



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA - IQB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA – PPGQB
LABORATÓRIO DE ELETROQUÍMICA**

**ESTUDOS BIOELETROQUÍMICOS E ELETROANALÍTICOS
DA DIOSPIRINA: AGENTE LEISHMANICIDA E
ANTITUMORAL**

Dissertação de Mestrado

Cicero de Oliveira Costa

Maceió – AL

Julho de 2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA - IQB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA – PPGQB
LABORATÓRIO DE ELETROQUÍMICA**

**ESTUDOS BIOELETROQUÍMICOS E ELETROANALÍTICOS
DA DIOSPIRINA: AGENTE LEISHMANICIDA E
ANTITUMORAL**

Cícero de Oliveira Costa

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Marília O. F. Goulart

Maceió - AL
Julho de 2006



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

Instituto de Química e Biotecnologia
Universidade Federal de Alagoas
Tel. 55 82 214-1384 Fax. 55 82 214-1389
www.cpgqb@qui.ufal.br

Campus A. C. Simões
Tabuleiro dos Martins
57072-970
Maceió-AL
Brasil

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de **Cícero de Oliveira Costa**, intitulada: "Estudos Bioeletroquímicos e Eletroanalíticos da Diospirina: Agente Leishmanicida e Antitumoral", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 31 de julho de 2006, às 14h30min na sala de Multimeios do Bloco 14 da UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a. Dr^a. Marília Oliveira Fonseca Goulart
Orientadora – IQB/UFAL
CPF: 144.766.304-72

Prof. Dr. Valberes Bernardo do Nascimento
DQ/UFRPE
CPF: 175.086.494-00

Prof^a. Dr^a. Simoni Margareti Plentz Meneghetti
IQB/UFAL
CPF: 406.980.760-87

A todos, pelo apoio dado durante a
elaboração deste trabalho.

Este trabalho contou com o apoio financeiro das seguintes instituições:

Universidade Federal de Alagoas;
UNICAMP; CAPES; CNPq; FAPEAL;
PADCT; BNB e CTPETRO
a todas, o meu muito obrigado.

Agradecimentos

- a Deus, por ser meu guia e sempre iluminar meu caminho;
- a minha querida mãe, Sra. Josefa de Oliveira Queiroz, pelo amor e incentivo oferecidos durante toda a minha vida pessoal e acadêmica;
- a meus irmãos, Sebastião, Aparecido, Erivaldo e Vitória por todo o apoio oferecido ao longo desses anos;
- à professora Dra. Marília O.F. Goulart, pela orientação e amizade;
- ao professor Dr. Lauro Tatsuo Kubota pela orientação em Campinas/SP;
- à professora Dra. Fabiane Caxico de Abreu pelos ensinamentos, amizade e apoio oferecidos durante esse tempo;
- a meus professores, e em especial a Ana Góes e Cristina Caño, que contribuíram para a minha formação acadêmica;
- à professora Dra. Banasri Hazra, pelo envio da amostra de diospirina e por frutíferas discussões;
- a todos do laboratório de eletroquímica, em especial a Phabyanno e Paulo, que acompanharam de perto o desenvolvimento deste trabalho, agradeço pela amizade, conselhos, confiança, entre outras coisas, tenham sido elas boas ou ruins, que passamos durante esses anos;
- a meus amigos Danielle, Antonio, Écio, Aristides e Maycon pela amizade, confiança e pelas horas alegres vividas nesse período que nos conhecemos;

- a meus colegas Rita de Cássia e Flávio Damos pela boa recepção e ajuda durante o tempo em que fiquei na Unicamp;
- a todos os meus amigos, os de longe e os de perto, pelo companheirismo nessa longa caminhada;
- agradeço ao CNPq, à FAPEAL, ao PADCT, a CAPES, ao BNB e ao CT-PETRO pelo apoio financeiro, possibilitando assim a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS	X
GLOSSÁRIO	XIII
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. HIDROXIQUINONAS.....	2
1.1.1. <i>Diospirina</i>	3
1.1.1.1. <i>Conformação da Diospirina</i>	5
1.2. LEISHMANIOSE.....	6
1.3. ELETRODOS MODIFICADOS.....	9
1.3.1. <i>Biossensores de DNA</i>	12
2. OBJETIVOS	17
2.1. GERAIS.....	17
2.2. ESPECÍFICOS.....	17
3. METODOLOGIA	18
3.1. TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS.....	18
3.1.1. <i>Voltametria Cíclica (VC)</i>	18
3.1.2. <i>Voltametria de Onda Quadrada (VOQ)</i>	20
3.1.3. <i>Voltametria de Pulso Diferencial (VPD)</i>	22
3.2. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA E VISÍVEL (UV-VIS).....	23
3.3. EXPERIMENTAL.....	26
3.3.1. <i>Especificações das Substâncias Utilizadas e Preparo de Soluções</i>	26
3.3.1.1. <i>Diospirina e Extrato Bruto Clorofórmico da Planta <i>Diospyros montana</i> Roxb.</i>	26
3.3.1.2. <i>Especificações do dsDNA, Lisina, Ftalocianina Tetrassulfonada de Cobalto (CoTSPc) e Demais Reagentes</i>	27
3.3.1.3. <i>Preparo da Solução Tampão</i>	28
3.3.1.4. <i>Preparo da Solução de Diospirina (Solução Estoque)</i>	28
3.3.1.5. <i>Preparo da Solução do Extrato Clorofórmico da Planta <i>Diospyros montana</i> Roxb.</i>	29
3.3.1.6. <i>Preparo das Soluções de CoTSPc e PLL</i>	29
3.3.1.7. <i>Preparo da Solução de Zinco</i>	30
3.3.2. <i>Estudo Eletroquímico e Demais Análises</i>	30

3.3.2.1. Voltametria Cíclica	30
3.3.2.2. Voltametria de Onda Quadrada	31
3.3.2.3. Voltametria de Pulso Diferencial	32
3.3.2.3.1. Determinação da Diospirina por VPD	32
3.3.2.4. Análise Espectroscópica	32
3.3.2.4.1. Variação do Tempo de Exposição da Diospirina à Luz	33
3.3.2.5. Eletrodos Modificados	33
3.3.2.5.1. Preparo do Eletrodo Modificado com DNA	33
3.3.2.5.1.1. Preparo do Gel de DNA	34
3.3.2.5.1.2. Preparo do Biossensor de dsDNA e Estudo Eletroquímico da Diospirina com o Biossensor	34
3.3.2.5.2. Eletrodos Modificados com Complexos Metálicos	35
3.3.2.5.2.1. Preparo do Eletrodo Modificado com Complexo de Ftalocianina Tetrassulfonada de Cobalto (CoTSPc) e Lisina	36
3.3.2.5.2.2. Estudo da Redução Eletrocatalítica da Diospirina no Eletrodo Modificado	36
3.3.2.5.2.3. Estudo da Influência das Concentrações de CoTSPc, PLL e Tampão Acetato e da Velocidade de Varredura e Amplitude de Potencial na Resposta do Sensor (Otimização)	37
3.3.2.5.2.4. Determinação da Diospirina em VPD Utilizando Eletrodo Modificado com CoTSPc/PLL sob Condições Otimizadas	37
3.3.2.5.2.5. Estudos da Aplicação do Sensor e de Adição e Recuperação do Analito no Extrato Bruto da Planta <i>Diospyros montana</i> Roxb.	38
3.3.2.6. Estudo da Interação da Diospirina com Zn ²⁺	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1. VOLTAMETRIA CÍCLICA	40
4.2. VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA	41
4.3. VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL	41
4.3.1. <i>Quantificação da Diospirina por VPD</i>	42
4.4. ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA	44
4.4.1. <i>Variação do Tempo de Exposição da Diospirina à Luz Ambiente</i>	45
4.5. ELETRODOS MODIFICADOS	46
4.5.1. <i>Estudo Eletroquímico da interação da Diospirina com DNA com o uso do biossensor de dsDNA (Eletrodos Modificados com DNA)</i>	46
4.5.2. <i>Eletrodos Modificados com Complexos Metálicos</i>	49
4.5.2.1. Estudo da Redução Eletrocatalítica da Diospirina no Eletrodo Modificado	49
4.5.2.2. Estudo da Influência das Concentrações de CoTSPc, PLL e Tampão Acetato e da Velocidade de Varredura e Amplitude de Potencial na Resposta do Sensor (Otimização)	51
4.5.2.3. Determinação da Diospirina em VPD Utilizando Eletrodo Modificado com CoTSPc/PLL sob Condições Otimizadas	53
4.5.2.4. Estudos da Aplicação do Sensor e de Adição e Recuperação do Analito no Extrato Bruto da Planta <i>Diospyros montana</i> Roxb.	56
4.6. ESTUDO ELETROQUÍMICO DA INTERAÇÃO DE DIOSPIRINA COM ZN ²⁺ EM VPD	57

5. CONCLUSÃO	60
6. PERSPECTIVAS.....	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
8. ATIVIDADES EXTRAS	70
9. PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS.....	71
10. ANEXOS	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diospirina.	3
Figura 2. <i>Diospyros montana</i> Roxb.	4
Figura 3. Conformação da diospirina em um cristal com destaque para as ligações de hidrogênio [Adaptado de HARRISSON e MUSGRAVE, 2004].	5
Figura 4. Ciclo de transmissão da Leishmaniose [Adaptado de CDC, 2006].	6
Figura 5. Mosquito do gênero <i>Lutzomyia</i> , transmissor da Leishmaniose.	7
Figura 6. Distribuição geográfica da Leishmaniose visceral: Nordeste da China, Índia, região do Oriente Médio, Sudeste da Europa (Bacia do Mediterrâneo), Nordeste e Leste Central da África, e Américas Central e do Sul (especialmente Brasil e Honduras) [Retirado de Leishmaniose, biolab/UFPE, 2005].	7
Figura 7. Agente quimioterápico usado contra a leishmaniose: Sodium stibogluconate [Retirado de WILLIAMS e LEMKE, 2002].	8
Figura 8. Ftalocianina: $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$, Ftalocianina Tetrassulfonada: $R_1 = R_2 = R_4 = H$ e $R_3 = SO_3^-$, M = Cobalto, Níquel, Ferro ou Cobre.	10
Figura 9. 7,7,8,8-Tetracianoquinodimetano (TCNQ).	11
Figura 10. DNA em dupla fita (double-strand-DNA).	12
Figura 11. Bases purínicas e pirimidínicas constituintes da molécula de DNA: Adenina (a) e Guanina (b), Citosina (c) e Timina (d).	13

Figura 12. Representação esquemática da adsorção do DNA na superfície de carbono. (a) e (b) DNA nativo e desnaturado, respectivamente; (c) DNA degradado [Adaptado de LA-SCALEA et al., 1999].	14
Figura 13. Voltamograma de pulso diferencial obtido com eletrodo de carbono vítreo modificado com DNA ($60 \mu\text{g mL}^{-1}$) em uma solução de tampão acetato 0,1 M de pH 4,5: 1° voltamograma do ssDNA (a) e dsDNA (c), 40° voltamograma do dsDNA (b) [Adaptado de DICULESCU et al., 2005].	15
Figura 14. Voltamograma cíclico para um sistema reversível, com destaque para os parâmetros mais importantes [Adaptado de GREEF et al., 1985].	19
Figura 15. VC mostrando diferentes velocidades de varredura (ν). A corrente aumenta com o aumento de ν [Adaptado de GREEF et al., 1985].	20
Figura 16. Esquema básico para a voltametria de onda quadrada [Adaptado de SOUZA et al., 2003].	21
Figura 17. Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada onde: 1) representa um processo redox de um sistema reversível e 2) de um sistema irreversível [Adaptado de SOUZA et al., 2003].	21
Figura 18. Esquema de aplicação de potenciais [voltametria de pulso normal – VPN (a) e voltametria de pulso diferencial – VPD (b)]; (c) Perfil corrente-potencial esquemático [Adaptado de BRETT et al., 1996].	23
Figura 19. Esquema de um espectrofotômetro de UV-VIS de arranjo de diodos [Retirado de www.shimadzu.com.br].	25
Figura 20. Espectro de absorção no UV da 5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona (plumbagina) em ciclohexano/clorofórmio/isopropanol (50:50:1, v/v/v) [Adaptado de PAIVA et al., 2002].	26

Figura 21. (a) Ftalocianina Tetrassulfonada de Cobalto (CoTSPc) e (b) Poli-L-Lisina.	27
Figura 22. Potenciostato Autolab utilizado na realização dos experimentos.....	30
Figura 23. Esquema dos eletrodos de trabalho, referência e auxiliar, respectivamente.....	31
Figura 24. Esquema da cela eletroquímica utilizada.....	31
Figura 25. Esquema da cela eletroquímica utilizada nas análises com biossensor de DNA.....	35
Figura 26. VC da diospirina, $c = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ($2,67 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$. Eletrólito suporte: DMSO/tampão acetato pH* 5,4 (1:1, v/v). Eletrodo de carbono vítreo.....	40
Figura 27. VOQ da diospirina, $c = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ($2,67 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), $f = 100 \text{ Hz}$. Eletrólito suporte: DMSO/tampão acetato pH* 5,4 (1:1, v/v). Eletrodo de carbono vítreo.....	41
Figura 28. VPD da diospirina, $c = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ($2,67 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$. Eletrólito suporte: DMSO/tampão acetato pH* 5,4 (1:1, v/v). Eletrodo de carbono vítreo.....	42
Figura 29. Gráfico da variação da concentração da diospirina em VPD.....	43
Figura 30. Curva analítica da diospirina para a corrente III em VPD.....	44
Figura 31. Espectro de absorção da diospirina em DMSO/tampão acetato (1:1, v/v) pH* 5,4.....	45

- Figura 32. Espectro de absorção da diospirina em relação ao tempo de exposição à luz ambiente.46
- Figura 33. Gráfico do comportamento eletroquímico do eletrodo de Cv limpo e modificado com DNA na presença e ausência de DMSO/tampão, em tampão acetato, pH 4,5.47
- Figura 34. Gráfico do comportamento eletroquímico do eletrodo de Cv limpo e modificado com DNA na presença e ausência de diospirina ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), em solução de tampão acetato, pH 4,5.48
- Figura 35. Voltamogramas cíclicos ($v = 0,02 \text{ V s}^{-1}$, $a = 0,01 \text{ V}$) realizados em tampão acetato + DMSO (1:1, v/v) pH* 5,4 para o eletrodo de carbono vítreo limpo na ausência (a) e presença (c) de diospirina, eletrodo modificado apenas com PLL na presença de diospirina (d) e eletrodo modificado com CoTSPc/PLL na ausência (b) e presença de diospirina (e). [Diospirina] = $2,67 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 50
- Figura 36. (a) Corrente vs velocidade de varredura (v), com amplitude fixa (0,01 V). (b) Corrente vs amplitude de potencial, com a velocidade de varredura fixa ($0,035 \text{ V s}^{-1}$). Eletrodo modificado com CoTSPc/PLL sob condições otimizadas.53
- Figura 37. Variação da concentração de diospirina em VPD sob condições otimizadas para o preparo do sensor para diospirina: (1) 1,0; (2) 6,76; (3) 10,4; (4) 17,4; (5) 23,8; (6) 35,4; (7) 50,2; (8) 73,0; (9) 103,0 e (10) 120,0 nmol L⁻¹. Velocidade de varredura = $0,035 \text{ V s}^{-1}$ e amplitude de potencial = 0,090 V. .54
- Figura 38. Curva analítica obtida por VPD para determinação de diospirina com eletrodo modificado com CoTSPc/PLL sob condições otimizadas nas concentrações descritas na Figura 37.55

- Figura 39. Resposta relativa (%) em função do número de ciclos, em voltametria cíclica, analisadas sob as mesmas condições em que a curva analítica (Figura 38) foi confeccionada.56
- Figura 40. Análise em VPD da interação entre diospirina e Zn^{2+} , estabelecida através de adições de quantidades inferiores e superiores de diospirina em relação à de zinco presente em solução (Tabela 2), sem nenhuma mudança significativa observada no potencial de redução da diospirina.58
- Figura 41. Análise em VPD da interação entre diospirina e Zn^{2+} , estabelecida através de adições de quantidades inferiores e superiores de diospirina em relação à de zinco presente em solução (Tabela 2). Aumento atribuído à presença de tampão acetato (pH* 5,4) na solução de diospirina. $v = 0,035 \text{ V s}^{-1}$, $a = 0,09 \text{ V}$59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Cores da radiação visível [Adaptado de EWING, 1998].....	24
Tabela 2: Proporções relativas à adição de diospirina a 5,0 mL de solução aquosa de Zn ²⁺	39
Tabela 3: Influência da concentração de CoTSPc usada na preparação do filme, na densidade da corrente de pico obtida com o sensor para diospirina ($5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão acetato + DMSO (pH* 5,4) e PLL ($0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), $v = 0,02 \text{ V s}^{-1}$ e $a = 0,09 \text{ V s}^{-1}$	51
Tabela 4: Influência da concentração de PLL usada na preparação do filme, na densidade da corrente de pico obtida com o sensor para diospirina nas mesmas condições relatadas na Tabela 3, $[\text{CoTSPc}] = 0,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	52
Tabela 5: Influência da concentração do tampão acetato + DMSO (1:1, v/v) na densidade da corrente de pico obtida por VPD com o sensor para diospirina ($5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), $[\text{CoTSPc}] = 0,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{PLL}] = 0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $v = 0,02 \text{ V s}^{-1}$ e $a = 0,09 \text{ V s}^{-1}$	52
Tabela 6: Comparação entre LDs e LQs obtidos para a diospirina entre os métodos mais usuais e o método eletroanalítico desenvolvido.	57
Tabela 7: Adição e recuperação de diospirina em duas amostras do extrato bruto (n = 3) obtidas com o eletrodo modificado.	57

