento da reação (%)
0,15	310	9,73 ± 0,18	6,3 ± 0,1
0,225	466	14,6 ± 0,8	6,3 ± 0,3
0,45	933	25,6 ± 1,5	5,5 ± 0,3

A semelhança entre a eficiência da reação nas duas situações experimentais (célula com um e dois compartimentos), permite-nos concluir que as perdas de energia por queda óhmica são semelhantes nas duas células. Por outro lado, é também possível concluir que o HOCl produzido no ânodo não é consumido no cátodo a velocidade apreciável. Estes resultados são importantes pois permitem-nos descartar estes efeitos da origem de diferenças entre resultados obtidos nas duas configurações de célula noutras condições experimentais.

3.2.3 Comparação da produção de HOCl nas diferentes configurações da célula

Os dados anteriormente apresentados mostraram não haver uma diferença apreciável entre os resultados das células com diferente configuração para tempos de reação curtos. Esta conclusão permite validar o funcionamento de ambas as configurações das células em condições em que a extensão da reação é baixa.

Para eletrólises mais longas, as condições em que ocorre a formação de HOCl são diferentes, nomeadamente devido às variações de pH. Enquanto que para tempos mais curtos o efeito tampão do PBS é suficiente para manter o pH do meio aproximadamente constante, para tempos mais longos é previsível que ocorram variações apreciáveis do pH.

Na **Figura 3.9** e **Figura 3.10** estão apresentados os valores de pH medidos, após uma eletrólise de 600 s, na célula de dois compartimentos (no compartimento anódico) e na de um único compartimento, respetivamente.

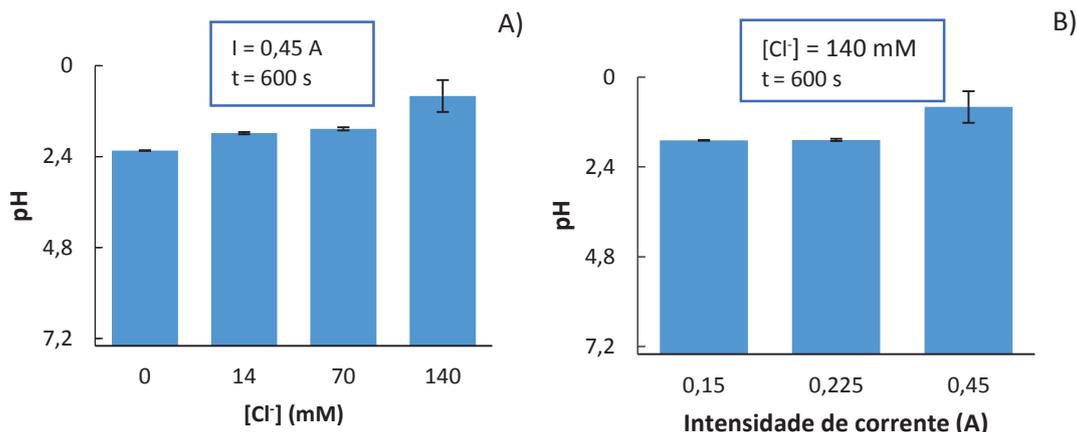


Figura 3.9 - A) Valores de pH obtidos para as eletrólises realizadas em PBS com diferentes teores de cloreto, numa célula de dois compartimentos, a uma intensidade de corrente 0,45 A, para um tempo de eletrólise de 600 segundos. **B)** Valores de pH obtidos para as eletrólises realizadas a diferentes intensidades de corrente, a uma concentração de $[Cl^-] = 140$ mM, numa célula de dois compartimentos, para um tempo de eletrólise de 600 segundos.

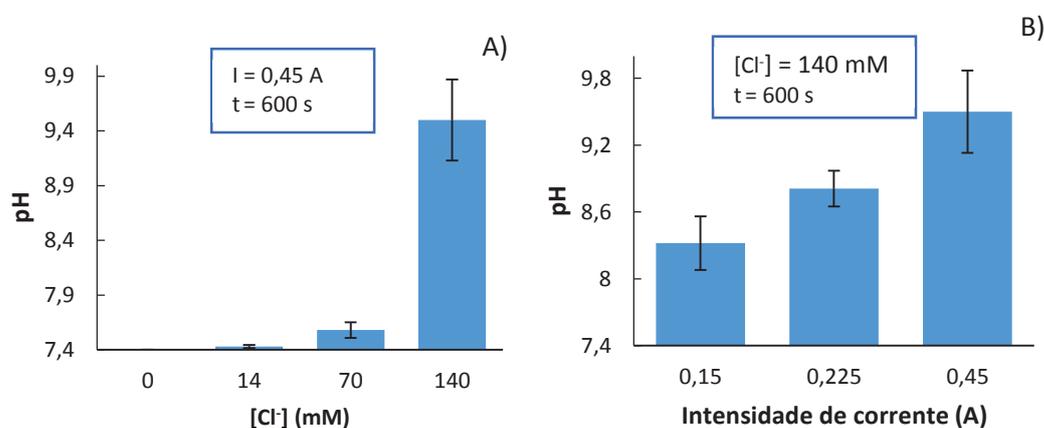


Figura 3.10 - A) Valores de pH obtidos para as eletrólises realizadas em PBS com diferentes teores de cloreto, numa célula de compartimento único, a uma intensidade de corrente 0,45 A, para um tempo de eletrólise de 600 segundos. **B)** Valores de pH obtidos para as eletrólises realizadas a diferentes intensidades de corrente, a uma concentração de $[Cl^-] = 140$ mM, numa célula de compartimento único, para um tempo de eletrólise de 600 segundos.

Na célula de dois compartimentos, a solução no compartimento anódico sofre uma acentuada acidificação. Os valores de pH são de $1,56 \pm 0,36$. Esta acidificação está associada à oxidação da água que ocorre com a formação de H^+ (**Equação 2**). Este valor parece não ser muito influenciado pelas condições experimentais. As variações observadas são pequenas e não têm muito significado pois os valores estão no intervalo de pH em que a membrana de vidro responde com elevada incerteza (erro ácido). O pH do compartimento catódico foi também medido após as eletrólises efetuadas, obtendo-se valores muito elevados ($pH_{\text{catódico}} = 12,74 \pm 0,09$). Esta alcalinização é devida à redução da água com consequente formação de aniões hidroxilo (**Equação 1**).

Na célula de um compartimento, o pH das soluções depende fortemente tanto da concentração de íão cloreto como da intensidade de corrente. Na ausência de íão cloreto o pH da solução não sofre alteração, mantendo o valor inicial da solução tampão, pH 7,4. Este resultado deve-se ao facto de que quando não existem íões cloreto em solução, a concentração de prótons formados no ânodo é equivalente à concentração de íões hidróxido produzidos no cátodo. A alcalinização observada na presença de Cl^- , deve-se ao facto de se produzir uma menor concentração de H^+ no ânodo do que a de OH^- produzida no cátodo. A extensão de oxidação da água no ânodo tende a diminuir com o aumento de $[\text{Cl}^-]$, o que justifica o efeito observado. Por outro lado, o aumento do pH com a intensidade de corrente, resulta do aumento da extensão da formação de Cl_2 , com decréscimo da formação de H^+ .