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

A = Ampère

μ A = Microampère

nA = Nanoampère

CLAE = Cromatografia Líquida de alta eficiência

CME = “Chemically Modified Electrode” (Eletrodo Quimicamente Modificado)

CoTSPc = Ftalocianina tetrassulfonada de cobalto

Cu(Phen)(TCNQ)₂ = Fenantrolina Tetracianoquinodimetano de Cobre

CuTSPc = Ftalocianina tetrassulfonada de cobre

Cv = Carbono vítreo

CV = “Cyclic voltammetry” (Voltametria Cíclica)

DMSO = Dimetilsulfóxido

DNA = “Deoxyribonucleic Acid” (Ácido desoxirribonucléico)

dsDNA = “Double-strand DNA” (DNA em dupla fita)

ssDNA = “Single-strand DNA” (DNA em fita simples)

DPV = “Differential Pulse Voltammetry” (Voltametria de Pulso Diferencial)

EAC = Ehrlich Ascites Carcinoma

E = Potencial

$E_{1/2}$ = Potencial de meia-onda

E_{pc} = Potencial de pico catódico

E_{pa} = Potencial de pico anódico

EQMs = Eletrodos quimicamente modificados

E^{OQ} = Amplitude da onda quadrada

ΔE = Altura do salto de potencial

f = Frequência

g = Grama

mg = Miligrama

μ g = Micrograma

ng = Nanograma

GC = “Glassy Carbon” (Carbono Vítreo)

HOAc = Ácido Acético

HPLC = “High Performance Liquid Chromatography” (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE)

HPTLC = “High Performance Thin-Layer Chromatography” (Cromatografia de Camada Delgada de Alta Eficiência)

Hz = Hertz

I = Corrente

I_{pa} = Corrente de pico anódica

I_{pc} = Corrente de pico catódica

IUPAC = “International Union of Pure and Applied Chemistry” (União Internacional de Química Pura e Aplicada)

j = Densidade de corrente

j_p = Densidade de corrente de pico

LD = Limite de detecção

LQ = Limite de quantificação

mm = Milímetro

nm = Nanômetro

MM = Massa molar

n = Número de elétrons

n = Número de análises

NaOAc = Acetato de sódio

OMS = Organização Mundial de Saúde

P.A. = Para análise

P.E. = Ponto de ebulição

P.F. = Ponto de fusão

pH = Potencial hidrogeniônico

pH* = Potencial hidrogeniônico aparente

pKa = O negativo do logaritmo da constante de acidez, K_a

PLL = Poli-L-Lisina

RPLC = “Reversed-Phase Liquid Chromatography” (Cromatografia Líquida de Fase Reversa)

ms = Milissegundo

s = segundo

SD = "Standard Deviation" (Desvio Padrão)

RSD = "Relative Standard Deviation" (Desvio Padrão Relativo)

SWV = "Square Wave Voltammetry" (Voltametria de Onda Quadrada)

TE-EO = Transferência eletrônica - estresse oxidativo

UV = Ultravioleta

UV-VIS = Ultravioleta-visível

V = Volt

mV = Milivolt

VC = Voltametria cíclica

VOQ = Voltametria de onda quadrada

VPD = Voltametria de pulso diferencial

VPN = Voltametria de pulso normal

v/v = Volume por volume

$W_{1/2}$ = Largura à meia altura da corrente de pico

ν = Velocidade de varredura de potencial

$\nu^{1/2}$ = Raiz quadrada da velocidade de varredura

α = Coeficiente de transferência eletrônica

τ = Período da onda quadrada (largura do salto)

°C = Graus centígrados

σ = Desvio padrão

GLOSSÁRIO

- **Amastigotas:** Células que não possuem flagelos. São encontradas nos vertebrados parasitando intracelularmente os macrófagos.
- **Apoptose:** Tipo de autodestruição celular que requer energia e síntese protéica para a sua execução.
- **Carcinoma:** Tumor maligno, derivado de células epiteliais que podem ocorrer em uma variedade de sítios, tais como pele, mama e fígado.
- **Carcinoma Ehrlich Ascites (EAC):** Tipo de câncer que se desenvolve no tecido Ascite (localizado na cavidade peritoneal), geralmente induzido em cobaias (ratos da família *muridae*) para o estudo do mesmo.
- **Catálise:** Mudança de velocidade de uma reação química devido à adição de uma substância (catalisador) em quantidades não estequiométricas, a qual não se transforma ao final da reação.
- **Endemia:** Doença que existe constantemente em um determinado lugar e acomete as pessoas que aí vivem.
- **Esplíceossomo:** Uma partícula de 50S a 60S (sub-unidades ribossômicas), contendo proteínas, snRNPs (pequenas ribonucleoproteínas nucleares) e pré-mRNA; ele promove as reações de processamento (*splicing*) na qual o pré-mRNA é convertido em m-RNA maduro.
- **Fagocitose:** Processo de alimentação de muitos protozoários unicelulares, que consiste no englobamento de partículas sólidas pela célula, através da membrana celular - a partícula é envolvida num vacúolo digestivo, a partir do qual a matéria digerida passa depois para o citoplasma.
- **Fagolisossomos:** Para a célula destruir bactérias invasoras, o fagossomo e o lisossomo se fundem, formando o fagolisossomo.
- **Flebótomo:** Gênero de mosquito ou díptero da família *phlebotomidae*, em que geralmente estão inclusos os mosquitos hematófagos.
- **Macrófagos:** Células de grandes dimensões do tecido conjuntivo que fagocitam elementos estranhos ao corpo.
- **Murino ou murídeo:** Mamíferos roedores da família *muridae* que são conhecidos popularmente pelo nome de ratos.

- **Neoplasia:** Termo que designa alterações celulares que acarretam em um crescimento exagerado destas células, resultando no desenvolvimento de um tumor.
- **Piezoelétrico:** Propriedade de alguns cristais que, quando não estão submetidos a grandes pressões são maus condutores de eletricidade, porém, quando se exerce uma pressão numa determinada direção do mineral este apresenta condutividade elétrica. Ex. Quartzo e a turmalina.
- **Promastigotas:** Células flageladas, que geralmente, são infectantes para os vertebrados, as quais são inoculadas juntamente com a saliva de alguns insetos por ocasião da alimentação destes.
- **Quinase:** Tipo de enzima que transfere grupos fosfatos de moléculas doadoras de alta energia, como as ATPs, para moléculas-alvo específicas (substrato); tal processo é denominado de fosforilação.
- **Replicação do DNA:** Processo no qual cada cadeia de DNA vai dar origem a duas novas cadeias iguais à que lhes deu origem através de um processo semi-conservativo.
- **Tegumento:** Aquilo que reveste externamente o corpo do homem e dos animais (a pele, as escamas, os pêlos, etc.).
- **Topoisomerases:** Enzimas que podem mudar o estado topológico do DNA através da quebra e rearranjo das suas fitas, afetando o número de ligação, ou seja, o número de voltas da hélice, num DNA circular fechado.
- **Transcrição Genética:** Processo de formação do mRNA a partir do DNA.
- **Vísceras:** Designação genérica de qualquer órgão alojado em uma das três cavidades: a craniana, a torácica e a abdominal.

RESUMO

A análise de princípios ativos oriundos de produtos naturais apresenta forte interesse em vista do aumento do consumo de ervas medicinais no mundo inteiro. Os compostos quinônicos são os responsáveis diretos pelas propriedades farmacológicas de várias plantas e nestes estudos farmacológicos e biológicos, mostraram variadas bioatividades, destacando-se, dentre muitas, as propriedades microbicidas, tripanossomicidas, viruscidas, antitumorais e inibidoras de sistemas celulares reparadores, processos nos quais atuam de diferentes formas. Dentre as quinonas, destaca-se a diospirina, extraída da casca do caule da planta *Diospyros montana* Roxb. Ela é uma bisnaftoquinona que possui importante atividade leishmaniscida e na inibição de células cancerígenas, por interação com topoisomerasas, que são enzimas imprescindíveis à replicação do DNA. Devido à importância da diospirina, produto natural, além do estudo farmacológico, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos simples e eficientes para a sua detecção, além da análise da sua provável interação com o DNA através do uso de biossensores. Este trabalho mostra o estudo eletroquímico da diospirina em meio prótico misto (DMSO/tampão acetato, 1:1 v/v, pH* 5,4), empregando Voltametria Cíclica (VC) e Voltametria de Onda Quadrada (VOQ), além de mostrar o desenvolvimento de um sensor para diospirina em concentrações nanomolares usando um eletrodo quimicamente modificado com ftalocianina tetrassulfonada de cobalto (CoTSPc) e poli-L-lisina (PLL), sua quantificação no extrato bruto da planta através do método de adição e recuperação e o estudo da interação da mesma com o DNA em Voltametria de Pulso Diferencial (VPD).

O voltamograma da diospirina indicou a presença de dois pares de ondas e, na sua quantificação, o eletrodo de carbono vítreo foi modificado com CoTSPc imobilizada em filme de PLL. Houve um aumento significativo na corrente de redução da diospirina, em eletrodo modificado com CoTSPc, no potencial de $-0,16$ V, em comparação com o eletrodo de carbono vítreo. A alta resposta observada com o eletrodo modificado pode estar associada ao efeito catalítico de CoTSPc sobre a reação de redução da diosporina. Este resultado proporcionou a detecção de diospirina em níveis nanomolares após a otimização de parâmetros como o efeito da concentração da CoTSPc ($0,6 \text{ mmol L}^{-1}$), de PLL ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$), do eletrólito de suporte ($0,15 \text{ mol L}^{-1}$) e estudos da velocidade de varredura ($0,035 \text{ V s}^{-1}$) e amplitude ($0,09 \text{ V}$). Os limites de detecção e quantificação foram respectivamente, $0,3 \text{ nmol L}^{-1}$ e $1,0 \text{ nmol L}^{-1}$. O sensor desenvolvido foi aplicado para a determinação de diospirina no extrato clorofórmico bruto da casca do caule da planta *D. montana* Roxb. e a taxa de recuperação para estas amostras foi de $101,9 (\pm 3,1)\%$. Observou-se a interação da diospirina com o DNA pela utilização do biossensor de dsDNA e observação de picos de oxidação nos potenciais correspondentes à oxidação das nucleobases guanina e adenina, após sua incubação com o analito.

ABSTRACT

Analysis of molecular constituents based on natural products has acquired an important perspective in view of the renewed interest in the consumption of herbal prescriptions all over the world. Natural quinonoid compounds possess significant pharmacological properties and are responsible for the bioactivities of several plants. They showed several bioactivities, mainly microbicidal, trypanocidal, virucidal and antitumoral, being also inhibitors of repair systems in cells. Among the quinones, diospyrin is relevant; it is extracted from the stem-bark of *Diospyros montana* Roxb. It is a bisnaphthoquinone that has significant leishmanicidal activity and in the cancer cells inhibition, by interaction with topoisomerases, enzymes responsible for DNA replication. Due to its importance, it is also necessary to develop simple and accurate methods for its detection, beyond analysis of probable DNA interaction through the use of biosensors. This work shows the electrochemical study of diospyrin in mixed (DMSO/acetate buffer solution, 1:1 v/v, pH* 5.4), using Cyclic Voltammetry (CV) and Square Wave Voltammetry (SWV). We also show the development of a diospyrin sensor in nanomolar concentrations using a chemically modified electrode with cobalt tetrasulphonate phthalocyanine (CoTSPc) and poly-L-lysine (PLL). The diospyrin quantification in plant crude extract was performed, using the described CME, through addition and recovery methods by using Differential Pulse Voltammetry (DPV), technique also used for the DNA interaction study.

The diospyrin voltammograms have showed two redox wave couples and, in its quantification, the glassy carbon electrode was modified with CoTSPc immobilized in PLL film. A significant increase was observed in the reduction current of diospyrin, in CoTSPc modified electrode, in a potential of 0.16 V, in comparison with GC bare electrode. The high-observed activity with modified GC electrode can be associated with the catalytic effect of CoTSPc over the reduction reaction of the diospyrin. These results allowed the diospyrin detection in nanomolar concentrations after parameters' optimization like CoTSPc (0.6 mmol L⁻¹), PLL (0.5 mmol L⁻¹) and acetate buffer concentrations (0.15 mol L⁻¹), the scan rate (0.035 V s⁻¹) and amplitude (0.09 V) studies. The limits of detection and quantification were 0.3 nmol L⁻¹ and 1.0 nmol L⁻¹, respectively. The developed sensor was used for diospyrin determination in a chloroformic crude extract of stem-bark of *D. montana* Roxb. and the recovery average for the samples was 101.9 (± 3.1)%. It was observed the diospyrin-DNA interaction through the use of a dsDNA biosensor and the observation of diagnostic oxidation peaks in potentials relative to the oxidation of guanine and adenine nucleobases, after incubation with the analyte.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Muitos dos mais importantes processos fisiológicos são baseados em cadeias oxirredutivas, envolvendo numerosas reações catalisadas por enzimas. Existe um conjunto de similaridades entre as reações biológicas e as eletroquímicas, em se tratando de processos de transferência eletrônica: a natureza heterogênea (interface eletrodo-solução, enzima-solução); os mesmos podem ocorrer tanto em meio aquoso quanto não-aquoso, em temperaturas similares e ambos requerem uma orientação específica [DE ABREU et al., 2002].

As quinonas representam uma ampla e variada família de metabólitos de distribuição natural, sendo alvo de diversos estudos farmacológicos que demonstraram uma variada biodinamicidade, destacando-se as propriedades microbicidas, tripanossomicidas, viruscidas, antitumorais e inibidoras de sistemas celulares reparadores, processos em que atuam de diferentes formas. Entre as atividades, a mais relevante se refere ao mecanismo de transferência eletrônica-estresse oxidativo (TE-EO), quando as mesmas, após redução e em presença de oxigênio, induzem a formação deletéria endógena de espécies reativas derivadas do oxigênio (1O_2 , $\cdot OH$, $O_2^{\cdot -}$ e H_2O_2). Este é o mecanismo de ação aceito no caso da atividade contra *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas. Uma outra atividade é a inibição do complexo das topoisomerasas, ação que provoca o desencadeamento da apoptose celular [DA SILVA, et al., 2003].

Evidências de ocorrência do estresse oxidativo podem ser obtidas via eletroquímica em meio aprótico, em presença de oxigênio. A escolha de solventes apróticos se justifica pelo fato dos mesmos serem melhores modelos para membranas, em sua porção lipofílica, onde ocorre o processo de peroxidação lipídica, assim como, pela propriedade das espécies oxigenadas reativas geradas serem mais estáveis nesse meio e instáveis em água ou outros solventes próticos [GOULART et al., 2003]. Estudos anteriores mostraram a importância da presença de grupos hidroxila na molécula original e que a velocidade de interação com o oxigênio aumenta à medida que o pKa decresce, sendo importante a obtenção desses parâmetros físico-químicos [BARREIRO e FRAGA, 2001; LONG e WALKER, 2003].

A alquilação biorredutiva é um dos mecanismos principais, sendo que a grande maioria dos agentes alquilantes empregados clinicamente comporta-se como armadilhas eletrofílicas para nucleófilos moleculares. Pró-drogas são normalmente empregadas e sua ativação ocorre normalmente através de processos redox; daí, elas expressam seu modo de ação somente após redução *in vivo*. A etapa de redução é fundamental e efeitos eletrônicos encontram-se envolvidos [RAJSKI e WILLIAMS, 1998].

O DNA e as enzimas, entre elas as topoisomerases, constituem endobióticos-alvo em química medicinal. Em relação ao DNA, acredita-se que a formação de ligações cruzadas entre as fitas represente o evento de maior toxicidade. As topoisomerases são enzimas mediadoras de mudanças topológicas no DNA e são essenciais na biossíntese de ácidos nucleicos e para a sobrevivência da célula [RAJSKI e WILLIAMS, 1998]. Estão presentes em protozoários patológicos como *Leishmania* e *Trypanosoma* e constituem alvos importantes para drogas antibacterianas e anti-tumorais. De maneira alternativa, a ação biológica sobre topoisomerases pode estar relacionada a complexação com íons Zn^{2+} presentes nos sítios ativos enzimáticos, tendo em vista que hidroxinaftoquinonas, através de seus grupos carbonila e fenólicos dispostos adequadamente, são quelantes efetivos de íons metálicos divalentes, daí a importância de estudos eletroanalíticos e espectroscópicos da interação das hidroxiquinonas com Zn^{2+} [PLYTA et al., 1998].

1.1. Hidroxiquinonas

As análises dos constituintes moleculares de medicamentos tradicionais baseados em produtos naturais adquiriram uma nova perspectiva em vista do interesse no consumo de ervas medicinais no mundo inteiro, tendo em vista que as plantas são as fontes principais de compostos orgânicos bioativos. Em vários desses medicamentos, os compostos quinônicos mostraram-se responsáveis pelas propriedades farmacológicas [HAZRA et al., 2004]. As quinonas constituem metabólitos secundários comuns e possuem papel essencial, principalmente na bioquímica da produção de energia, servem como elo vital no transporte de elétrons em virtude de sua capacidade de conduzir facilmente reações redox [POWIS, 1987].

Um considerável número de hidroxinaftoquinonas apresenta atividades antineoplásicas. A atividade biológica geralmente é realçada pelos valores menos negativos do potencial de meia onda ($E_{1/2}$) de tais quinonas [CRAWFORD et al., 1996], assim como pelo aumento da nucleofugacidade do grupo abandonador [WARDMAN, 2001]. A grande facilidade de redução das hidroxinaftoquinonas é atribuída, inicialmente, à aromatização do sistema nafto-hidroquinona, e adicionalmente, à ligação de hidrogênio intramolecular entre um grupo hidroxila e o oxigênio carbonílico vizinho, que se intensifica, após a redução. A ligação de hidrogênio reduz a densidade eletrônica no oxigênio, aumentando a natureza eletrofílica do sistema aromático e estabiliza o ânion radical semiquinônico formado após a transferência eletrônica [CRAWFORD et al., 1996].

1.1.1. Diospirina

Dentre as hidroxinaftoquinonas, a diospirina [2,6'-bis(5-hidroxi-7-metil-1,4-naftoquinona)] (**Figura 1**), uma bis-hidroxinaftoquinona produzida por algumas plantas, constituinte da casca do caule da planta *Diospyros montana* Roxb. (**Figura 2**), foi identificada como um inibidor tumoral [HAZRA et al., 1984]. Derivados semi-sintéticos da diospirina mostraram-se mais efetivos contra o Carcinoma Ehrlich Ascites (EAC), um modelo tumoral em murinos.

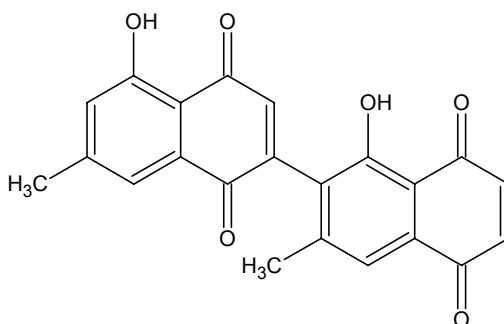


Figura 1. Diospirina.



Figura 2. *Diospyros montana* Roxb.

Alguns destes compostos possuem atividades antiparasitárias e antimicrobianas significativas [YARDLEY et al., 1996; LALL et al., 2003]. Vários derivados da diospirina são citotóxicos contra linhagens de células cancerígenas humanas, induzindo a morte celular por apoptose [CHAKABARTY et al., 2002]. Além disso, foi descoberto que a diospirina inibe a topoisomerase I do DNA do parasito *Leishmania donovani* em preferência às dos mamíferos [RAY et al., 1998].

Investigações foram realizadas em função da capacidade dos derivados da diospirina em antagonizar a influência da camptotecina na topoisomerase I e para inibir a atividade quinase da enzima [TAZI et al., 2005]. Relatou-se que alguns destes compostos foram capazes de inibir a recepção dinâmica de *spliceossomos*, indicando a possibilidade de usá-las na correção de anomalias em doenças genéticas humanas.

Devido à importância da diospirina, houve um maior interesse quanto à descoberta de novas técnicas de separação e análise de plantas de importância comercial para sua padronização em termos da quantificação dos princípios ativos principais [HAMBURGER e HOSTETTMANN, 2002; CARDELLINA, 2002].

No caso da diospirina e seus análogos, a separação foi padronizada pelo uso de RPLC com detecção em UV [SANYAL et al., 2003; HAZRA et al., 2004]. Entretanto, os métodos cromatográficos possuem custos relativamente elevados, devido à dificuldade da preparação da amostra, o qual limita a sua utilidade [RAVISHANKARA et al., 2000].

1.1.1.1. Conformação da Diospirina

A conectividade atômica da diospirina e sua conformação em estado sólido foi confirmada com base em dados espectroscópicos e de difração de raios-X. Os parâmetros geométricos são normais e o ângulo entre os planos dos dois sistemas anelares é de aproximadamente 60° . O empacotamento no cristal é influenciado por ligações de hidrogênio ($\text{OH}\cdots\text{O}$) (**Figura 3**) e possíveis interações mais fracas ($=\text{CH}\cdots\text{O}$) e $\pi - \pi$ [HARRISSON e MUSGRAVE, 2004].

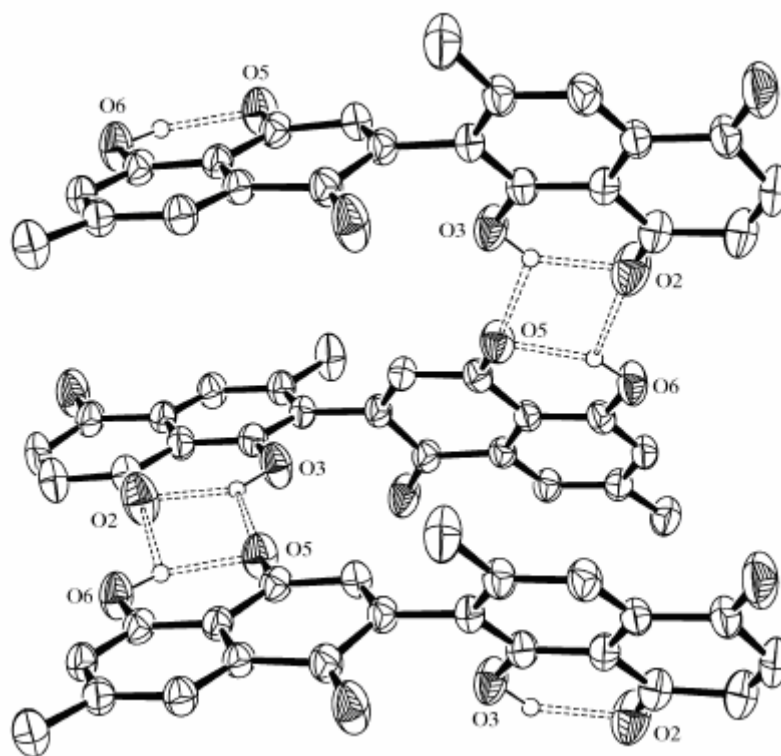


Figura 3. Conformação da diospirina em um cristal com destaque para as ligações de hidrogênio [Adaptado de HARRISSON e MUSGRAVE, 2004].

1.2. Leishmaniose

Protozoários do gênero *Leishmania* são responsáveis pela incidência de diversas doenças, abrangendo desde úlceras autocuráveis até infecções viscerais fatais em humanos. O parasito que causa a leishmaniose é transmitido pela picada do mosquito do gênero *Lutzomyia*, a qual inocula a forma promastigota do parasito (*Leishmania chagasi*) ao se alimentar com sangue do animal ou homem (1). Ao entrar no organismo, as formas promastigotas do parasito são fagocitados por macrófagos (2) transformando-se em amastigotas (3). Os amastigotas multiplicam-se em células infectadas afetando diferentes tecidos, o qual depende em parte da espécie de Leishmaniose (4). Os mosquitos sadios são infectados ao se alimentarem de sangue de hospedeiros do parasito ao ingerirem macrófagos infectados com amastigotas. No intestino do inseto, os parasitos diferenciam-se em promastigotas (7), que se multiplicam e migram para a tromba do mosquito (8) (Figura 4).

A transmissão do parasito se dá pela picada da fêmea do mosquito do gênero *Phlebotomus* (no velho mundo) ou do gênero *Lutzomyia* (no novo mundo) (Figura 5); sendo que o macho dessa espécie se alimenta apenas do néctar das plantas, enquanto que a fêmea se alimenta apenas do sangue de animais.

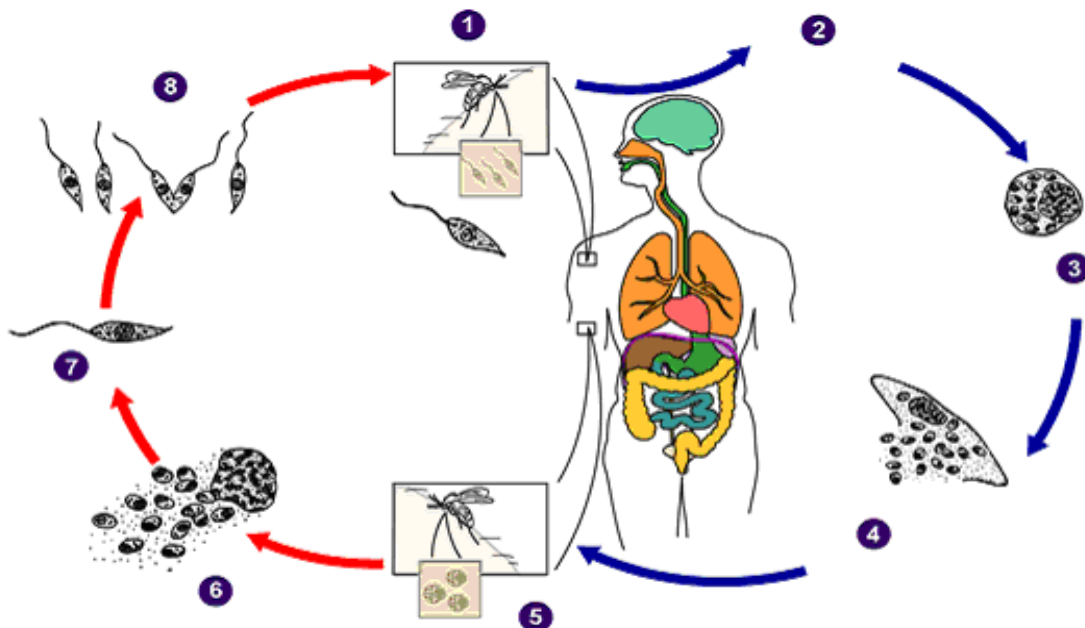


Figura 4. Ciclo de transmissão da Leishmaniose [Adaptado de CDC, 2006].



Figura 5. Mosquito do gênero *Lutzomyia*, transmissor da Leishmaniose.

São registrados anualmente em todo mundo (**Figura 6**), aproximadamente 2 milhões de novos casos de leishmaniose. A grande incidência de casos da doença, que provoca lesões desfigurantes (tegumentares) e às vezes fatais (viscerais) levaram a Organização Mundial de Saúde (OMS) a incluí-la entre as seis mais importantes endemias do mundo [Leishmaniose, biolab/UFPE, 2005].

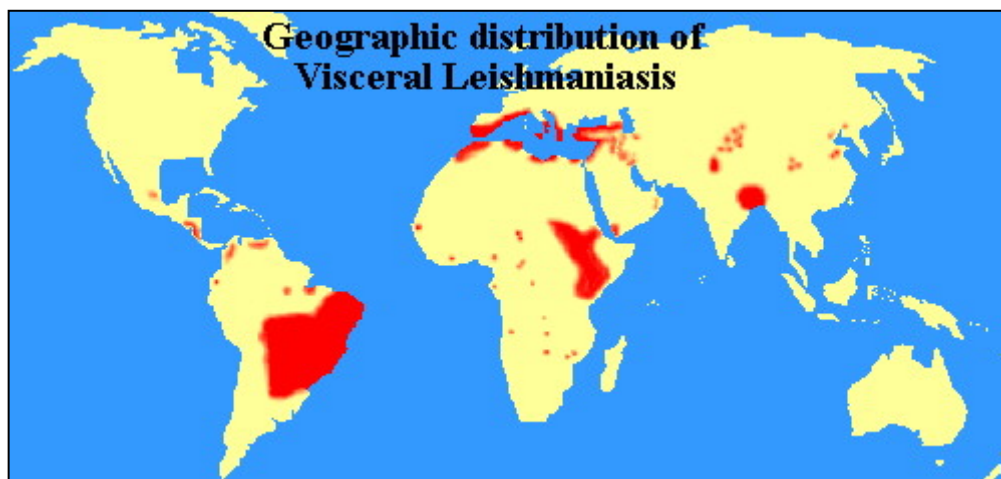


Figura 6. Distribuição geográfica da Leishmaniose visceral: Nordeste da China, Índia, região do Oriente Médio, Sudeste da Europa (Bacia do Mediterrâneo), Nordeste e Leste Central da África, e Américas Central e do Sul (especialmente Brasil e Honduras) [Retirado de Leishmaniose, biolab/UFPE, 2005].

Com base nos sintomas e manifestações clínicas causadas por várias espécies do gênero *Leishmania*, duas formas principais e distintas de leishmaniose humana são delineadas. A leishmaniose cutânea, caracterizada pela presença de lesões ulcerativas da pele, é causada por *Leishmania major*, *Leishmania tropica*, *Leishmania mexicana* e várias espécies e sub-espécies sul-americanas. As lesões são geralmente autocuráveis, embora algumas formas possam persistir e disseminar. A forma mais severa de uma variedade de doenças causadas por *Leishmania* é a leishmaniose visceral, também conhecida como Kala-azar, que é causada por *Leishmania donovani* ou *Leishmania chagasi*, o qual se dissemina e infecta macrófagos do fígado, do baço e da medula óssea. Esta infecção é crônica e pode ser fatal se não for tratada [LODGE, DESCOTEAUX, 2005]. Na natureza, o parasito existe, tanto, na forma promastigota extracelular, encontrada no trato alimentar de insetos do gênero *Lutzomyia*, como na forma amastigota encontrada em fagolisossomas de macrófagos de mamíferos.

São poucos os agentes quimioterápicos atuantes em leishmaniose, entre eles, complexos metálicos contendo antimônio, como o “sodium stibogluconate” (**Figura 7**), e algumas quinonas hidroxiladas. A atividade leishmanicida do Sb^V é dependente de sua redução a Sb^{III} . [WILLIAMS e LEMKE, 2002; WYLLIE et al., 2004]. Novamente, observa-se a importância do processo de redução *in vivo*, para o mecanismo de ação de drogas. Outro alvo dos mais interessantes em relação a *Leishmania* (o mesmo se aplica aos tripanossomas patogênicos) são as enzimas topoisomerases, comentadas anteriormente, as quais estão presentes em protozoários patológicos como *Leishmania* e *Trypanosoma* e constituem alvos importantes para ação de drogas antibacterianas e antitumorais.

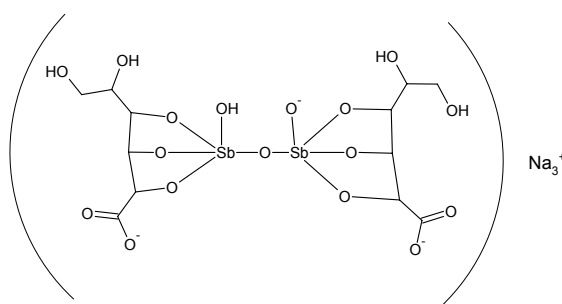


Figura 7. Agente quimioterápico usado contra a leishmaniose: Sodium stibogluconate [Retirado de WILLIAMS e LEMKE, 2002].

1.3. Eletrodos Modificados

O êxito a ser alcançado na aplicação de medidas eletroanalíticas depende em grande parte do eletrodo empregado. A busca por melhores resultados analíticos levou à introdução de eletrodos quimicamente modificados (EQMs), cuja metodologia consiste em fixar moléculas específicas na superfície de um eletrodo “inerte”. LANE e HUBBARD, em 1973, foram os pioneiros na utilização destes dispositivos eletroanalíticos.

A importância dos eletrodos modificados deve-se à presença de um filme de uma substância que atue seletivamente ligada ou adsorvida na superfície do eletrodo, atribuindo a este propriedades químicas, eletroquímicas e/ou outras propriedades desejáveis, relacionadas ao filme aplicado. O aumento da seletividade do eletrodo pode ser atribuído à modificação de sua superfície que adquire algumas especificidades químicas não disponíveis na superfície não modificada [ONI et al., 2005].

A modificação química de eletrodos é um campo de interesse crescente em química analítica. Já na eletroquímica, foi demonstrado que eletrodos quimicamente modificados possuem vantagens distintas em relação aos eletrodos convencionais em muitas áreas de aplicação, que incluem eletrocatalise e sensores eletroquímicos [LUZ et al., 2004]. O principal objetivo dessa modificação é pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução como uma forma de alterar a reatividade e seletividade do sensor base, favorecendo assim, o desenvolvimento de eletrodos para vários fins e aplicações, desde a catalise de reações orgânicas e inorgânicas até a aceleração da velocidade de transferência de elétrons em moléculas de interesse [PEREIRA et al., 2002].