A **Figura 3.11** apresenta os resultados correspondentes à quantidade de ácido hipocloroso formado ao fim de 600 s de electrólise nas células electroquímicas de diferente configuração. Pode observar-se que a quantidade formada na célula de compartimento único é sempre superior à formada na célula de compartimentos separados, nas mesmas condições. Este resultado pode estar associado ao facto de na célula de dois compartimentos, o volume da solução no compartimento anódico ser metade da relativa à célula de compartimento único. Este facto pode resultar num decréscimo da $[\text{Cl}^-]$ mais acentuado ao longo do tempo e na produção de uma menor quantidade de Cl_2 (e conseqüentemente de HOCl).

Por outro lado, a diferença entre a quantidade de HOCl produzida depende das condições em que a electrólise é realizada, nomeadamente da $[\text{Cl}^-]$ e da intensidade de corrente. As maiores diferenças são observadas para as condições experimentais que conduzem a uma maior extensão da reacção, nomeadamente aos valores mais elevados das variáveis referidas. Estas condições são também as que estão na origem de variações mais acentuadas de pH na célula de compartimento único (**Figura 3.10**). Dada a importância da configuração da célula na quantidade de HOCl produzida, foram concebidas experiências para esclarecer a origem deste efeito. Os resultados dessas experiências são discutidos na secção 3.2.4.

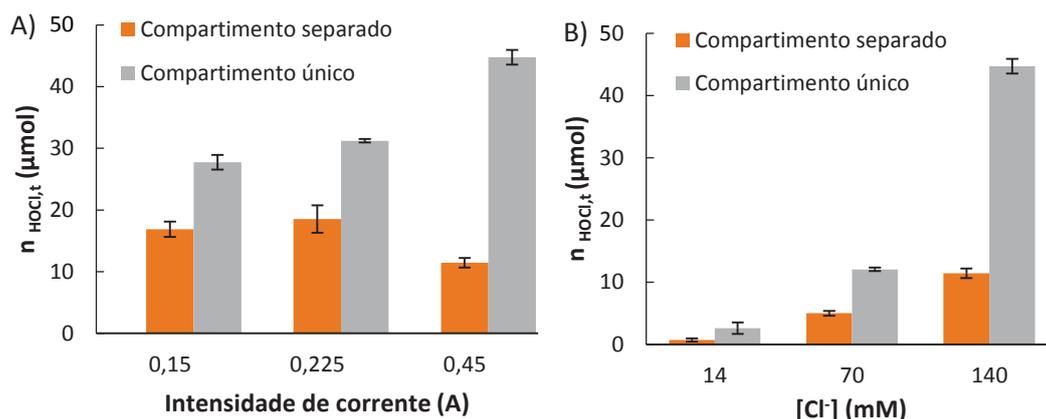


Figura 3.11 – Comparação entre a quantidade de HOCl produzida na célula eletroquímica de dois compartimentos e de compartimento único, em eletrólises galvanostáticas, para um tempo de eletrólise de 600 segundos, nas diferentes variáveis: A) Intensidade de corrente, $[\text{Cl}^-] = 140 \text{ mM}$; B) Concentração de cloreto, $I = 0,45 \text{ A}$. Os resultados estão apresentados sob a forma $n_{\text{HOCl}} \pm$ desvio padrão, obtido a partir de pelo menos 2 eletrólises.

3.2.4 Efeito do pH do meio na extensão da formação de HOCl

De forma a verificar como as variações de pH influenciam a formação de HOCl, foram realizadas eletrólises em PBS 140 mM e a uma intensidade de corrente de 0,45 A, numa célula de compartimento único. A quantidade de HOCl produzida nestas condições foi quantificada, assim como o pH do meio. O pH desta solução foi acertado para o valor de pH obtido noutras eletrólises. Este acerto de pH foi efetuado através da adição de volumes muito reduzidos de soluções de NaOH (1,0 M) ou de HCl (1,0 M), de modo a evitar a diluição das mesmas.

Na **Figura 3.12** estão apresentados os resultados onde se compara a quantidade de HOCl produzida a diferentes intensidades de corrente. O pH do eletrolisado obtido na eletrólise de referência (0,45 A) foi acertado para pH 8,65 e para 8,14, que correspondem aos valores de pH medidos após eletrólises realizadas a 0,225 A e a 0,15 A, respetivamente. No seguimento do acerto do pH verifica-se um decréscimo do número de moles do HOCl. Este decréscimo pode ser explicado pelo facto de existir um equilíbrio entre o HOCl e o Cl_2 (**Equação 4**). Ao diminuir o pH, a reação evolui no sentido de diminuir a concentração de HOCl, aumentando a concentração de Cl_2 . Este facto pode levar à eventual libertação de Cl_2 para a atmosfera, quando a sua concentração atinge valores superiores aos da solubilidade. O decréscimo observado no número de moles de HOCl após o acerto de pH pode ter origem nas perdas de Cl_2 para a atmosfera. Assim, os valores de n_{HOCl} medidos após o acerto são semelhantes aos obtidos nas eletrólises realizadas a intensidades de corrente mais baixas.

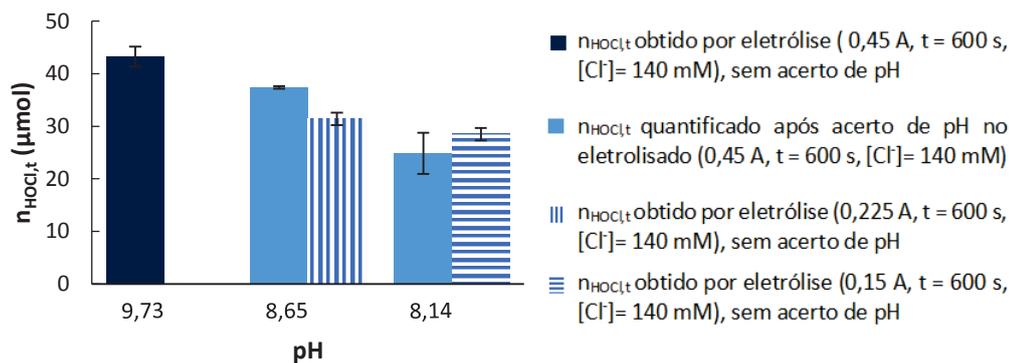


Figura 3.12 - Estudo do efeito da intensidade de corrente na extensão da reação, por comparação do número de moles obtidos (μmol) de HOCl nas eletrólises efetuadas a diferentes intensidades de corrente com e sem acerto de pH. Os resultados estão apresentados sob a forma $n_{\text{HOCl}} \pm$ desvio padrão, obtido a partir de pelo menos 2 eletrólises.