Uma das propriedades mais importantes dos EQMs é a habilidade de catalisar a oxidação ou redução de alguns compostos. O material a ser escolhido para o eletrodo base, cuja superfície sofrerá a modificação, é um aspecto muito importante da preparação de um EQM. Este substrato deve apresentar características eletroquímicas apropriadas e também ser adequado para o método de imobilização selecionado. Entre os materiais convencionais, são passíveis de serem utilizados: ouro, platina, carbono vítreo, mercúrio na forma de filme, fibras de

carbono e pasta de carbono. Já entre os substratos menos usuais temos carbono vítreo reticulado, material plástico condutor e vidros condutores. Esta grande variedade de materiais e as possibilidades de combiná-los proporcionou um grande campo de atuação destes dispositivos, sendo até mesmo utilizados em ambientes hostis e altamente delicados, como o líquido intra-celular e durante a aplicação de um ultramicroeletrodo em medidas clínicas [PEREIRA et al., 2002].

A eficiência dos catalisadores desenvolvidos atualmente tem sido atribuída à sua capacidade de induzir a redução de alguns compostos orgânicos por promoverem a transferência eletrônica entre a superfície do eletrodo e as espécies eletroativas em solução, de forma mais rápida. Neste sentido, uma grande variedade de compostos tem sido usada como mediadores na transferência eletrônica, na eletrooxidação como na redução de várias moléculas-alvo [LUZ et al., 2005; REVENGA-PARRA, 2005]. O uso de metalofalocianinas (**Figura 8**) constitui um ótimo exemplo. Essas exibem excelentes propriedades físico-químicas – essenciais em aplicações como sensores eletroquímicos [MCKEOWN, 1998] – como alta estabilidade térmica e eficiência catalítica para um grande número de moléculas [OZOEMENA et al., 2001; FILANOVSKY, 1999].

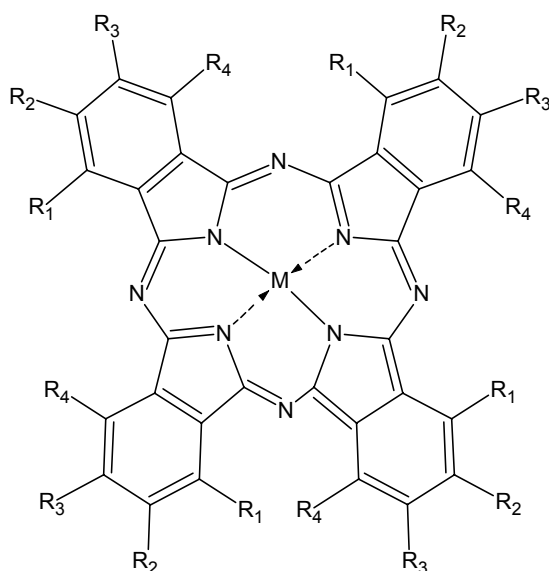


Figura 8. Ftalocianina: $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$, Ftalocianina Tetrassulfonada: $R_1 = R_2 = R_4 = H$ e $R_3 = SO_3^-$, $M =$ Cobalto, Níquel, Ferro ou Cobre.

A habilidade em preparar eletrodos modificados com um filme fino de um polímero de troca iônica, tem proporcionado um excelente método para examinar a

cinética das reações redox. Eletrodos quimicamente modificados com ftalocianina tetrassulfonada de cobalto (CoTSPc) imobilizada em filme de poli-L-lisina (PLL) têm-se mostrado muito estáveis, devido à habilidade da PLL em formar filmes contendo complexos eletrostaticamente ligados - a camada de filme de PLL é muito estável e forma uma camada superficial policatiônica em valores de pH muito altos – sendo, desta forma, utilizados na determinação de diversas substâncias [LUZ et al., 2004].

Um outro composto em estudo extensivo é o 7,7,8,8-tetracianoquinodimetano (TCNQ) (**Figura 9**). Ele possui diversas aplicabilidades, desde a utilização em eletrodos modificados até na área farmacêutica, através da detecção espectrofotométrica de fármacos com a reação destes com TCNQ [AL-GHANNAM, 2002], na química dos polímeros [DAY et al., 2003] e polímeros condutores [KIM et al., 2002]. O TCNQ apresenta um comportamento eletroquímico reversível, podendo atuar como uma molécula aceptora de elétrons ou como uma eletrodoadora [ZHANG et al., 2004], isto é, pode promover reações tanto de oxidação como de redução.

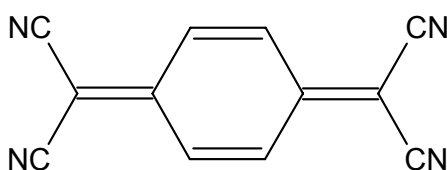


Figura 9. 7,7,8,8-Tetracianoquinodimetano (TCNQ).

Desta forma, a utilização de EQM's é uma área em franca expansão [PEREIRA et al., 2002], principalmente no aspecto do desenvolvimento de novos materiais e novos métodos de modificação de superfície de eletrodos, como na utilização de cerâmicas, filmes de metal-hexacianoferrato e macromoléculas, tais como DNA, o que visa ampliar e potencializar as aplicações destes dispositivos que, em muitos casos, já estão disponíveis no mercado, como os sensores eletroquímicos, conhecidos como "relógios" para monitoramento de glicose, muito utilizados por diabéticos e atletas, da mesma forma que os existentes para uréia. Também, pode-se destacar o programa "Sensors 2000", desenvolvido pela "National Aeronautical and Space Administration" (NASA), visando o desenvolvimento

tecnológico de sensores e sistemas que possam operar sobre gravidade zero e em ambientes onde a substituição ou reparo seja difícil.

1.3.1. Biossensores de DNA

O ácido desoxirribonucléico tem um papel importante nos processos vivos devido a sua característica de transportar a informação hereditária e ordenar a síntese biológica de proteínas e enzimas através dos processos de replicação e transcrição da informação genética das células vivas [RAUF et al., 2005]. O DNA (**Figura 10**) consiste de duas cadeias polinucleotídicas antiparalelas formadas por unidades nucleotídicas monoméricas. Cada nucleotídeo é formado por três tipos de componentes químicos: um grupo fosfato, um açúcar (desoxirribose) e quatro bases nitrogenadas diferentes.

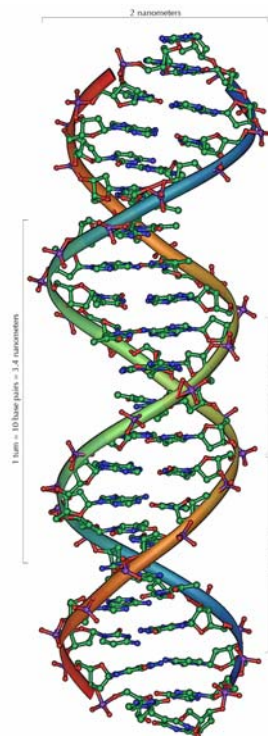


Figura 10. DNA em dupla fita (double-strand-DNA).

O polímero fosfato-desoxirribose representa a espinha dorsal do DNA. A informação genética celular é codificada pelas bases purínicas, adenina (A) e guanina (G), e as bases pirimidínicas, citosina (C) e timina (T) (**Figura 11**), em

função do ordenamento consecutivo na cadeia. As duas fitas de nucleotídeos estão torcidas em uma dupla-hélice, presas por ligações de hidrogênio entre as bases A•T e G•C de cada fita [DICULESCU et al., 2005].

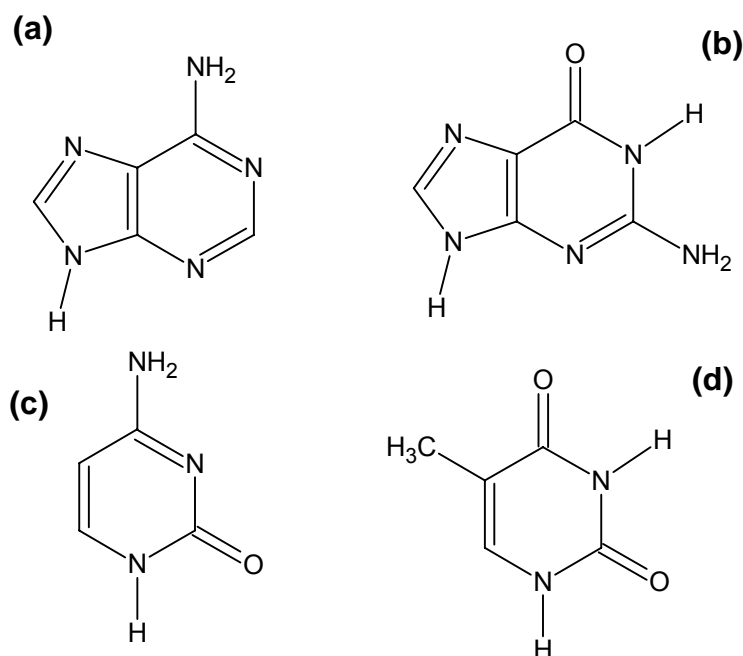


Figura 11. Bases purínicas e pirimidínicas constituintes da molécula de DNA: Adenina (a) e Guanina (b), Citosina (c) e Timina (d).

Fármacos anticancerígenos interagem com o DNA de maneiras diferentes, que incluem intercalação, ligação não covalente, ligação covalente, ligação cruzada, quebra do DNA e incorporação com análogos nucleosídeos, resultando na formação de complexos. O entendimento de como a complexação afeta as propriedades estruturais e mecânicas do DNA é um importante passo em relação à elucidação do mecanismo biológico de ação de agentes alquilantes de DNA, tendo em vista, o desenvolvimento racional de novos fármacos [RAUF et al., 2005].

Há quase quarenta anos, foram iniciados diversos estudos relacionados ao comportamento eletroquímico do DNA, bem como os efeitos de sua adsorção em diversos tipos de eletrodos.

A grande maioria dos estudos até então realizados, centrou-se na análise e identificação estrutural de ácidos nucleicos e a relação entre o comportamento

polarográfico do DNA com sua conformação em solução, observando-se as diferenças nas respostas eletroquímicas existentes entre o DNA nativo (*double-strand*, dsDNA) (**Figura 12**), o desnaturado (*single-strand*, ssDNA) e degradado, utilizando-se principalmente eletrodos de mercúrio [PALECEK, 1996; JELEN et al., 1997].

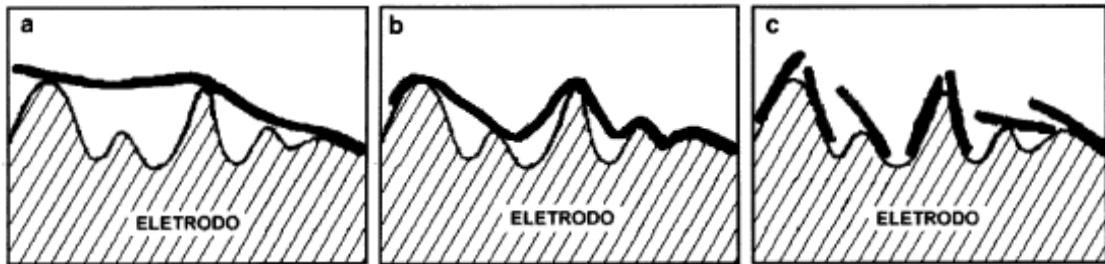


Figura 12. Representação esquemática da adsorção do DNA na superfície de carbono. (a) e (b) DNA nativo e desnaturado, respectivamente; (c) DNA degradado [Adaptado de LA-SCALEA et al., 1999].

A oxidação eletroquímica de ácidos nucleicos naturais e sintéticos tem sido amplamente estudada em eletrodos de grafite pirolítico [BRABEC e DRYHUST, 1978; WU et al., 2000], grafite espectroscópico impregnado com parafina [BRABEC, 1980] e carbono vítreo [BRABEC e KOUDELKA, 1980], na observação do comportamento adsortivo do dsDNA e ssDNA na superfície do eletrodo [BRETT et al., 2005; WU et al., 2000].

O estudo da oxidação eletroquímica do DNA em eletrodo de carbono vítreo usando voltametria de pulso diferencial (VPD) é apresentado na **Figura 13** [DICULESCU et al., 2005].

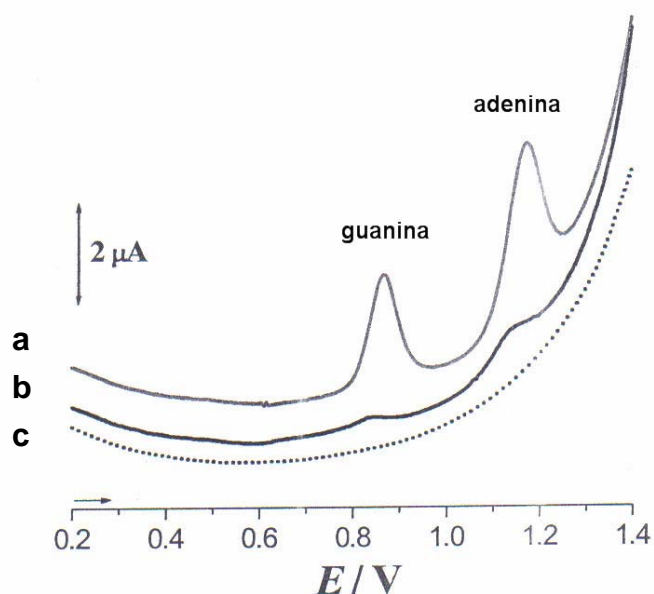


Figura 13. Voltamograma de pulso diferencial obtido com eletrodo de carbono vítreo modificado com DNA ($60 \mu\text{g mL}^{-1}$) em uma solução de tampão acetato 0,1 M de pH 4,5: 1° voltamograma do ssDNA (a) e dsDNA (c), 40° voltamograma do dsDNA (b) [Adaptado de DICULESCU et al., 2005].

A eletroxidação do DNA, em meio ácido, está relacionada à oxidação dos resíduos das bases purínicas, sendo as bases pirimidínicas eletroinativas nessas condições. Em pH 6,4, com eletrodo de grafite pirolítico e por voltametria de pulso diferencial, ácidos nucleicos naturais produzem dois picos bem definidos correspondentes à eletroxidação dos resíduos de guanina (+0,88 V) e adenina (+1,15 V).

O comportamento eletroquímico obtido com o DNA em dupla fita (dsDNA) e o DNA de fita única (ssDNA) ilustra a grande dificuldade para a transferência de elétrons de dentro da forma rígida da dupla-fita do DNA para a superfície do eletrodo, do que da forma flexível do DNA de fita única, onde as bases estão próximas da superfície do eletrodo. A rugosidade da superfície do eletrodo sólido faz com que o dsDNA tenha dificuldades em seguir os contornos da superfície, enquanto que a molécula de ssDNA possui uma maior facilidade em seguir os contornos superficiais, devido a sua maior flexibilidade (**Figura 12**) [DICULESCU et al., 2005].

Após estudos eletroquímicos exaustivos das bases constituintes do DNA, houve o desenvolvimento de eletrodos modificados com o mesmo, denominados biossensores de DNA.

Biossensores são definidos como dispositivos analíticos em que há uma incorporação de um material biológico (tecidos, microrganismos, organelas, enzimas, ácidos nucleicos, etc) a um material derivado biologicamente ou material similar, intimamente associado ou integrado com um transdutor, que pode ser óptico, eletroquímico, termométrico, piezoelétrico ou magnético. Nos últimos anos, os eletrodos modificados com DNA foram aplicados com sucesso tanto como superfícies modificadas para determinação eletroanalítica de fármacos, quanto para o estudo da interação dos mesmos com o ácido desoxirribonucléico [RAUF et al., 2005]. Eles permitem avaliar e prever interações em que poderão haver perdas celulares, através de experimentos eletroquímicos (voltametria de pulso diferencial e de onda quadrada, em eletrodos de carbono vítreo modificados com DNA em fita dupla e simples) baseados na observação da ligação das moléculas-teste com ácidos nucleicos.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

- Realizar o estudo eletroquímico da diospirina, utilizando técnicas tais como, voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada e voltametria de pulso diferencial.
- Desenvolver métodos de quantificação da diospirina em concentrações nanomolares em extratos vegetais ou outros meios utilizados.
- Realizar análise da interação da diospirina com o dsDNA em biossensor de DNA.

2.2. Específicos

- Realizar o estudo eletroquímico da diospirina em meio prótico misto, utilizando como eletrodo de trabalho carbono vítreo.
- Construir uma curva analítica para a diospirina com a finalidade de quantificar a mesma em extrato da planta *Diospyros montana* Roxb. utilizando eletrodo de carbono vítreo não modificado.
- Verificar a estabilidade fotoquímica da diospirina, através de análise espectroscópica.
- Desenvolver um sensor com um complexo metálico para a determinação de diospirina em concentrações nanomolares.
- Construir uma curva analítica para a diospirina com o sensor desenvolvido.
- Realizar estudos de recuperação e de adição da amostra do extrato da planta *Diospyros montana* Roxb, com o sensor desenvolvido.
- Verificar possível interação da diospirina com o DNA, com o emprego do eletrodo modificado com dsDNA.

3. METODOLOGIA

3.1. Técnicas Eletroquímicas

Três importantes técnicas em eletroquímica, a voltametria cíclica, a voltametria de onda quadrada e a voltametria de pulso diferencial, muito utilizadas no desenvolvimento do presente trabalho são descritas a seguir.

3.1.1. Voltametria Cíclica (VC)

Das diversas técnicas eletroquímicas existentes, a voltametria cíclica é uma das mais utilizadas, pois, permite obter rapidamente uma quantidade extraordinária de informações sobre as reações de transferência eletrônica, investigar a reatividade química das espécies eletrogeradas e identificar espécies presentes em solução, com a obtenção de dados cinéticos e, por fim, auxilia na elucidação do mecanismo eletródico em questão [BRETT, 1996; BARD, 1990].

A VC é uma técnica de varredura reversa de potencial, em que o potencial aplicado ao eletrodo é variado numa velocidade conhecida e, ao atingir o potencial final desejado, a varredura é revertida ao valor inicial, na mesma velocidade, onde é obtido, como resposta a essa perturbação, um par de picos, catódico e anódico (**Figura 14**), para sistemas reversíveis [GREEF et al., 1985].

Metodologia

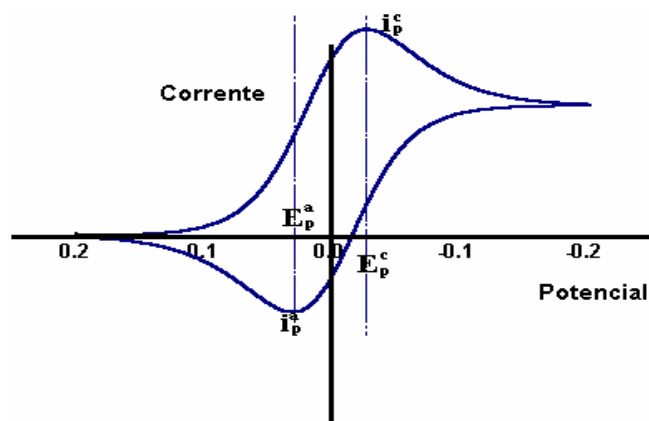


Figura 14. Voltamograma cíclico para um sistema reversível, com destaque para os parâmetros mais importantes [Adaptado de GREEF et al., 1985].

Os parâmetros eletroquímicos mais importantes são os potenciais de pico catódico e anódico (E_{pc} e E_{pa}), as correntes de pico catódica e anódica (i_{pc} e i_{pa}) e os potenciais de meia onda ($E_{1/2}$). A análise da dependência do potencial e da corrente de pico com a variação da velocidade de varredura, com a concentração da substância eletroativa e a partir da adição de eletrófilos, nucleófilos ou prótons, com base em testes diagnósticos, permite obter informações importantes, como reversibilidade e irreversibilidade do processo de transferência eletrônica, a verificação da presença de reações químicas acopladas, de adsorção e de fenômenos catalíticos, além de se poder caracterizar o fenômeno que controla a corrente de pico, ou seja, difusão, migração ou convecção.

A influência da velocidade de varredura sobre a corrente e o potencial, em um processo de transferência eletrônica reversível, pode ser observada na **Figura 15** [GREEF et al., 1985].

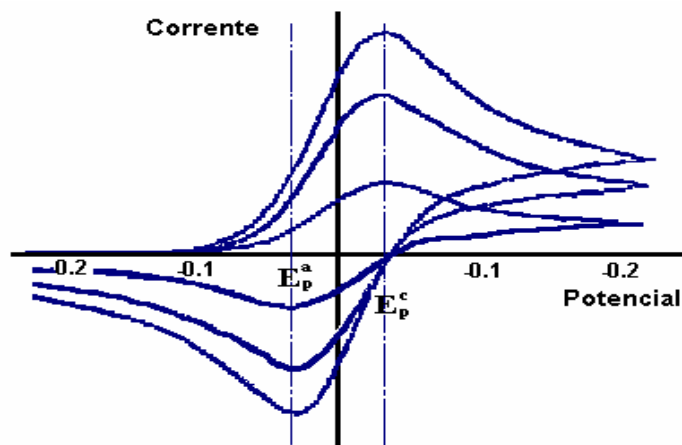


Figura 15. VC mostrando diferentes velocidades de varredura (ν). A corrente aumenta com o aumento de ν [Adaptado de GREEF et al., 1985].

3.1.2. Voltametria de Onda Quadrada (VOQ)

As técnicas de pulso são baseadas na cronoamperometria, ou seja, na medida da corrente elétrica em função do tempo de aplicação de um determinado pulso de potencial. A análise da evolução do sistema depois desta perturbação permite fazer deduções sobre reações eletródicas e as respectivas cinéticas reacionais.

A voltametria de onda quadrada é uma técnica usada desde 1952, sendo hoje em dia considerada uma técnica analítica muito importante devido ao grau de sensibilidade, apresentando picos bem definidos em concentrações da ordem de $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Três parâmetros caracterizam a forma da onda: a altura do salto ΔE , a amplitude da onda quadrada E^{OQ} e o período da onda quadrada τ (largura do salto) (**Figura 16**). Na VOQ a velocidade de varredura é definida como a razão $\Delta E^{OQ}/\tau$, podendo atingir 5 V s^{-1} . Esse fato confere vantagens a VOQ como técnica analítica, em termos de rapidez de análise, de menor consumo de reagente e da diminuição de problemas associados ao bloqueio da superfície do eletrodo [SOUZA et al, 2003].

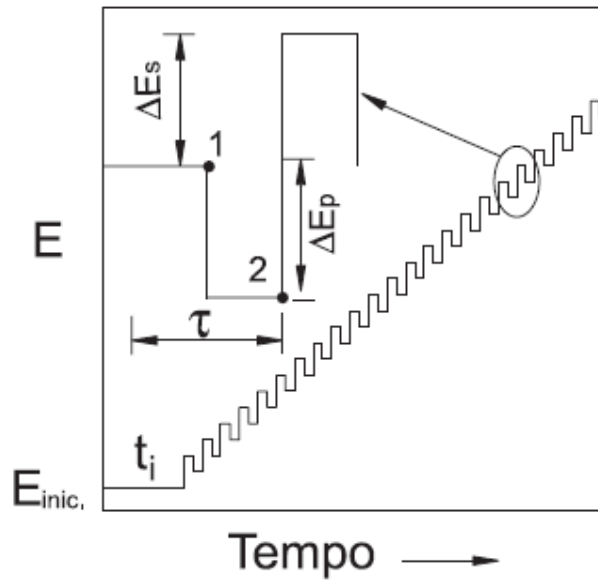


Figura 16. Esquema básico para a voltametria de onda quadrada [Adaptado de SOUZA et al., 2003].

A **Figura 17** apresenta os voltamogramas teóricos associados a: 1) um sistema reversível e 2) um sistema irreversível, com a separação observada das correntes direta, reversa e resultante [SOUZA et al, 2003].

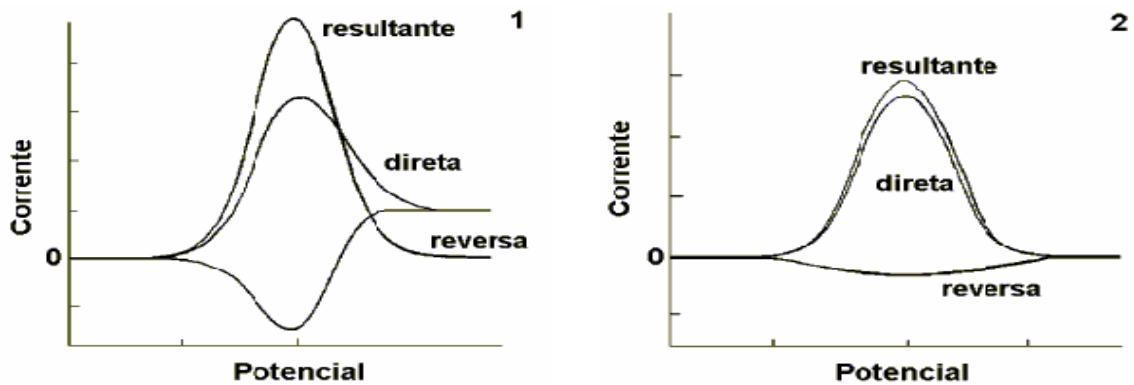


Figura 17. Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada onde: 1) representa um processo redox de um sistema reversível e 2) de um sistema irreversível [Adaptado de SOUZA et al., 2003].

3.1.3. Voltametria de Pulso Diferencial (VPD)

Voltametria de pulso diferencial é uma técnica extremamente usada em medidas, a níveis de traços, de espécies orgânicas e inorgânicas. O degrau de potencial é a base deste tipo de voltametria [WANG, 2000].

As técnicas de pulso foram desenvolvidas inicialmente para o eletrodo gotejante de mercúrio, onde o objetivo era sincronizar os pulsos com o crescimento da gota e reduzir a contribuição da corrente capacitiva por amostragem da corrente no fim da vida da gota. Depois de se aplicar o pulso de potencial, a corrente capacitiva decresce mais rapidamente que a corrente faradaica, assim, a corrente é medida no fim do pulso aplicado. Este tipo de amostragem tem a vantagem do aumento da sensibilidade, apresentando, em consequência, melhores características para aplicações analíticas [BRETT e BRETT, 1996].

Em Voltametria de Pulso Normal (VPN), escolhe-se um valor base de potencial, E_{base} , normalmente onde não há reação faradaica, e aplica-se ao eletrodo. A partir desse valor, aplicam-se pequenos pulsos de amplitude crescente, sendo o aumento da amplitude sempre igual. A corrente é medida no fim de cada pulso, cuja duração varia normalmente entre 5 e 100 ms; o intervalo entre os pulsos é de 2 - 4 s. A voltametria de pulso diferencial (VPD) é semelhante à VPN, mas com algumas diferenças importantes (**Figura 18**) [BRETT e BRETT, 1996]:

- O potencial-base é aumentado entre os pulsos, sendo esses aumentos iguais.
- A corrente é medida imediatamente antes da aplicação do pulso e no fim do pulso: registra-se a diferença entre as duas correntes.
- A duração de cada pulso varia normalmente entre 5 e 50 ms.
- O intervalo entre os pulsos é de 0,5 - 4 s.

A curva corrente vs potencial (I vs E) está representada na **Figura 18c**.

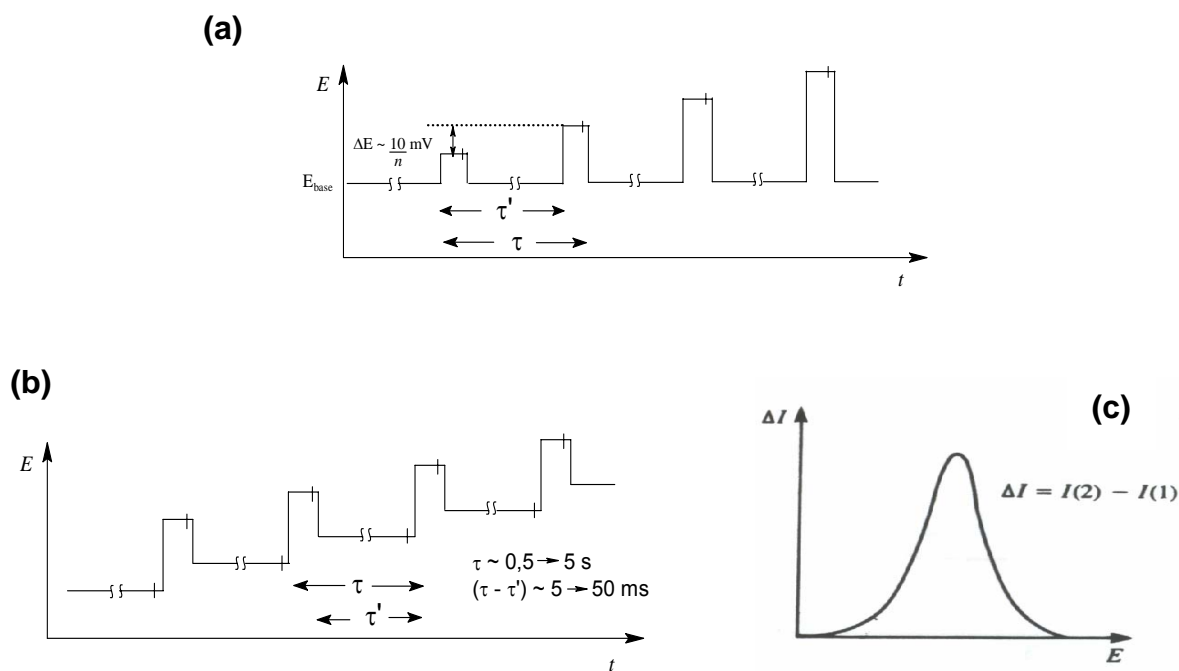


Figura 18. Esquema de aplicação de potenciais [voltametria de pulso normal – VPN (a) e voltametria de pulso diferencial – VPD (b)]; (c) Perfil corrente-potencial esquemático [Adaptado de BRETT et al., 1996].

Apesar da curva I vs E da VPD ser de difícil parametrização e de não se constituir de uma equação simples como a da onda polarográfica (por exemplo), seu formato sinusoidal permite a aquisição de dados comparativos com a vantagem da alta sensibilidade da técnica [BRETT e BRETT, 1996].

3.2. Espectroscopia na Região do Ultravioleta e Visível (UV-VIS)

Quando uma luz branca passa através de uma cubeta de vidro contendo um líquido, a radiação emergente será menos intensa que a incidente. Essa perda é devida a reflexões nas superfícies e em parte a dispersão por qualquer partícula em suspensão, mas, acima de tudo, é devida a absorção da energia radiante pelo líquido.

A amplitude com que a energia é absorvida pelo líquido é geralmente maior para algumas cores, que constituem a luz branca do que para outras, com o resultado de que o feixe emergente é colorido. Na **Tabela 1** são listadas as cores da

radiação de intervalos de comprimento de onda sucessivos, junto com os seus complementos.

Tabela 1: Cores da radiação visível [Adaptado de EWING, 1998].

Intervalo Aproximado de Comprimento de Onda, nm	Cor	Complemento
400 – 465	Violeta	Verde-amarelado
465 – 482	Azul	Amarelo
482 – 487	Azul-esverdeado	Alaranjado
487 – 493	Turquesa	Vermelho-alaranjado
493 – 498	Verde-azulado	Vermelho
498 – 530	Verde	Vermelho-púrpura
530 – 559	Verde-amarelado	Púrpura-avermelhado
559 – 571	Amarelo-verde	Púrpura
571 – 576	Amarelo-esverdeado	Violeta
576 – 580	Amarelo	Azul
580 – 587	Laranja-amarelado	Azul
587 – 597	Alaranjado	Azul-esverdeado
597 – 617	Laranja-avermelhado	Turquesa
617 – 780	Vermelho	Turquesa

A cor aparente da solução é sempre o complemento da cor absorvida. Portanto, uma solução que absorve na região do azul (de 465 a 480 nm) aparecerá amarela, a que absorve na região do verde, cor de púrpura, etc. Uma solução contendo o íon cúprico hidratado é azul, pois esse íon absorve luz amarela e é transparente a outras cores. Assim uma solução de um sal de cobre pode ser analisada medindo-se a absorvância da luz amarela em condições padronizadas. A maioria das substâncias solúveis coloridas pode ser determinada quantitativamente dessa maneira [EWING, 1998].

A absorção da energia radiante nas regiões do espectro visível e ultravioleta depende do número e arranjo dos elétrons nas moléculas ou íons absorventes.

Compostos totalmente saturados não mostram absorção seletiva na região do visível e ultravioleta. Compostos que contêm uma única dupla ligação absorvem fortemente no ultravioleta distante (195 nm para o etileno). As duplas ligações

conjugadas absorvem em maiores comprimentos de onda. Quanto mais extenso for o sistema conjugado, maiores serão os comprimentos de onda relativos à absorção [EWING, 1998].

O instrumento usado para medir a quantidade de luz absorvida em cada comprimento de onda, nas regiões do visível e do UV, é denominado de espectrofotômetro.