De uma forma semelhante à apresentada para o efeito da intensidade de corrente, foram comparados os resultados obtidos nas duas configurações de célula eletroquímica. Assim, a quantidade de HOCl obtida numa eletrólise em PBS 140 mM, 0,45 A, numa célula de compartimento único, foi determinada antes e após o acerto do pH do eletrólise. O pH foi acertado para o obtido no compartimento anódico, após uma eletrólise realizada em condições semelhantes, mas numa célula de dois compartimentos. Os resultados encontram-se apresentados na **Figura 3.13**. Mais uma vez se verifica uma diminuição acentuada do número de moles de HOCl, para valores próximos aos quantificados nas eletrólises realizadas na célula de dois compartimentos. Este resultado indicam claramente que o pH tem uma enorme importância na quantidade de HOCl produzida. Este efeito sobrepõe-se ao efeito anteriormente identificado, relacionado com o volume de solução em contacto com o ânodo.

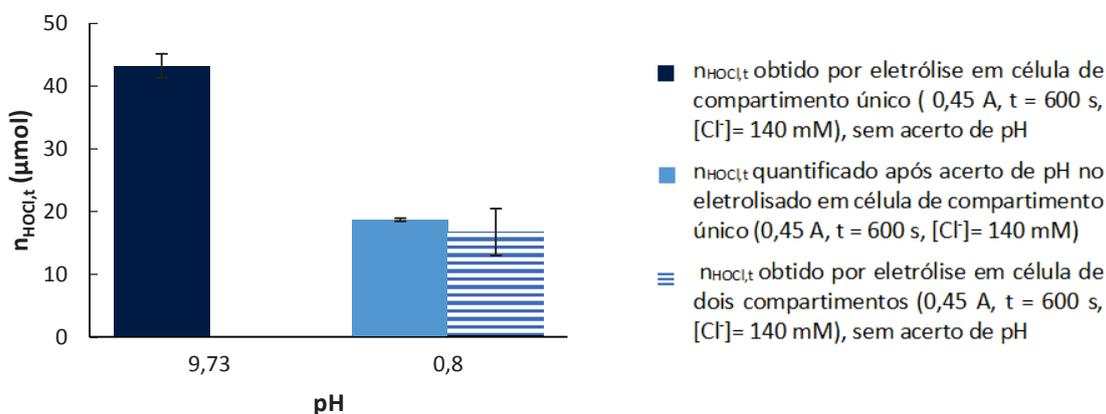


Figura 3.13 - Estudo do efeito da configuração da célula eletroquímica na extensão da reação, por comparação entre o número de moles de HOCl obtidos nas eletrólises efetuadas na célula de um e de dois compartimentos com e sem acerto de pH. Os resultados estão apresentados sob a forma $n_{\text{HOCl}} \pm$ desvio padrão, obtido a partir de pelo menos 2 eletrólises.

3.2.5 Efeito do tempo de eletrólise

A variação da quantidade de HOCl em função do tempo de eletrólise foi determinada em eletrólises na presença de diferentes concentrações de íão cloreto, diferentes intensidades de corrente, nas células de um e de dois compartimentos.

Na **Figura 3.14 A) e B)** estão apresentados os resultados obtidos na célula de dois compartimentos. É possível verificar que as quantidades produzidas de HOCl são sempre superiores na solução 140 mM, diminuindo à medida que se diminui a concentração de íão cloreto. As maiores diferenças observadas entre estes resultados são obtidas para $t = 200$ s. Até este tempo de eletrólise parece existir uma proporcionalidade direta entre a quantidade de HOCl produzida e o tempo de eletrólise, independentemente da $[Cl^-]$. A partir deste tempo, a quantidade de HOCl mantêm-se aproximadamente constante ($t = 400$ s), diminuindo para os tempos mais longos ($t = 600$ s).

Relativamente às eletrólises realizadas a diferentes intensidades de corrente, verifica-se um efeito semelhante, no sentido em que nos tempos mais curtos a formação de HOCl é superior quando a intensidade de corrente é mais elevada, mas esse efeito é anulado para os tempos mais longos.

Estas observações parecem indicar que o efeito associado à forte acidificação do meio, para tempos de eletrólise mais longos, é determinante nesta configuração de célula eletroquímica. Assim, esse efeito impede que ocorra um aumento eficiente da quantidade de HOCl formada a partir do Cl_2 , ainda que as condições experimentais suportem esse aumento.

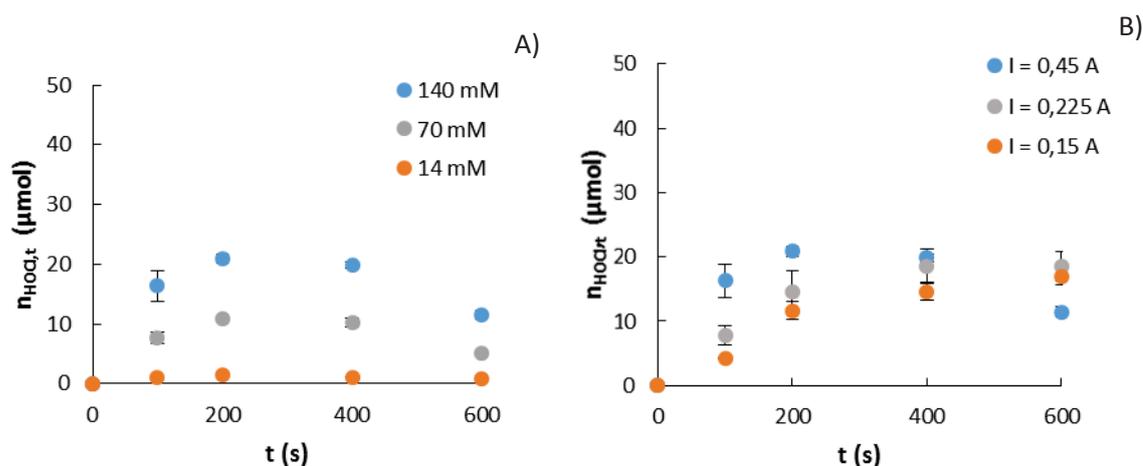


Figura 3.14 - A) Número de moles de HOCl produzidos ao longo dos diferentes tempos de eletrólise para as diferentes concentrações de íão cloreto. B) Número de moles de HOCl produzidos ao longo dos diferentes tempos de eletrólise para as diferentes intensidades de correntes aplicadas. Os resultados estão apresentados sob a forma $n_{HOCl} \pm$ desvio padrão, obtido a partir de pelo menos 2 eletrólises, numa célula eletroquímica de dois compartimentos.

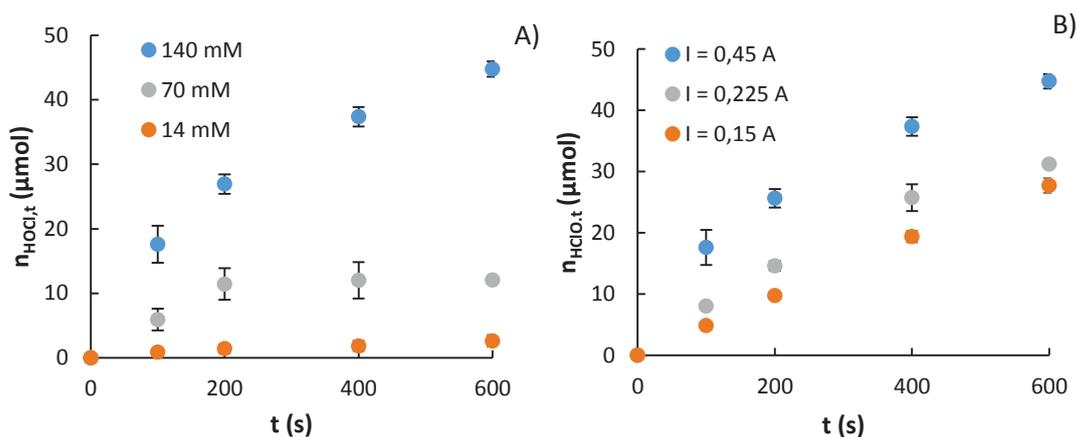


Figura 3.15 - A) Número de moles de HOCl produzidos ao longo dos diferentes tempos de eletrólise para as diferentes concentrações de íão cloreto. B) Número de moles de HOCl produzidos ao longo dos diferentes tempos de eletrólise para as diferentes intensidades de correntes aplicadas. Os resultados estão apresentados sob a forma $n_{HOCl,t} \pm$ desvio padrão, obtido a partir de pelo menos 2 eletrólises, numa célula eletroquímica de compartimento único.

Os resultados obtidos ao longo do tempo na célula eletroquímica de um único compartimento estão apresentados na **Figura 3.15 A) e B)**. Nesta figura é possível verificar que ocorre um aumento da quantidade de HOCl formado com o tempo de eletrólise. Esta tendência é visível para os resultados obtidos para todas as concentrações de íão cloreto e intensidades de corrente testadas. Nestas condições, a produção de Cl_2 é acompanhada do aumento do pH do meio, o que leva à sua dissolução em maior extensão.

Face a estes resultados pode concluir-se que a proximidade entre o ânodo e cátodo é vantajosa no sentido em que a produção de HOCl é otimizada no decurso do aumento do pH do meio.

3.3 Ensaios com células

Para a avaliação do efeito do HOCl foram realizados ensaios celulares, onde foi escolhida a levedura *S. cerevisiae* como modelo celular, pois as vantagens deste modelo biológico são bem conhecidas, nomeadamente um crescimento rápido, um cultivo barato e de fácil manipulação. Os mecanismos moleculares dos processos celulares fundamentais são muito semelhantes entre os eucariotas superiores e as leveduras, relativamente à transcrição, replicação e reparação de DNA. A sequência completa do genoma de *S. Cerevisiae* encontra-se agora disponível, e por isso, este é um dos modelos de sistemas mais estudados no que diz respeito à biologia celular, biologia molecular e genética. Assim, é considerado um bom modelo para a compreensão dos processos biológicos que são relevantes para eucariotas superiores, incluindo o Homem⁷².

Foram realizados ensaios preliminares do efeito do HOCl, efetuando eletrólises a 0,45 A, em PBS contendo 140 mM de íão cloreto, para os tempos de eletrólise indicados na **Tabela 3.8**, onde as células de levedura previamente congeladas foram ressuspensas no eletrolisado. Observou-se que as concentrações produzidas de HOCl são fortemente citotóxicas pois não foram obtidas viabilidades para nenhum dos ensaios.

Tabela 3.8 - Concentração de HOCl produzido para os diferentes tempos de eletrólise e utilizado para o tratamento com as células. Soluções PBS com $[Cl^-] = 140$ mM foram eletrolisadas na célula de compartimento único, $I = 0,45$ A.

Tempo de eletrólise (s)	[HOCl] produzido e adicionado às células (mM)	Viabilidade (%)
600	3,19	0
60	1,41	0
30	1,38	0
15	0,75	0
5	0,61	0

Foram depois realizadas eletrólises para tempos mais curtos (30, 15 e 5 s), numa solução de PBS contendo 14 mM de íão cloreto, de modo a ressuspender o *pellet* das células preparadas de fresco em concentrações mais baixas de HOCl (entre os 36-64 μ M). No entanto, as viabilidades obtidas não eram consistentes nem reprodutíveis para as várias réplicas efetuadas, com desvios padrões relativos muito superiores aos 20 % aceitáveis em ensaios de viabilidade. Estes resultados podem dever-se ao fato de o contato do eletrolisado com o *pellet* não ser homogêneo de cada vez que este é ressuspensado.

Tendo em conta os resultados anteriores alterou-se a metodologia de exposição das células ao HOCl gerado eletroquimicamente, sendo que este passou a ser adicionado a uma suspensão de células e não ao *pellet*, obtendo-se resultados mais uniformes.

Como referido na parte experimental, foram realizadas eletrólises em PBS contendo 70 mM de íão cloreto para diferentes tempos de eletrólise, e que foram incubadas durante 5, 15 e 60 min.

Esta experiência foi iniciada para um tempo de eletrólise de 95 s, e como não foram obtidas viabilidades para um tempo de incubação de 5 min, foram testados outros tempos de eletrólise mais curtos. Para os restantes tempos de eletrólise, observou-se que as concentrações de HOCl na suspensão de células, apesar de serem mais baixas, continuavam a provocar a morte celular total (**Tabela 3.9**), uma vez que, para um tempo de incubação de 5 min, também já não se obtinham viabilidades, o que indica que o efeito do HOCl é imediato.

Por sua vez, para um tempo de eletrólise de 30 s, observou-se uma diminuição da viabilidade em 22 % aos 5 min de incubação (**Tabela 3.9**), o que demonstra um efeito citotóxico menos severo para a concentração correspondente.

Tabela 3.9 - Concentração de HOCl produzido por diferentes tempos de eletrólise e viabilidades obtidas para a concentração de HOCl utilizada no tratamento com as células, num tempo de incubação de 5 min. As soluções PBS com $[Cl^-] = 70 \text{ mM}$ foram eletrolisadas na célula de compartimento único, $I = 0,45 \text{ A}$.

Tempo de eletrólise (s)	[HOCl] produzido (μM)	[HOCl] na suspensão de células (μM)	Viabilidade (%)
95	794	39,7	0
75	499	24,9	0
55	277	13,9	0
40	169	8,45	0
30	92,7	4,64	78

De modo a verificar a reprodutibilidade dos resultados foi realizada outra abordagem, onde a solução de PBS, eletrolisada até um tempo de 95 segundos, foi diluída em fatores de diluição de 0,5, 0,25, e 0,1 cujas concentrações de HOCl na suspensão de células (**Tabela 3.10**) correspondem às concentrações de HOCl na suspensão celular para os tempos de eletrólise de 75, 55 e 30 s, respetivamente (**Tabela 3.9**). Observou-se que os resultados são reprodutíveis, pois mais uma vez há perda total de viabilidade para os fatores de diluição de 0,5 e 0,25, conforme apresentado na **Tabela 3.10**.

Tabela 3.10 - Viabilidades obtidas para as concentrações de HOCl utilizadas no tratamento das células, proveniente de diluições do eletrolisado de 95 s, num tempo de incubação de 5 min. Soluções PBS com $[Cl^-] = 70 \text{ mM}$ foram eletrolisadas na célula de compartimento único, $I = 0,45 \text{ A}$.