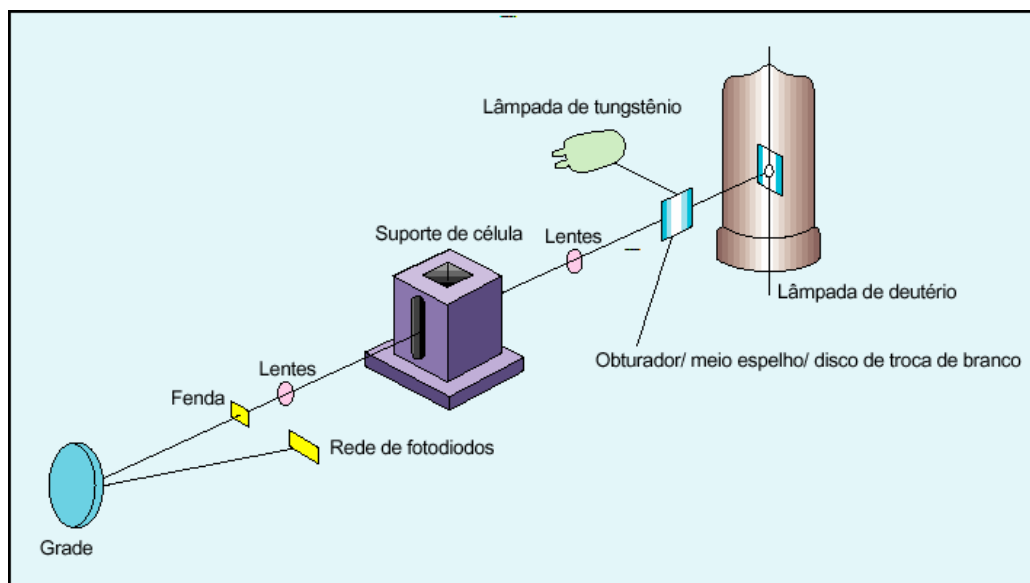


Figura 19. Esquema de um espectrofotômetro de UV-VIS de arranjo de diodos [Retirado de www.shimadzu.com.br].

Na maioria desses instrumentos o feixe de luz é um feixe único que passa pela amostra através de um arranjo de diodos (**Figura 19**), e no outro tipo o feixe é duplo, em que uma das metades do feixe (o feixe da amostra) passa através de uma célula transparente que contém solução do analito (composto em análise), e a outra metade (o feixe de referência) passa através de outra célula idêntica à primeira, no entanto contendo o solvente da solução sem o composto, comumente denominado de branco.

Os solventes são escolhidos entre os transparentes na região do espectro utilizado. O instrumento opera de modo que se possa fazer uma comparação entre as intensidades dos dois feixes em cada comprimento de onda da região, dando uma resposta na forma de um gráfico, onde a absorvância da luz em cada

comprimento de onda é plotada contra o comprimento de onda, dando origem ao *espectro de absorção* [SOLOMONS, 1996].

Um espectro de absorção típico é mostrado na **Figura 20**, o da naftoquinona plumbagina (5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona), apresentando duas bandas bem definidas na região do ultravioleta e do visível [PAIVA et al., 2002].

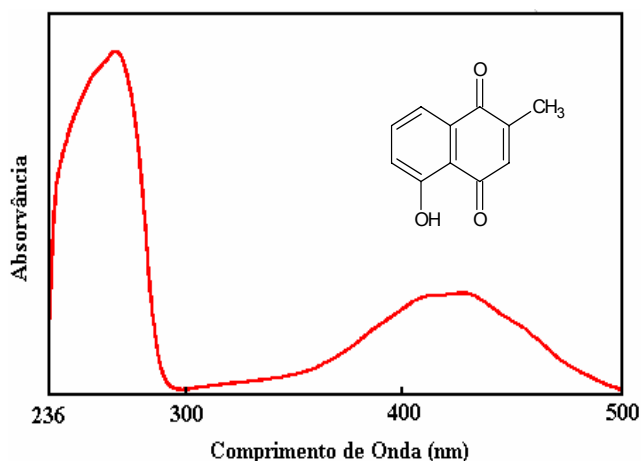


Figura 20. Espectro de absorção no UV da 5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona (plumbagina) em cicloexano/clorofórmio/isopropanol (50:50:1, v/v/v) [Adaptado de PAIVA et al., 2002].

3.3. Experimental

3.3.1. Especificações das Substâncias Utilizadas e Preparo de Soluções

3.3.1.1. Diospirina e Extrato Bruto Clorofórmico da Planta *Diospyros montana* Roxb.

A diospirina pura (MM 374,16 g mol⁻¹, P.F. 256°C) e o extrato clorofórmico da planta *Diospyros montana* Roxb. [HAZRA et al., 1984; SANYAL et al., 2003] foram cedidos para análise, pela pesquisadora Banasri Hazra, do Departamento de

Farmácia, Universidade de Jadavpur, Calcutá, Índia, em colaboração com o Laboratório de Eletroquímica do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL.

3.3.1.2. Especificações do dsDNA, Lisina, Ftalocianina Tetrassulfonada de Cobalto (CoTSPc) e Demais Reagentes

- DNA: Ácido Desoxirribonucléico, sal de sódio Tipo I, altamente polimerizado de Calf Tymus, dessecado, estocado 2–8 °C, conteúdo de sódio 6,2% e água 13%, Sigma;
- PLL: Poli-L-Lisina (Poly-L-Lysine Hydrobromide), Sigma, dessecada, estocada -20 °C, MM (MALLS) 21,320 (**Figura 21b**);
- CoTSPc: Ftalocianina Tetrassulfonada de Cobalto (Cobalt Tetrasulfonated Phthalocyanine) (MM 895 g mol⁻¹), preparado e purificado de acordo com o procedimento de Weber e Busch [WEBER e BUSCH, 1965], cedido para uso pelo Professor Dr. Lauro Tatsuo Kubota, da Universidade Estadual de Campinas em colaboração com o Laboratório de Eletroquímica do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (**Figura 21a**);

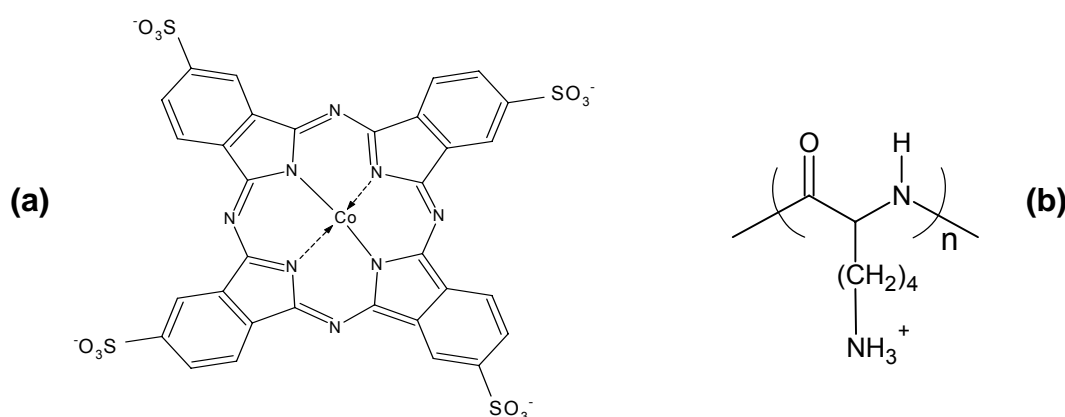


Figura 21. (a) Ftalocianina Tetrassulfonada de Cobalto (CoTSPc) e (b) Poli-L-Lisina.

- DMSO: Dimetilsulfóxido Puro (MM 78,13 g mol⁻¹), Aldrich, Brasil;
- NaOAc: Acetato de Sódio Anidro P.A. (MM 82,03 g mol⁻¹), Nuclear, Brasil;

- HOAc: Ácido Acético Glacial P.A. (MM 60,04 g mol⁻¹), Vetec, Brasil.
- ZnSO₄.7H₂O: Sulfato de Zinco Heptahidratado P.A. (MM 287,54 g mol⁻¹), Merck, Brasil.

3.3.1.3. Preparo da Solução Tampão

Para o preparo do tampão acetato (0,072 mol L⁻¹) foram misturadas uma solução de ácido acético (HOAc) 1,0 mol L⁻¹ e uma solução de acetato de sódio (NaOAc) 1,0 mol L⁻¹, preparadas com água deionizada, para obter um tampão com pH em torno de 4,5, faixa de pH útil para estudos com eletrodo de DNA.

A solução tampão utilizada nos estudos com DNA foi preparada utilizando-se água deionizada Milli-Q fervida, para eliminar eventuais microrganismos que possam danificar a molécula de DNA, e todas as vidrarias utilizadas foram previamente lavadas com essa água. Para a obtenção do tampão (0,072 mol L⁻¹), pH 4,5, foram misturados 7,2 mL de uma solução previamente preparada de NaOAc 1,0 mol L⁻¹ com 12,5 mL de uma solução previamente preparada de HOAc 1,0 mol L⁻¹ em um balão de 100 mL, em seguida o volume foi completado com água deionizada previamente fervida.

Para o desenvolvimento do sensor para diospirina, foram preparadas soluções de tampão acetato (pH 4,5) nas concentrações de 0,072 mol L⁻¹; 0,1 mol L⁻¹; 0,15 mol L⁻¹ e 0,2 mol L⁻¹, em procedimento semelhante ao descrito acima.

3.3.1.4. Preparo da Solução de Diospirina (Solução Estoque)

Para o preparo da solução da diospirina (MM = 374,16 g mol⁻¹) 0,1 mg mL⁻¹ (2,67 x 10⁻⁴ mol L⁻¹) foram pesados 0,5 mg do composto e dissolvidos em 5,0 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e tampão acetato (pH 4,5) na proporção de 1:1 v/v. Para uma melhor dissolução, o composto teve que ser dissolvido de maneira alternada (1,0 mL de DMSO, em seguida 1,0 mL de tampão e colocado no ultrassom), devido

a mesma ser pouco solúvel em meio aquoso. Após o preparo da solução, foi observada uma mudança no pH*, permanecendo assim, em 5,4.

Nas etapas de preparação do sensor para a diospirina, foram preparadas soluções estoques da diospirina de $2,67 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão acetato/DMSO, conforme procedimento descrito acima. Cada análise eletroquímica foi realizada após o preparo de cada solução de diospirina.

3.3.1.5. Preparo da Solução do Extrato Clorofórmico da Planta *Diospyros montana* Roxb.

Para o preparo da solução do extrato da planta *D. montana* Roxb. [HAZRA et al., 1984; SANYAL et al., 2003] para a quantificação da diospirina, 0,63 mg de cada amostra do extrato foram pesados e diluídos com 5 mL de tampão acetato $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,5) e DMSO puro (1:1, v/v), adicionando-se, inicialmente o DMSO e em seguida, o tampão. Após o preparo da solução, foi observada uma mudança no pH*, permanecendo assim, em 5,4.

3.3.1.6. Preparo das Soluções de CoTSPc e PLL

Para o desenvolvimento do sensor para a diospirina, foram preparadas soluções do complexo CoTSPc e de PLL em diversas concentrações: 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 e $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para o CoTSPc e 0,25; 0,4; 0,5; 0,6 e $0,75 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para PLL, ambas dissolvidas em água deionizada e misturadas (1:1, v/v) para o preparo do filme a ser colocado na superfície do eletrodo.

3.3.1.7. Preparo da Solução de Zinco

Para o estudo eletroquímico da interação da diospirina com zinco, foi preparada uma solução aquosa de Zn^{2+} ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) na concentração de $1,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

3.3.2. Estudo Eletroquímico e Demais Análises

3.3.2.1. Voltametria Cíclica

O experimento foi realizado em potenciostato AutoLab PGSTAT 30 (**Figura 22**) em um sistema de três eletrodos: disco de carbono vítreo como eletrodo de trabalho, eletrodo de platina como auxiliar e como eletrodo de referência, $Ag|AgCl|Cl^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ – análises eletroquímicas com eletrodo limpo; saturado – desenvolvimento do sensor) (**Figuras 23 e 24**) na faixa de potencial de 0,20 a -0,70 V, utilizando solução de diospirina $2,67 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em tampão acetato, pH 4,5 (força iônica 0,1) + DMSO (1:1, v/v), como descrito anteriormente.



Figura 22. Potenciostato Autolab utilizado na realização dos experimentos.

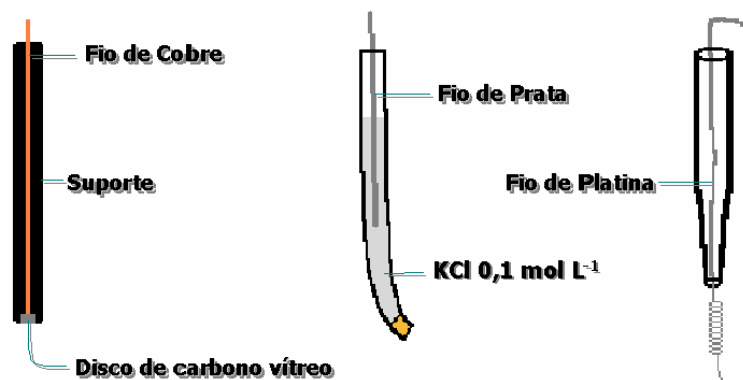


Figura 23. Esquema dos eletrodos de trabalho, referência e auxiliar, respectivamente.

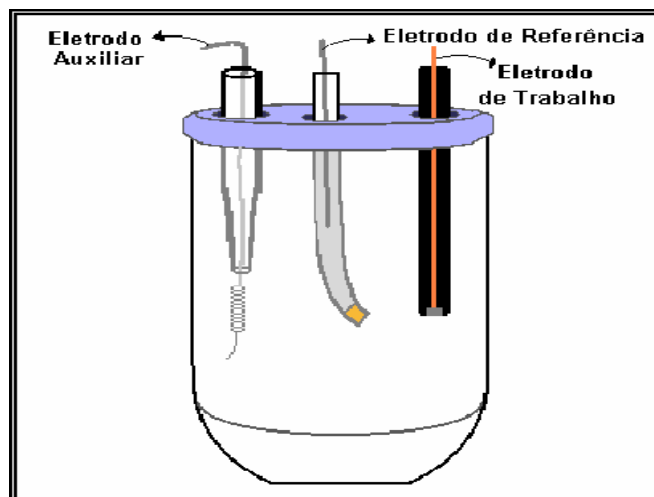


Figura 24. Esquema da célula eletroquímica utilizada.

3.3.2.2. Voltametria de Onda Quadrada

O experimento foi realizado em potenciostato AutoLab (**Figura 22**) em um sistema de três eletrodos: disco de carbono vítreo (BAS, diâmetro de 3 mm) como eletrodo de trabalho, eletrodo de platina como auxiliar e como eletrodo de referência, Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹) em um tubo com capilar de Luggin com vycor na extremidade, na faixa de potencial de 0 a -1,0 V, utilizando solução de diospirina $2,67 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ preparada em tampão acetato e DMSO (1:1, v/v), como descrito anteriormente. Foi utilizada a frequência de 100 Hz para a análise, ~ 100 mV s⁻¹.

3.3.2.3. Voltametria de Pulso Diferencial

O experimento foi realizado em potenciostato AutoLab (**Figura 22**) em um sistema de três eletrodos: disco de carbono vítreo como eletrodo de trabalho, eletrodo de platina como auxiliar e como eletrodo de referência, Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹ – análises eletroquímicas com eletrodo limpo; saturado – desenvolvimento do sensor) na faixa de potencial de 0 a -1,0 V, utilizando solução de diospirina 2,67 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ preparada em tampão acetato e DMSO (1:1, v/v), como descrito anteriormente. Foi utilizada a velocidade de varredura de 5 mV s⁻¹ para as análises.

3.3.2.3.1. Determinação da Diospirina por VPD

Para quantificar a diospirina, foi preparada uma solução estoque da substância com concentração de 2,67 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ (0,1 mg mL⁻¹). Em 5,0 mL da mistura DMSO/tampão (1:1, v/v) contidos na célula eletroquímica, foram adicionadas alíquotas de 100 µL cada de solução estoque de diospirina. Após a adição de cada alíquota, foram realizadas varreduras na velocidade de 5 mV s⁻¹, na faixa de potencial de 0 a -1,0 V. As concentrações escolhidas (em µg mL⁻¹) para a confecção da curva foram: 1,5 µg mL⁻¹; 3,8 µg mL⁻¹; 5,6 µg mL⁻¹; 7,4 µg mL⁻¹ e 9,0 µg mL⁻¹.

3.3.2.4. Análise Espectroscópica

A análise foi realizada em um espectrofotômetro Shimadzu Multispec-1501. Foi preparada uma solução da diospirina 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹, em DMSO/tampão acetato (1:1, v/v), pH* 5,4. Em seguida, foi feita a análise da variação do tempo de exposição da substância à luz ambiente para se verificar a estabilidade fotoquímica da mesma. A faixa de comprimento de onda analisada foi de 350 a 600 nm

3.3.2.4.1. Variação do Tempo de Exposição da Diospirina à Luz

Foram adicionados 3,0 mL de solução de diospirina ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) numa cubeta de quartzo. A absorvância foi medida de 20 em 20 minutos no decorrer de 2 horas, sempre deixando a cubeta, contendo a solução da diospirina, exposta à luz.

3.3.2.5. Eletrodos Modificados

As análises da diospirina com os eletrodos modificados com complexos metálicos foram feitas no Laboratório de Eletroquímica e Eletroanalítica e Desenvolvimento de Sensores - LEEDS, do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) sob a supervisão do Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota, em parceria com o Laboratório de Eletroquímica do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas.