Fator de diluição	[HOCl] na suspensão de células (μM)	Viabilidade (%)
0,5	24,7	0
0,25	14,0	0
0,1	4,27	72
0,02	0,72	100
0,01	0,42	100

Por sua vez, a adição de PBS eletrolisado diluído num fator de diluição de 0,1 e correspondente a uma concentração de HOCl de aproximadamente 4 μM , provoca uma perda de viabilidade gradual até um tempo de incubação de 15 minutos, havendo uma estabilização da sobrevivência a partir deste ponto (**Figura 3.16**), indicando uma adaptação das células ao ambiente de stresse. Resultados semelhantes foram obtidos, quando o HOCl adicionado à suspensão de células foi proveniente de uma eletrólise de 30 segundos, mostrando mais uma vez a reprodutibilidade dos resultados. Para as viabilidades obtidas para este tempo de eletrólise não foi possível fazer o tratamento estatístico, devido à falta de réplicas, e por isso a curva aparenta a subida de viabilidade, quando provavelmente é constante, devido à ausência de um número médio para a estabilização da viabilidade. Por sua vez, e como esperado, as células que não foram sujeitas ao tratamento com o HOCl mostraram uma viabilidade constante durante os 60 min de incubação.

Também foram aplicados fatores de diluição de 0,02 e 0,01 ao PBS eletrolisado até um tempo de 95 segundos, de modo a obter concentrações muito baixas de HOCl na suspensão de células. De acordo com a **Tabela 3.10**, é possível constatar que o HOCl na suspensão de células não é citotóxico para as concentrações de 0,4 μM e 0,7 μM , pois não ocorre perda de viabilidade para todos os tempos de incubação testados.

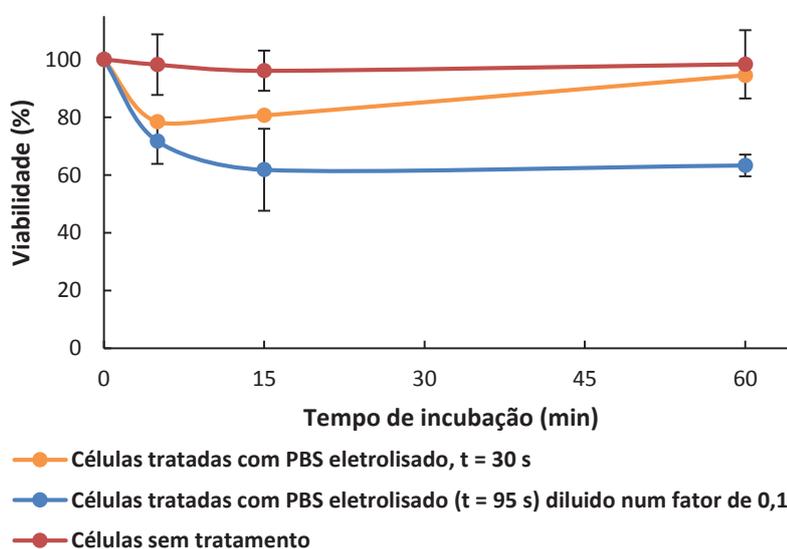


Figura 3.16 – Efeito do HOCl presente na solução de PBS eletrolisado ($I = 0,45 \text{ A}$, $[\text{Cl}^-] = 70 \text{ mM}$, $t = 95 \text{ s}$) diluída num fator de diluição de 0,1 e do PBS eletrolisado para um tempo de eletrólise de 30 s, na viabilidade das células, para diferentes tempos de incubação. A viabilidade foi calculada tomando como referência o tempo de incubação com PBS eletrolisado para $t = 0$. Os dados representados correspondem à média \pm o desvio padrão de três experiências independentes.

Como foi possível observar, a partir dos ensaios de viabilidade, o HOCl tem um forte efeito citotóxico, sugerindo um choque oxidativo, já que ele é um oxidante potente. Assim, de modo a investigar se o ácido hipocloroso influencia a oxidação intracelular, foram realizadas experiências em que as células foram expostas a PBS eletrolisado diluído num fator de diluição de 0,1 e incubadas durante 1 e 3 min, usando o diacetato de diclorofluoresceína (H₂DCFDA) como sonda. Esta substância é lipofílica, e por isso, é capaz de se difundir livremente através da membrana plasmática para o interior das células, onde é desacetilada para obtenção da diclorofluoresceína (H₂DCF), por ação de esterases intracelulares. A forma H₂DCF é hidrofílica, não podendo permear a membrana, e por isso permanece presa no interior das células. Na presença de oxidantes, o composto H₂DCF oxida e torna-se fluorescente.

Como é possível observar na **Figura 3.17**, o HOCl induz um deslocamento para valores mais altos de fluorescência, indicando um aumento da oxidação intracelular, em comparação com as células não tratadas. Observa-se também que quanto maior o tempo de exposição maior é a oxidação.

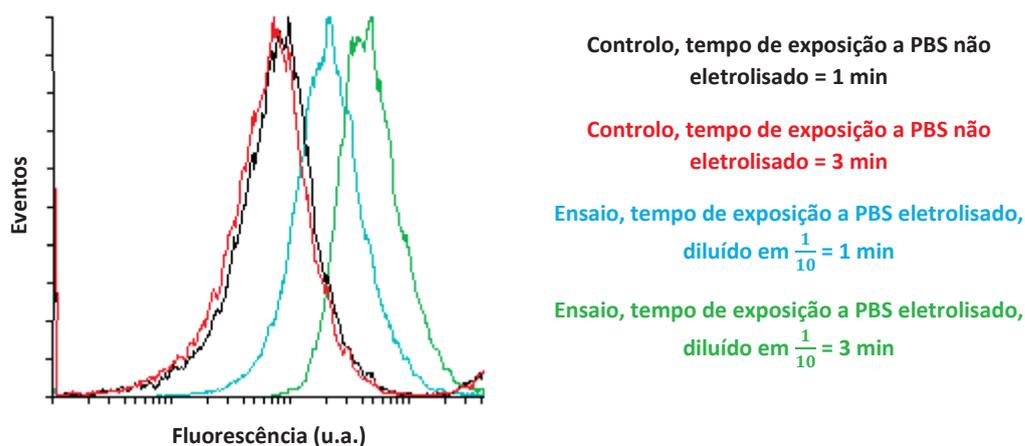


Figura 3.17 - Oxidação intracelular de células *S. Cerevisiae* expostas a HOCl. Células carregadas com H₂DCFDA foram incubadas com PBS eletrolisado diluído num fator de diluição de 0,1 durante 1 e 3 minutos e subsequentemente a fluorescência intracelular foi medida. A solução de PBS, [Cl⁻] = 70 mM foi eletrolisada durante 95 segundos numa célula de compartimento único, a I = 0,45 A e diluída de seguida num fator de diluição de 0,1. Os dados são representativos de três experiências independentes.

Nestes ensaios foi possível observar que o HOCl afeta as funções celulares, uma vez que diminui fortemente a sobrevivência das leveduras, numa ampla gama de concentrações, não tendo sido possível obter um efeito de dose-resposta. Isto pode dever-se ao fato de o HOCl ser uma espécie altamente reativa sendo um potente agente de oxidação e de cloração, podendo reagir com uma variedade de componentes biológicos, nomeadamente com proteínas,

carboidratos, nucleótidos, lípidos e também com compostos inorgânicos⁵⁰ (**Esquema 1.2**). Isto é corroborado pela citometria que indica que o HOCl provoca oxidação intracelular.

Como já foi referido na secção 1.6.2, a reação com os componentes celulares, dá origem a espécies reativas de oxigénio e de nitrogénio, sendo por isso um precursor de radicais livres, provocando um stresse oxidativo letal para a célula, o que pode explicar os resultados de extensa morte celular observados para as várias gamas de concentrações testadas. Já para concentrações menos letais, a viabilidade mantém-se constante a partir do tempo de incubação de 15 min, e isto pode dever-se à eliminação do HOCl talvez devido à sua reação com os componentes celulares, que leva à formação de produtos reativos, como foi mencionado, que por sua vez são eliminados pelas defesas antioxidantes da levedura, ainda eficazes para a concentração presente na suspensão.

Outras espécies oxidantes, particularmente o peróxido de hidrogénio, são conhecidas por também afetarem a viabilidade celular e as suas funções. No entanto, parecem existir diferenças significativas entre os vários sistemas oxidantes. Quando comparados os resultados de viabilidade do HOCl neste trabalho, com os resultados obtidos por Azevedo *et al.* em relação ao peróxido de hidrogénio, observa-se que a quantidade de HOCl necessária para a toxicidade é nitidamente mais baixa do que a concentração de H₂O₂, uma vez que são usadas concentrações de 5 mM e 10 mM deste oxidante para provocar a diminuição da viabilidade em 40 % ao fim de 20 minutos de incubação⁷³. Isto pode refletir a falta de um sistema eliminador enzimático para o HOCl, ou, alternativamente, a sua maior capacidade de reação com alvos celulares específicos, que leva à formação de radicais livres, provocando stresse oxidativo, como já foi discutido anteriormente.

Por sua vez, a constante de velocidade da reação do Fe²⁺ com o HOCl é três ordens de magnitude maior do que a reação do Fe²⁺ com o H₂O₂ (reação de *Fenton*), o que pode também explicar a maior citotoxicidade do ácido hipocloroso em relação ao peróxido de hidrogénio^{74,75}.

Outra consideração importante é que o HOCl parece provocar a perda irreversível da glutatona intracelular (GSH), com a formação de novos produtos, sendo que a GSH pode presumivelmente ser substituída apenas por nova síntese. Por isso, os mecanismos de reparação vão ser menos eficazes quando comparados com oxidantes, tais como o H₂O₂, já que a reação deste oxidante com a GSH é transitória. Este efeito do HOCl traz consequências importantes para a manutenção do estado redox da célula⁷⁶.

Capítulo 4

Conclusões

4 Conclusões

O estudo da eficiência do tratamento eletroquímico de tumores, EChT, realizado através da aplicação de uma corrente elétrica entre dois eletrodos introduzidos nos tecidos de animais tem atraído cientistas de diferentes áreas de conhecimento.

Neste trabalho, foi usada uma metodologia baseada em eletrólises galvanostáticas para analisar as condições de formação de HOCl, em condições semelhantes às usadas nos EChT. O HOCl é uma das espécies que se forma durante as eletrólises e apresenta toxicidade elevada para as células.

De forma a quantificar o HOCl foi testado um método espectrofotométrico baseado na reação desta espécie com a curcumina. Este método foi otimizado de modo a permitir avaliar a produção de HOCl nas condições em que este estudo foi realizado.

Os efeitos da concentração de íão cloreto e da intensidade de corrente foram estudados em eletrólises efetuadas numa célula de compartimento único e de dois compartimentos, de modo a avaliar o efeito da distância entre os eletrodos. Enquanto que nas eletrólises realizadas na célula de dois compartimentos ocorreu a acidificação no compartimento anódico e a alcalinização no compartimento catódico, nas eletrólises realizadas na célula de compartimento único verificou-se uma alcalinização. Este resultado mostrou ser determinante para a extensão em que o HOCl é formado.

A acidificação no compartimento anódico que ocorre gradualmente devido à oxidação da água resulta numa diminuição da quantidade de HOCl produzido. Assim, a realização de eletrólises longas ou usando intensidades de corrente muito elevadas não se traduz numa eficiência acrescida em termos da quantidade de HOCl produzido. A importância do efeito da acidificação é grande e está na origem da menor eficiência dos resultados obtidos na célula de dois compartimentos face à de um compartimento. Nesta célula, devido à alcalinização observada, que resulta na produção de maior quantidade de OH^- (no cátodo) comparativamente à de H^+ (no ânodo), verifica-se um aumento contínuo da quantidade de HOCl ao longo do tempo de eletrólise. As quantidades produzidas tendem a ser superiores quando a concentração de Cl^- ou a intensidade de corrente é mais elevada.

A ação do HOCl produzido eletroquimicamente foi testada usando leveduras como modelos celulares. O HOCl produzido por eletrólise mostrou ter efeitos citotóxicos associados à oxidação intracelular das leveduras. Esta conclusão resultou de estudos de viabilidade celular e de citometria de fluxo realizados usando *Saccharomyces Cerevisiae*.

Como as doses requeridas para se verificarem os efeitos são muito baixas, não foi possível obter um efeito dose-resposta.

Este trabalho constituiu a primeira etapa de um estudo analítico que pretende comprovar o envolvimento do HOCl no EChT, e contribuir para a otimização dos parâmetros experimentais usados neste tratamento de modo a aumentar a eficiência do mesmo.

Na continuidade deste trabalho, seria interessante identificar quais os principais alvos celulares de reação do HOCl, quais os produtos formados e a sua ação nas células e também envolver o estudo de outras variáveis experimentais na viabilidade das células, como por exemplo a corrente elétrica, pH e o material de eletrodo.