3.3.2.5.1. Preparo do Eletrodo Modificado com DNA

Todo o estudo eletroquímico do biossensor foi realizado utilizando-se voltametria de pulso diferencial (VPD) em um sistema de três eletrodos: eletrodo de carbono vítreo (BAS, diâmetro de 3 mm) modificado com dsDNA como eletrodo de trabalho, platina como eletrodo auxiliar e Ag|AgCl|Cl^- ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) em um tubo com capilar de Luggin com vycor na extremidade, como eletrodo de referência. O experimento foi realizado em meio tamponado (apenas tampão acetato pH 4,5). As análises foram realizadas em Potenciostato AutoLab e o pH foi medido em pHmetro MARCONI MAPA200.

3.3.2.5.1.1. Preparo do Gel de DNA

Foram pesados 18,75 mg de dsDNA e colocados em um tubo eppendorf com 0,5 mL de tampão acetato (3 mg/80 μ L). O gel foi deixado em geladeira por 24 horas para que o mesmo se torne mais homogêneo e não haja degradação pelo calor.

3.3.2.5.1.2. Preparo do Biossensor de dsDNA e Estudo Eletroquímico da Diospirina com o Biossensor

Para o preparo do biossensor de dsDNA, o eletrodo de carbono vítreo foi acondicionado em tampão acetato utilizando-se a técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD). O eletrodo foi submetido a várias ciclagens na faixa de potencial de 0 a 1,6 V, na velocidade de varredura de 5 mV s^{-1} . Após esse condicionamento, foram colocados 80 μ L do gel de dsDNA na superfície do eletrodo e esperadas 24 horas [ABREU et al., 2002] até o biossensor estar seco. Após as 24 horas, foi feito o condicionamento do eletrodo modificado com o dsDNA, através da imersão do mesmo na cela eletroquímica (**Figura 25**) contendo 5,0 mL de solução tampão acetato (pH 4,5), submetendo-o a várias ciclagens em voltametria de pulso diferencial na faixa de potencial de 0 a 1,6 V até obtenção de resposta voltamétrica estável. Após o condicionamento do eletrodo modificado com o dsDNA, foram colocados 20 μ L de solução de diospirina ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) sobre o eletrodo e deixado em repouso por 24 horas. Em seguida, o biossensor foi imerso em solução de tampão acetato (pH 4,5) e feita uma única varredura em voltametria de pulso diferencial na região de potencial de 0 a 1,6 V, na velocidade de varredura de 5 mV s^{-1} . Para efeito de comparação, foram feitas análises do gel apenas com DMSO + tampão acetato (pH 4,5) na superfície do eletrodo com procedimento semelhante ao descrito acima.

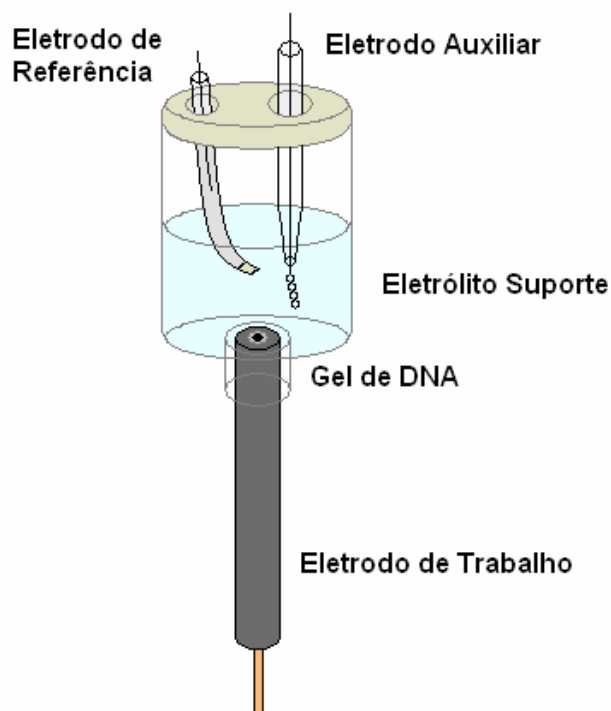


Figura 25. Esquema da célula eletroquímica utilizada nas análises com biossensor de DNA.

3.3.2.5.2. Eletrodos Modificados com Complexos Metálicos

Para a escolha do complexo metálico ideal para a análise da diospirina, foram feitos vários testes com filmes de diferentes tipos de complexos metálicos em voltametria cíclica na faixa de potencial de 0,1 a -0,5 V, na velocidade de 15 mV s^{-1} , em meio DMSO/tampão (1:1, v/v), pH* 5,4. O complexo escolhido para a análise da diospirina foi o que mostrou uma resposta electrocatalítica estável frente à mesma. Os complexos testados foram: Fenantrolina Tetracianoquinodimetano de Cobre $[\text{Cu}(\text{Phen})(\text{TCNQ})_2]$, Ftalocianina Tetrassulfonada de Cobre (CuTSPc) e Ftalocianina Tetrassulfonada de Cobalto (CoTSPc). O estudo desses complexos foi feito conforme procedimento de análise para o CoTSPc (procedimento 3.3.2.5.2.2.). Além disso, foram feitos testes com o eletrodo de pasta de carbono misturada com sílica modificada com antimônio com o complexo escolhido (CoTSPc) para a análise da diospirina.

3.3.2.5.2.1. Preparo do Eletrodo Modificado com Complexo de Ftalocianina Tetrassulfonada de Cobalto (CoTSPc) e Lisina

Um eletrodo de carbono vítreo, com área geométrica de $0,071 \text{ cm}^2$ (adquirido de Metrohm–Suíça), foi usado para a construção do sensor. Para a modificação do eletrodo, foram adicionados na superfície do mesmo, $10 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução preparada da mistura das soluções de CoTSPc e PLL (1:1, v/v) nas concentrações de: 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 ou $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para CoTSPc e 0,25; 0,4; 0,5; 0,6 ou $0,75 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para PLL. Em seguida, o eletrodo foi deixado secar em estufa ($80 \text{ }^\circ\text{C}$) por 10 minutos [LUZ et al., 2006]. Após resfriamento em temperatura ambiente, o eletrodo foi lavado cuidadosamente com água para retirar o excesso de complexo que permanece na superfície do eletrodo. Em seguida, foi disposto para análise eletroquímica.

3.3.2.5.2.2. Estudo da Redução Eletrocatalítica da Diospirina no Eletrodo Modificado

O estudo da redução eletrocatalítica foi realizado em voltametria cíclica na faixa de potencial de 0,1 a $-0,3 \text{ V}$, em uma velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} . As varreduras foram feitas em DMSO/tampão acetato (1:1, v/v) pH* 5,4 em eletrodo de carbono vítreo limpo e modificado com CoTSPc/PLL na ausência e presença de diospirina e eletrodo modificado apenas com PLL. Esse estudo foi realizado com solução de diospirina na concentração de $2,67 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, CoTSPc e PLL, $0,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

3.3.2.5.2.3. Estudo da Influência das Concentrações de CoTSPc, PLL e Tampão Acetato e da Velocidade de Varredura e Amplitude de Potencial na Resposta do Sensor (Otimização)

A influência das concentrações de CoTSPc e PLL na resposta do sensor para diospirina ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) foi investigada pela modificação da superfície do eletrodo com filmes contendo diferentes composições. Inicialmente, a superfície do eletrodo foi modificada com filmes preparados de soluções contendo diferentes concentrações de CoTSPc (0,4; 0,6; 0,8; 1,0 e $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com a concentração de PLL fixa em $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, com a concentração de CoTSPc fixa, a influência da concentração de PLL no sensor (0,25; 0,4; 0,5; 0,6 e $0,75 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foi investigada. Por último, a superfície do eletrodo de carbono vítreo foi modificada com as soluções preparadas da mistura de CoTSPc e PLL que melhor responderam ao sensor.

A influência de diferentes concentrações de tampão acetato na resposta do sensor para diospirina ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), foi estudada. As concentrações analisadas foram 0,07; 0,1; 0,15 e $0,2 \text{ mol L}^{-1}$.

Por último, o efeito da velocidade de varredura e amplitude de potencial na resposta da voltametria de pulso diferencial do eletrodo modificado com CoTSPc/PLL em tampão acetato/DMSO foi estudado.

3.3.2.5.2.4. Determinação da Diospirina em VPD Utilizando Eletrodo Modificado com CoTSPc/PLL sob Condições Otimizadas

Para a determinação da diospirina utilizando eletrodo modificado com CoTSPc/PLL sob as condições otimizadas anteriormente, foram adicionadas várias alíquotas de diospirina ($2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) na cela eletroquímica contendo 5,0 mL de solução de DMSO/tampão acetato em atmosfera de nitrogênio; as análises feitas por VPD foram realizadas após a adição de cada alíquota na faixa de potencial de 0,1 a -0,3 V.

3.3.2.5.2.5. Estudos da Aplicação do Sensor e de Adição e Recuperação do Analito no Extrato Bruto da Planta *Diospyros montana* Roxb.

O sensor desenvolvido foi aplicado para a determinação de diospirina em duas amostras de soluções preparadas, conforme descrito anteriormente, do mesmo extrato clorofórmico bruto da *D. montana* Roxb [HAZRA et al., 1984; SANYAL et al., 2003] em triplicata. A concentração de diospirina foi determinada usando o método de adição de padrão interpolado com os dados obtidos na curva analítica para o sensor desenvolvido.

Para uma análise adicional da exatidão do método desenvolvido e da interferência da matriz, um experimento analítico de recuperação foi realizado em VPD, onde uma alíquota de 50 μL da solução do extrato da planta foi adicionada na célula eletroquímica contendo 5 mL da mistura de tampão acetato (0,15 mol L^{-1}) e DMSO (1:1, v/v). Em seguida, várias adições de solução padrão de diospirina, também preparada em tampão acetato (0,15 mol L^{-1}) e DMSO puro (1:1, v/v), foram feitas em cada amostra do extrato contida na célula eletroquímica. As medidas eletroquímicas feitas em VPD foram realizadas antes e depois da adição de diospirina a cada amostra do extrato em triplicata, onde os valores da densidade de corrente obtidos foram interpolados com os dados da curva analítica previamente obtida, para a obtenção das concentrações de diospirina contidas em cada amostra. A porcentagem dos valores recuperados foi calculada por comparação da concentração obtida das amostras com a atual e com as concentrações adicionadas, de acordo com a equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{concentração encontrada}}{\text{concentração esperada}} \times 100 \quad \text{eq. (01)}$$

3.3.2.6. Estudo da Interação da Diospirina com Zn^{2+}

A análise eletroquímica foi realizada em VPD, utilizando eletrodo de carbono vítreo em meio tamponado (tampão acetato, pH 4,5), através da adição de várias alíquotas de uma solução estoque de diospirina ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) [posteriormente seus análogos - diospirina metilada (D-2), 2-metilnaftoquinona e juglona] preparada como descrito anteriormente, para a obtenção das concentrações mostradas na **Tabela 2**, em 5,0 mL de solução aquosa de Zn^{2+} ($1,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) dispostos em uma cela eletroquímica. Foi observada a variação do potencial de redução do Zn^{2+} após a adição de cada alíquota de diospirina.

Tabela 2: Proporções relativas à adição de diospirina a 5,0 mL de solução aquosa de Zn^{2+} .

Concentração			
C_n	Diospirina (mol L^{-1})	Zn^{2+} (mol L^{-1})	Proporção
C_1	$1,560 \times 10^{-6}$	$1,25 \times 10^{-5}$	1:8
C_2	$3,125 \times 10^{-6}$	$1,25 \times 10^{-5}$	1:4
C_3	$6,250 \times 10^{-6}$	$1,25 \times 10^{-5}$	1:2
C_4	$1,250 \times 10^{-5}$	$1,25 \times 10^{-5}$	1:1
C_5	$1,875 \times 10^{-5}$	$1,25 \times 10^{-5}$	1,5:1
C_6	$2,500 \times 10^{-5}$	$1,25 \times 10^{-5}$	2:1
C_7	$3,125 \times 10^{-5}$	$1,25 \times 10^{-5}$	2,5:1

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Voltametria Cíclica

O voltamograma cíclico da diospirina, em meio misto [DMSO/tampão acetato pH* 5,4 (1:1, v/v)] evidenciou a presença de pelo menos duas ondas de redução consecutivas, $E_{p_c} = -0,15$ e $-0,35$ V, em $\nu = 100$ mV s⁻¹, de intensidades muito diferentes. Estas ondas são referentes à redução dos grupamentos quinônicos presentes na estrutura da molécula, (**Figura 26**) [JACQ, 1967]. A análise pormenorizada do mecanismo de redução foge ao alcance deste trabalho, que tem perspectiva eletroanalítica, daí, os estudos de variação de velocidade de varredura [DE ABREU et al., 2005] e outros não foram realizados.

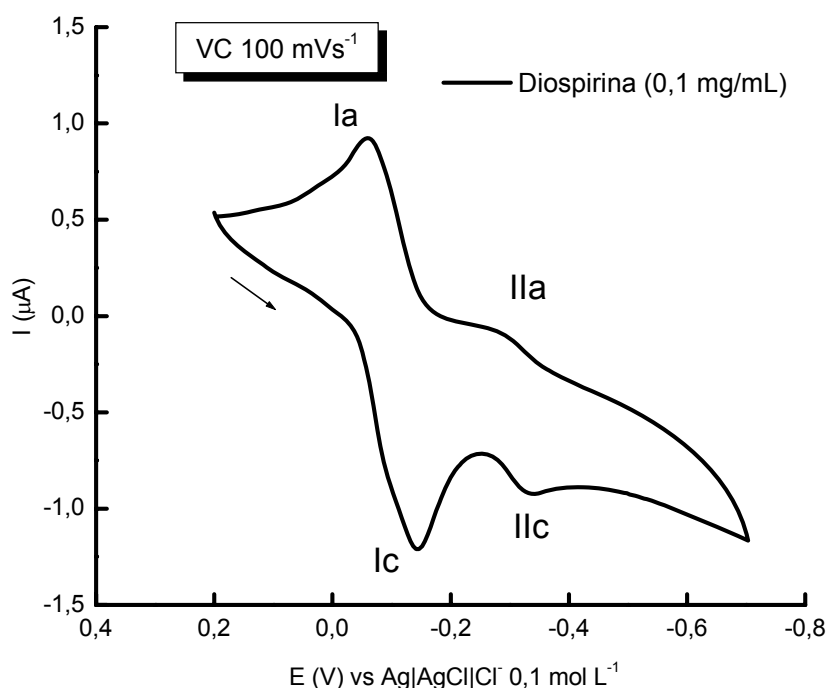


Figura 26. VC da diospirina, $c = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ($2,67 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$. Eletrólito suporte: DMSO/tampão acetato pH* 5,4 (1:1, v/v). Eletrodo de carbono vítreo.

4.2. Voltametria de Onda Quadrada

Como na voltametria cíclica, a VOQ da diospirina evidenciou a presença de várias ondas de redução, com uma delas mais intensa. A presença da correspondente anódica é indício de reversibilidade ou quasi-reversibilidade do sistema. Devido à proximidade das ondas, com obtenção de ondas compostas e complexas, o método não foi utilizado para uma análise mais aprofundada. A **Figura 27** mostra o voltamograma de redução da diospirina a 100 Hz.

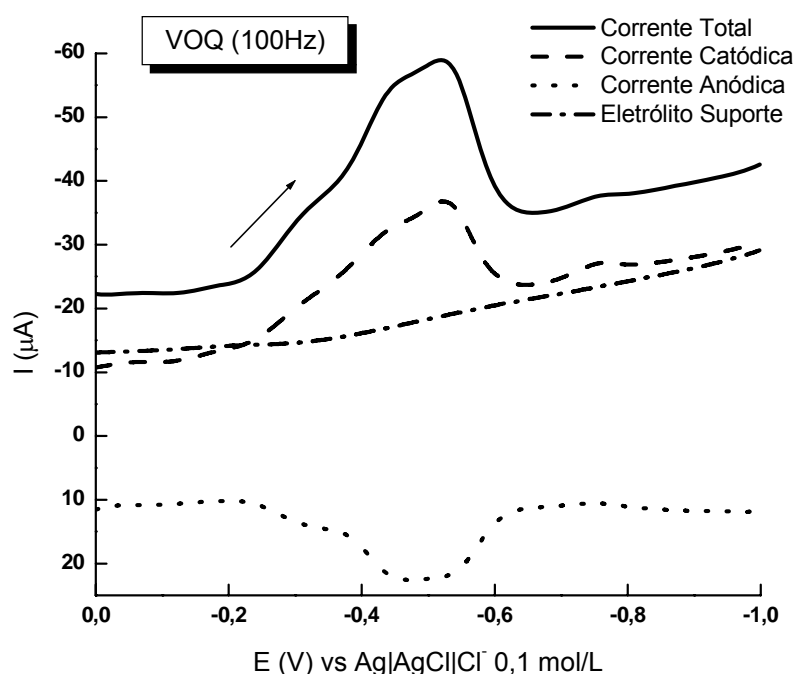


Figura 27. VOQ da diospirina, $c = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ($2,67 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), $f = 100 \text{ Hz}$. Eletrólito suporte: DMSO/tampão acetato pH* 5,4 (1:1, v/v). Eletrodo de carbono vítreo.