Capítulo 5

Referências Bibliográficas

5 Bibliografia

1. Elisangela G. Narrativas do Cancro : Uma Análise Autobiográfica. *Diss Mestr em Psicol Espec em Clínica, Inst Super Psicol Apl.* 2013:1-154.
2. Corrie PG. Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. *Medicine (Baltimore).* 2008;36(1):24-28.
3. Robinson MH. Radiotherapy : technical aspects. *Medicine (Baltimore).* 2007;36(1):9-14.
4. American Society of Clinical Oncology. Side effects of radiation therapy. <http://www.cancer.net/all-about-cancer/cancernet-feature-articles/treatments-tests-and-procedures/side-effects-radiation-therapy>. Accessed November 17, 2015.
5. Ann-Christine Moenaert. NON-CONVENTIONAL CANCER THERAPIES. *Anticancer Fund.* 2013:1-13.
6. Pandit S V. Alternating current for defibrillation therapy: Time for reconsideration? *Hear Rhythm.* 2013;10(5):749-750.
7. Antal A, Paulus W. Transcranial alternating current stimulation (tACS). *Front Hum Neurosci.* 2013;7:1-4.
8. Stupp R, Wong ET, Kanner AA, et al. NovoTTF-100A versus physician's choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: A randomised phase III trial of a novel treatment modality. *Eur J Cancer.* 2012;48:2192-2202.
9. Kirson ED, Gurvich Z, Schneiderman R, et al. Disruption of Cancer Cell Replication by Alternating Electric Fields. *Cancer Res.* 2004;64:3288-3295.
10. Nordenstrom B. Biologically Closed Electric Circuits: Activation of Vascular Interstitial Closed Electric Circuits for Treatment of Inoperable Cancers. *J Bioelectr.* 1984;3(1-2):137-154.
11. Hua-Ling W. Electrochemical therapy of 74 cases of liver cancer. *Eur J Surg Suppl.* 1994.
12. Xin Y, Xue F, Ge B, Zhao F, Shi B, Zhang W. Electrochemical Treatment of Lung Cancer. *Bioelectromagnetics.* 1997;18:8-13.
13. Xiaona X, Weiqun X. Experimental study of anti-tumor effect of electrochemical therapy alone or in combination with radiotherapy. *Chinese J Cancer Res.* 1995;7(4):305-307.
14. Olaiz N, Maglietti F, Suárez C, et al. Electrochemical treatment of tumors using a one-probe two-electrode device. *Electrochim Acta.* 2010;55:6010-6014.
15. Ciria HMC, González MM, Zamora LO, et al. Antitumor effects of electrochemical treatment. *Chin J Cancer Res.* 2013;25(2):223-234.
16. Yen Y, Li JR, Zhou BS, Rojas F, Yu J, Chou CK. Electrochemical treatment of human KB cells in vitro. *Bioelectromagnetics.* 1999;20:34-41.
17. Chou CK, McDougall J a, Ahn C, Vora N. Electrochemical treatment of mouse and rat fibrosarcomas with direct current. *Bioelectromagnetics.* 1997;18(1):14-24.
18. Nilsson E, Euler H Von, Berendson J, et al. Electrochemical treatment of tumours. *Bioelectrochemistry.* 2000;51:1-11.

19. Li JH, Xin YL, Zhang W, Liu JT, Quan KH. Effect of electro-acupuncture in treating patients with lingual hemangioma. *Chin J Integr Med*. 2006;12(2):146-149.
20. Jarque M, Mateus M, Jing-Hong L. Primeras experiencias clínicas en Cuba sobre el uso de la electroterapia en cuatro pacientes con tumores sólidos malignos superficiales. *Medisan*. 2007;11:1-13.
21. Mayer HP, Zangos S, Selby JB, Mayer FB, Vogl TJ, Ackermann H. Prostate Cancer : MR Imaging – guided Galvanotherapy — Technical Development and First Clinical Results. *Radiology*. 2007;245(3):895-902.
22. Wójcicki M, Drożdżik M, Olewniczak S, et al. Antitumor effect of electrochemical therapy on transplantable mouse cancers. 2000;6(3):498-502.
23. Bruzón R, Quevedo M, Cabrales LB, et al. Electrochemical Treatment of Mouse Ehrlich Tumor With Direct Electric Current. 2001;322:316-322.
24. Ciria HC, Quevedo MS, Cabrales LB, et al. Antitumor effectiveness of different amounts of electrical charge in Ehrlich and fibrosarcoma Sa-37 tumors. *BMC Cancer*. 2004;4:87.
25. Ren R, Vora N, Yang F, et al. Variations of Dose and Electrode Spacing for Rat Breast Cancer Electrochemical Treatment. *Bioelectromagnetics*. 2001;211.
26. von Euler H, Strähle K, Thörne A, Yongqing G. Cell proliferation and apoptosis in rat mammary cancer after electrochemical treatment (EChT). *Bioelectrochemistry*. 2004;62(1):57-65.
27. Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Finch GJ, Hall PDLM, Maddern GJ. Electrolytic ablation as an adjunct to liver resection: experimental studies of predictability and safety. *Br J Surg*. 2002;89(5):579-585.
28. Mikhailovskaya a. a., Kaplan M a., Brodskij R a., Bandurko LN. Evaluation of Antitumor Efficiency of Electrochemical Lysis on the Model of M-1 Sarcoma. *Bull Exp Biol Med*. 2009;147(1):91-93.
29. Czymek R, Dinter D, Löffler S, et al. Electrochemical treatment: An investigation of dose-response relationships using an isolated liver perfusion model. *Saudi J Gastroenterol*. 2011;17(5):335-342.
30. Kurokawa M, Sakagami H, Kokubu F, Noda H, Takeda M, Adachi M. Induction of apoptotic cell death by direct-current treatment in human leukemic cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1997;123(7):370-376.
31. Veiga VF, Nimrichter L, Teixeira CA, et al. Exposure of Human Leukemic Cells to Direct Electric Current. 2005;42:61-74.
32. Veiga VF, Holandino C, Marcio L. Rodrigues, Capella MAM, Menezes S, Alviano CS. Cellular Damage and Altered Carbohydrate Expression in P815 Tumor Cells Induced by Direct Electric Current : An InVitro Analysis. 2000;21:597-607.
33. Holandino C, Veiga F, Rodrigues ML, Morales MM, Capella MAM, Alviano CS. Direct Current Decreases Cell Viability but not P-Glycoprotein Expression and Function in Human Multidrug Resistant Leukemic Cells. 2001;22:470-478.
34. David SL, Absolom DR, Smith CR, Gams J, Herbert MA. Effect of Low Level Direct Current on in Vivo Tumor Growth in Hamsters Effect of Low Level Direct Current on in Vivo Tumor Growth in Hamsters1. 1985:5625-5631.

35. Turler A, Schaefer H, Schaefer N, et al. Experimental Low-Level Direct Current Therapy in Liver Metastases : Influence of Polarity and Current Dose. 2000;401(February 1999):395-401.
36. Griffin DT, Dodd NJ, Zhao S, Pullan BR, Moore J V. Low-level direct electrical current therapy for hepatic metastases. I. Preclinical studies on normal liver. *Br J Cancer*. 1995;72(1):31-34.
37. Vijh AK. Phenomenology and Mechanisms of Electrochemical Treatment (ECT) of Tumors. *Mod Asp Electrochem*. 2006;(39):231-274.
38. Kotnik T, Miklavcic D. Theoretical evaluation of voltage inducement on internal membranes of biological cells exposed to electric fields. *Biophys J*. 2006;90(2):480-491.
39. Samuelsson L, Olin T, Berg NO. Electrolytic destruction of lung tissue in the rabbit. *Acta Radiol Diagn*. 1980;21(4):447-454.
40. Nilsson E, Berendson J, Fontes E. Impact of chlorine and acidification in the electrochemical treatment of tumours. *J Appl Electrochem*. 2000;30:1321-1333.
41. Schroepfel E a, Kroll K, Damon MC, Kroll A a H. Direct current ablation destroys multi-stage fibrosarcomas in rats. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2009;2009:3099-3104.
42. McLaughlin S, Poo MM. The role of electro-osmosis in the electric-field-induced movement of charged macromolecules on the surfaces of cells. *Biophys J*. 1981;34(1):85-93.
43. Sersa G, Kryianowski M, Novakovic S, Bobanovi F. Tumor treatment by direct electric current-tumor temperature and pH , electrode material and configuration. 1993;30:209-220.
44. Li K, Xin Y, Gu Y, Xu B, Fan D, Ni B. Effects of direct current on dog liver: possible mechanisms for tumor electrochemical treatment. *Bioelectromagnetics*. 1997;18(1):2-7.
45. Turler a, Schaefer H, Schaefer N, et al. Local treatment of hepatic metastases with low-level direct electric current: experimental results. *Scand J Gastroenterol*. 2000;35(12):322-328.
46. Oji C, Ani J. Destruction of an advanced malignant tumour by direct electrical current-case report. *Health (Irvine Calif)*. 2010;02(09):1049-1053.
47. von Euler H, Olsson JM, Yongqing G. Cellular toxicity induced by different pH levels on the R3230AC rat mammary tumour cell line . An in vitro model for investigation of the tumour destructive properties of electrochemical treatment of tumours. 2002;58:163-170.
48. Avramov Ivić ML, Petrović SD, Živković PM, Nikolić ND, Popov KI. An electrochemical illustration of the mathematical modelling of chlorine impact and acidification in electrochemical tumour treatment and its application on an agar-agar gel system. *J Electroanal Chem*. 2003;549:129-135.
49. Pullar JM, Vissers MCM, Winterbourn CC. Living with a Killer : The Effects of Hypochlorous Acid on Mammalian Cells. 2000;50:259-266.
50. Panasenko OM, Gorudko I V, Sokolov a V. Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems. *Biochem Biokhimiia*. 2013;78(13):1466-1489.
51. Carmona-Gutierrez D, Alavian-Ghavanini A, Habernig L, et al. The cell death protease

- Kex1p is essential for hypochlorite-induced apoptosis in yeast. *Cell Cycle*. 2013;12(11):1704-1712.
52. Pattison DI, Hawkins CL, Davies MJ. Hypochlorous acid-mediated oxidation of lipid components and antioxidants present in low-density lipoproteins: absolute rate constants, product analysis, and computational modeling. *Chem Res Toxicol*. 2003;16(4):439-449.
 53. Spickett CM, Jerlich A, Panasencko OM, et al. The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase, with lipids. *Acta Biochim Pol*. 2000;47(4):889-899.
 54. Dever G, Wainwright CL, Kennedy S, Spickett CM. Fatty acid and phospholipid chlorohydrins cause cell stress and endothelial adhesion. *Acta Biochim Pol*. 2006;53(4):761-768.
 55. Panasencko OM. The mechanism of the hypochlorite-induced lipid peroxidation. *BioFactors*. 1997;6(2):181-190.
 56. Marques F, Azevedo F, Johansson B, Oliveira R. Stimulation of DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae* by Ginkgo biloba leaf extract. *Food Chem Toxicol*. 2011;49(6):1361-1366.
 57. Vissers MCM, Pullar JM, Hampton MB. Hypochlorous acid causes caspase activation and apoptosis or growth arrest in human endothelial cells. 1999;449:443-449.
 58. Schraufstatter IU, Browne K, Harris A, et al. Mechanisms of hypochlorite injury of target cells. *J Clin Invest*. 1990;85(February):554-562.
 59. Englert RP, Shacter E. Distinct modes of cell death induced by different reactive oxygen species: amino acyl chloramines mediate hypochlorous acid-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2002;277(23):20518-20526.
 60. Wagner B a, Britigan BE, Reszka KJ, McCormick ML, Burns CP. Hydrogen peroxide-induced apoptosis of HL-60 human leukemia cells is mediated by the oxidants hypochlorous acid and chloramines. *Arch Biochem Biophys*. 2002;401(2):223-234.
 61. Vile GF, Rothwell LA, Kettle AJ. Hypochlorous Acid Activates the Tumor Suppressor Protein p53 in Cultured Human Skin Fibroblasts. 1998;359(1):51-56.
 62. Vile GF, Rothwell L a, Kettle a J. Initiation of rapid, P53-dependent growth arrest in cultured human skin fibroblasts by reactive chlorine species. *Arch Biochem Biophys*. 2000;377(1):122-128.
 63. Chiang CL-L, Ledermann J a, Rad AN, Katz DR, Chain BM. Hypochlorous acid enhances immunogenicity and uptake of allogeneic ovarian tumor cells by dendritic cells to cross-prime tumor-specific T cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2006;55(11):1384-1395.
 64. Chiang CL-L, Ledermann J a, Aitkens E, Benjamin E, Katz DR, Chain BM. Oxidation of ovarian epithelial cancer cells by hypochlorous acid enhances immunogenicity and stimulates T cells that recognize autologous primary tumor. *Clin Cancer Res*. 2008;14(15):4898-4907.
 65. Yang YT, Whiteman M, Giese SP. HOCl causes necrotic cell death in human monocyte derived macrophages through calcium dependent calpain activation. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1823(2):420-429.
 66. Kim H, Kim D-J, Karthick SN, Hemalatha K V, Raj CJ. Curcumin Dye Extracted from

- Curcuma longa L . Used as Sensitizers for Efficient Dye-Sensitized Solar Cells. *Int J Electrochem Sci.* 2013;8:8320-8328.
67. Li K, Li Y, Yang L, Wang L, Ye B. The electrochemical characterization of curcumin and its selective detection in Curcuma using a graphene-modified electrode. *Anal Methods.* 2014;6:7801-7808.
 68. Yue Y, Yin C, Huo F, Chao J, Zhang Y. The application of natural drug-curcumin in the detection hypochlorous acid of real sample and its bioimaging. *Sensors Actuators B Chem.* 2014;202:551-556.
 69. Anantaraman a. V, Gardner CL. Studies on ion-exchange membranes. Part 1. Effect of humidity on the conductivity of Nafion®. *J Electroanal Chem.* 1996;414:115-120.
 70. Wang YJ, Pan MH, Cheng AL, et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J Pharm Biomed Anal.* 1997;15(12):1867-1876.
 71. Vijnh AK. Electrochemical treatment (ECT) of cancerous tumours: necrosis involving hydrogen cavitation, chlorine bleaching, pH changes, electroosmosis. *Int J Hydrogen Energy.* 2004;29:663-665.
 72. Matuo R, Sousa FG, Soares DG, et al. Saccharomyces cerevisiae as a model system to study the response to anticancer agents. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2012;70:491-502.
 73. Azevedo F, Marques F, Fokt H, Oliveira R, Johansson B. Measuring oxidative DNA damage and DNA repair using the yeast comet assay. *Yeast.* 2011;2:55-61.
 74. Candeias LP, Stratford MR, Wardman P. Formation of hydroxyl radicals on reaction of hypochlorous acid with ferrocyanide, a model iron(II) complex. *Free Radic Res.* 1994;20(4):241-249.
 75. Folkes LK, Candeias LP, Wardman P. Kinetics and mechanisms of hypochlorous acid reactions. *Arch Biochem Biophys.* 1995;323(1):120-126.
 76. Pullar JM, Vissers MC, Winterbourn CC. Glutathione oxidation by hypochlorous acid in endothelial cells produces glutathione sulfonamide as a major product but not glutathione disulfide. *J Biol Chem.* 2001;276(25):22120-22125.