4.3. Voltametria de Pulso Diferencial

A análise da diospirina em VPD evidenciou a presença de três ondas de redução (**Figura 28**), referentes aos grupos quinônicos presentes na molécula, $E_{p_c} = -0,08 \text{ V}$ (I), $-0,15 \text{ V}$ (II) e $-0,38 \text{ V}$ (III), $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$. Como comentado anteriormente,

não houve determinação do mecanismo eletroquímico de redução. Desta forma, a análise da diospirina nas três técnicas eletroquímicas (**Figuras 26, 27 e 28**) possibilitou a escolha do melhor método para a quantificação tendo em vista o aspecto da onda apresentada. Neste caso, a VPD se revelou a melhor técnica para esse tipo de análise, tendo em vista a mesma apresentar uma melhor separação (definição) das ondas de redução para a diospirina.

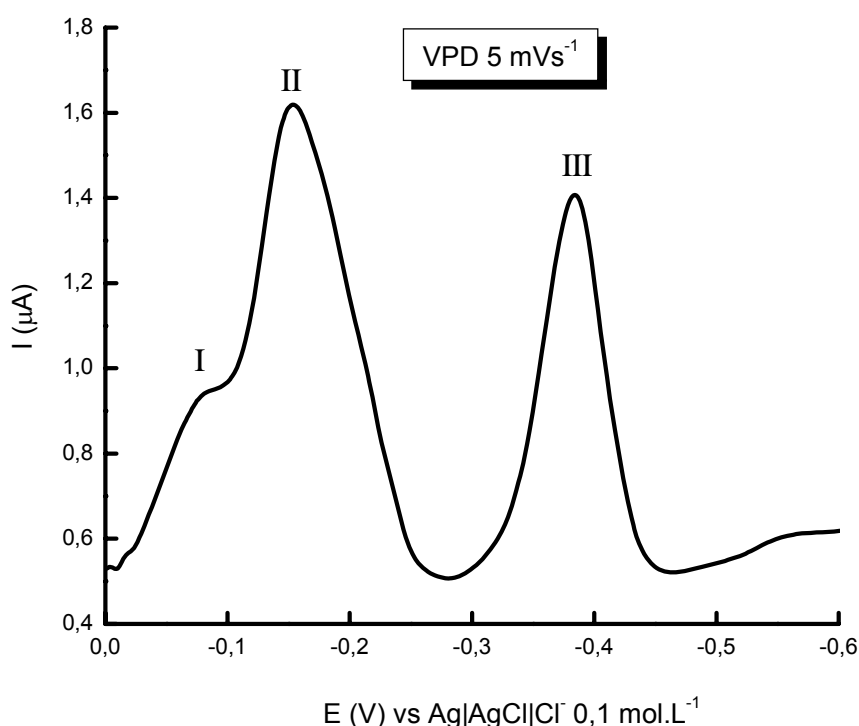


Figura 28. VPD da diospirina, $c = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ($2,67 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. Eletrólito suporte: DMSO/tampão acetato pH* 5,4 (1:1, v/v). Eletrodo de carbono vítreo.

4.3.1. Quantificação da Diospirina por VPD

A diospirina pôde ser quantificada eletroquimicamente (5 mV s^{-1}) utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial. Uma curva analítica foi obtida através da variação da concentração da mesma (**Figura 29**), a qual pode ser representada pela equação abaixo:

$$i_p (\mu\text{A}) = -0,12653 (\pm 0,02) + 0,13859 (\pm 0,003) \times [\text{diospirina}] (\mu\text{g mL}^{-1}) \quad \text{eq. (02)}$$

com coeficiente de correlação de 0,9989 (para $n = 5$) (**Figura 30**). A curva analítica foi confeccionada para a terceira onda de redução, devido à mesma possuir uma melhor definição da onda. Tratamento paralelo foi realizado com a segunda onda de redução, o qual apresentou um coeficiente de correlação ($r = 0,9864$) inferior àquele obtido para a terceira onda. A otimização dos parâmetros não foi realizada nesta análise.

Na maioria dos casos, a análise de substâncias com potenciais de redução mais positivos é importante, devido a poucos grupos (interferentes) se reduzirem em potenciais pouco negativos. De modo geral, quanto mais positiva a onda de redução do analito melhor, pois permite maior seletividade na medida.

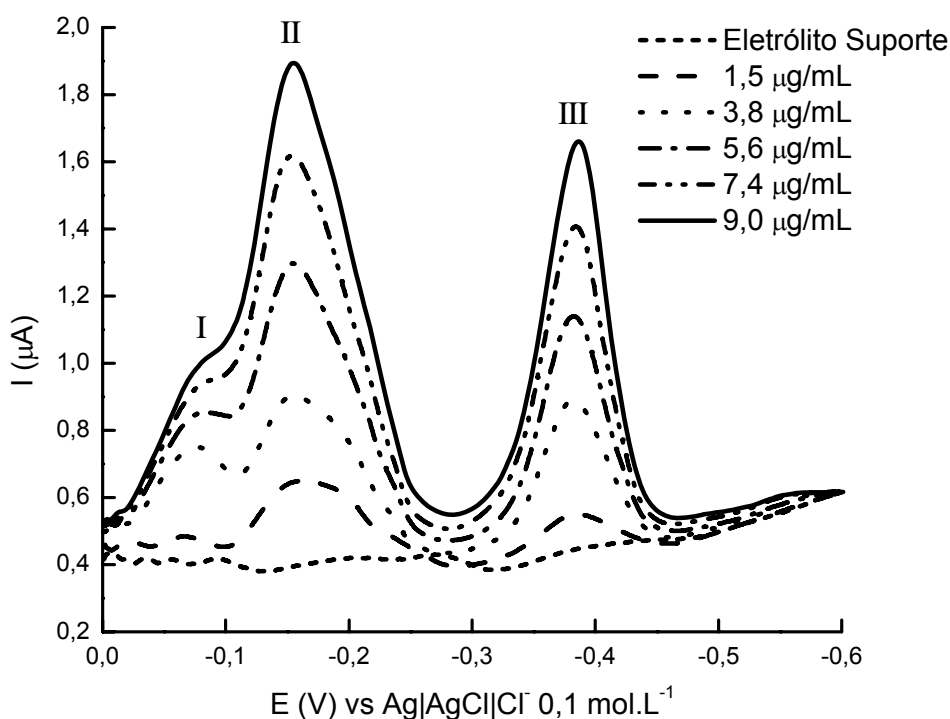


Figura 29. Gráfico da variação da concentração da diospirina em VPD.

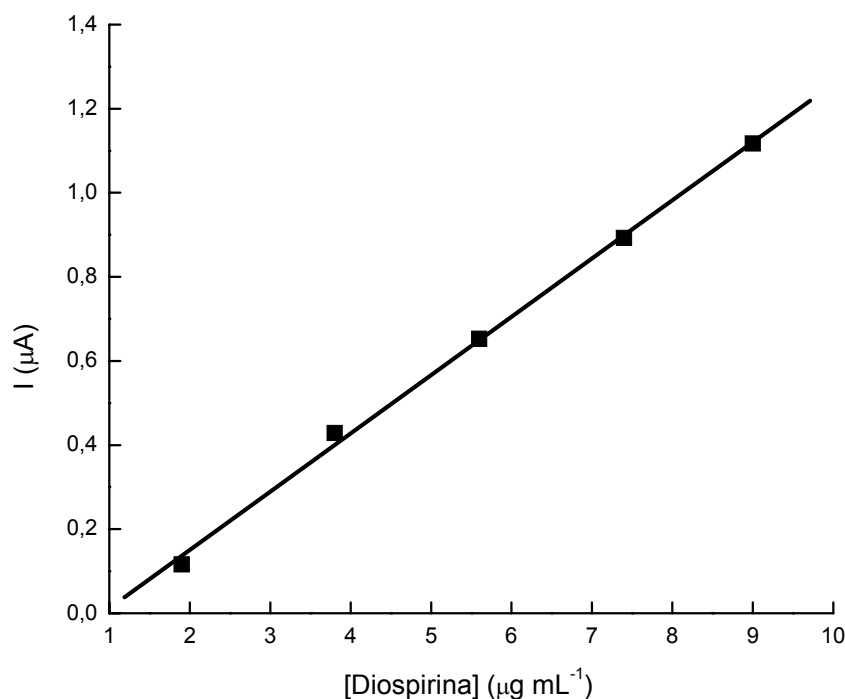


Figura 30. Curva analítica da diospirina para a corrente III em VPD.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) [OLIVEIRA e MACHADO, 2004] para diospirina em eletrodo de carbono vítreo limpo foram de $0,45 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($1,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), respectivamente; porém, com o uso de eletrodos quimicamente modificados, pôde-se obter limites de detecção e quantificação melhores que o encontrado para o eletrodo de carbono vítreo não modificado, uma vez que esse tipo de eletrodo promove uma transferência eletrônica mais rápida entre o eletrodo e a substância, conforme descrito mais adiante.

4.4. Análise Espectroscópica

Nos espectros eletrônicos da diospirina na região do UV-VIS (**Figura 31**), foi observada a presença de uma banda de absorção larga situada na região entre 400 e 500 nm, com o máximo da banda de absorção em 439 nm. Para avaliar a estabilidade da diospirina, com relação à decomposição fotoquímica, foi feita análise espectrofotométrica no sentido de verificar a estabilidade química da mesma em

relação à exposição à luz, uma vez conhecido que, geralmente, as quinonas são fotossensíveis.

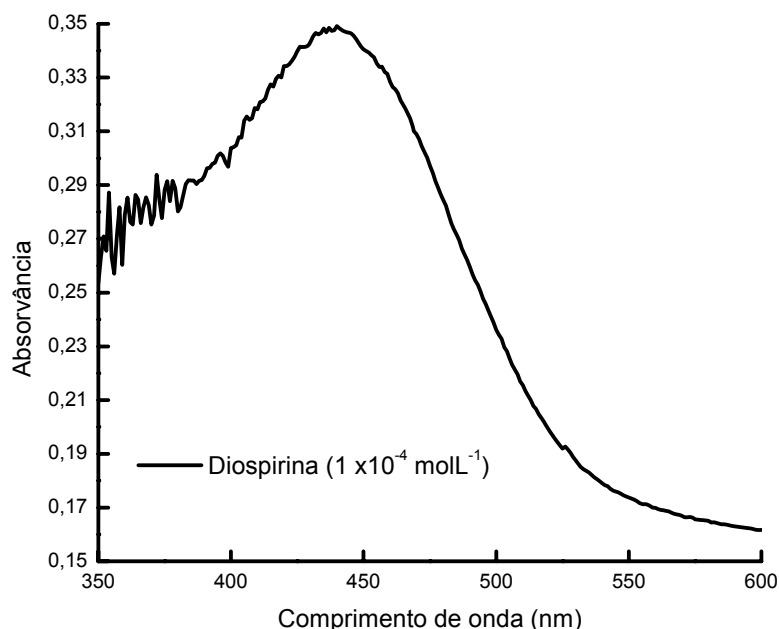


Figura 31. Espectro de absorção da diospirina em DMSO/tampão acetato (1:1, v/v) pH* 5,4.

4.4.1. Variação do Tempo de Exposição da Diospirina à Luz Ambiente

Os resultados observados nesse experimento (**Figura 32**) mostraram que a banda de absorção do espectro da diospirina variou (~28%) com o tempo de exposição, demonstrando relativa instabilidade fotoquímica da mesma em relação ao tempo de exposição à luz no decorrer dos 120 minutos em que o experimento foi analisado. Esse resultado foi de grande importância, no sentido de que os dados eletroquímicos obtidos, estão condizentes com o que foi explicado, tendo em vista que foram tomadas as precauções necessárias para a realização dos experimentos, em relação à exposição da diospirina a luz ambiente, com o intuito de minimizar a sua degradação fotoquímica.

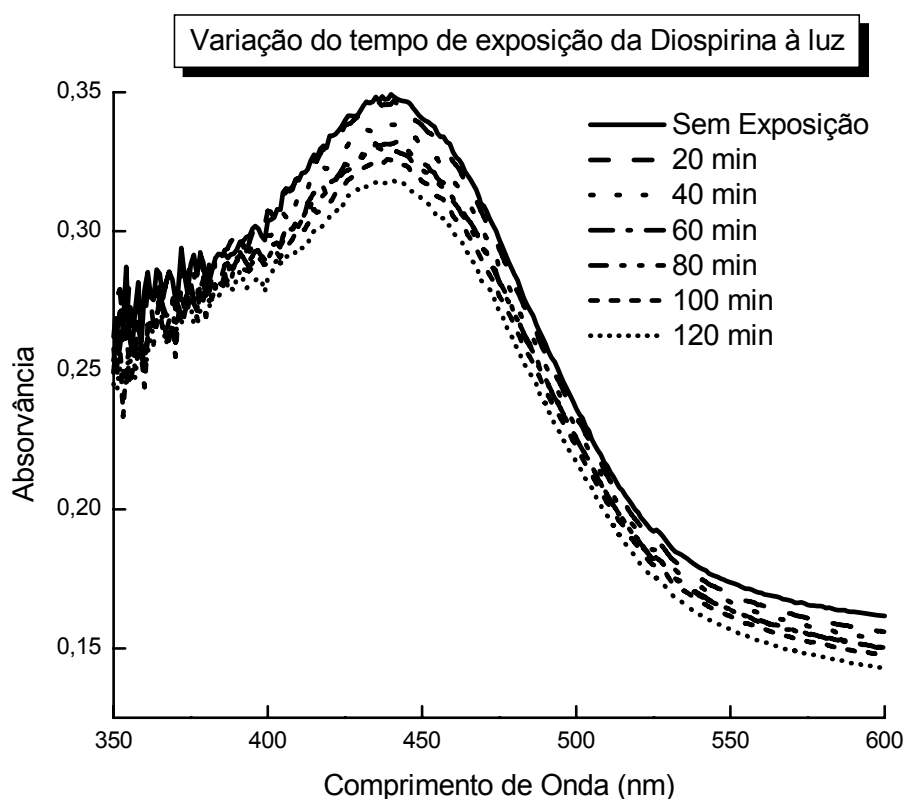


Figura 32. Espectro de absorção da diospirina em relação ao tempo de exposição à luz ambiente.

4.5. Eletrodos Modificados

4.5.1. Estudo Eletroquímico da interação da Diospirina com DNA com o uso do biossensor de dsDNA (Eletrodos Modificados com DNA)

O biossensor de dsDNA é caracterizado pela ausência de picos de oxidação devido às bases estarem protegidas por pontes de hidrogênio, dificultando a sua oxidação [LA-SCALEA et al., 1999]. Após a adição da diospirina ao biossensor de dsDNA, pôde-se observar que apareceram pequenas correntes na região da oxidação (**Figura 34**) referentes à interação da diospirina com o DNA, com

modificação da conformação do mesmo e exposição das bases [WU et al., 2000], passíveis, agora, de serem oxidadas, tendo em vista que não há interação entre o eletrólito suporte (DMSO/tampão) e o DNA (**Figura 33**).

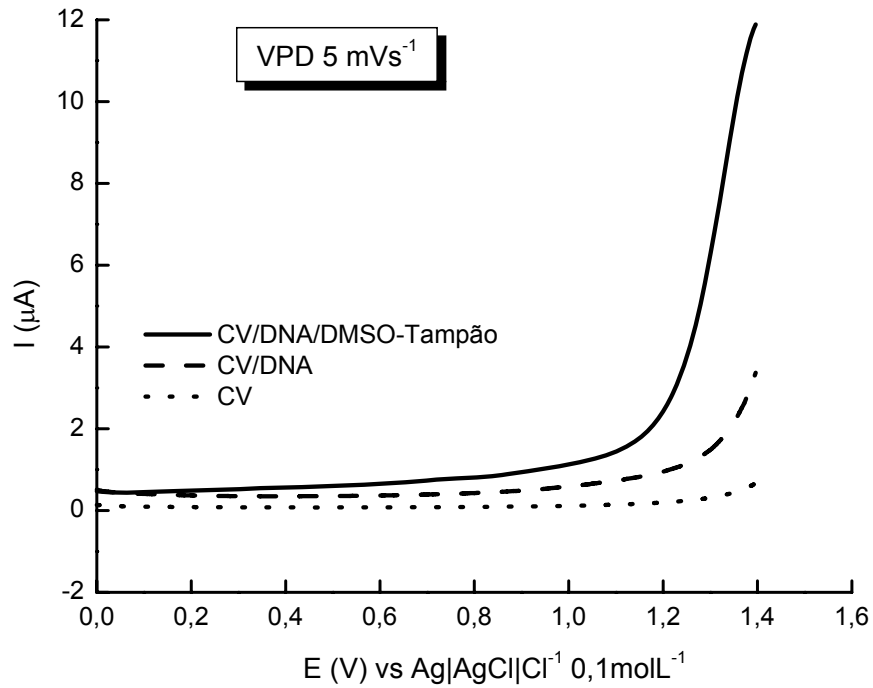


Figura 33. Gráfico do comportamento eletroquímico do eletrodo de Cv limpo e modificado com DNA na presença e ausência de DMSO/tampão, em tampão acetato, pH 4,5.

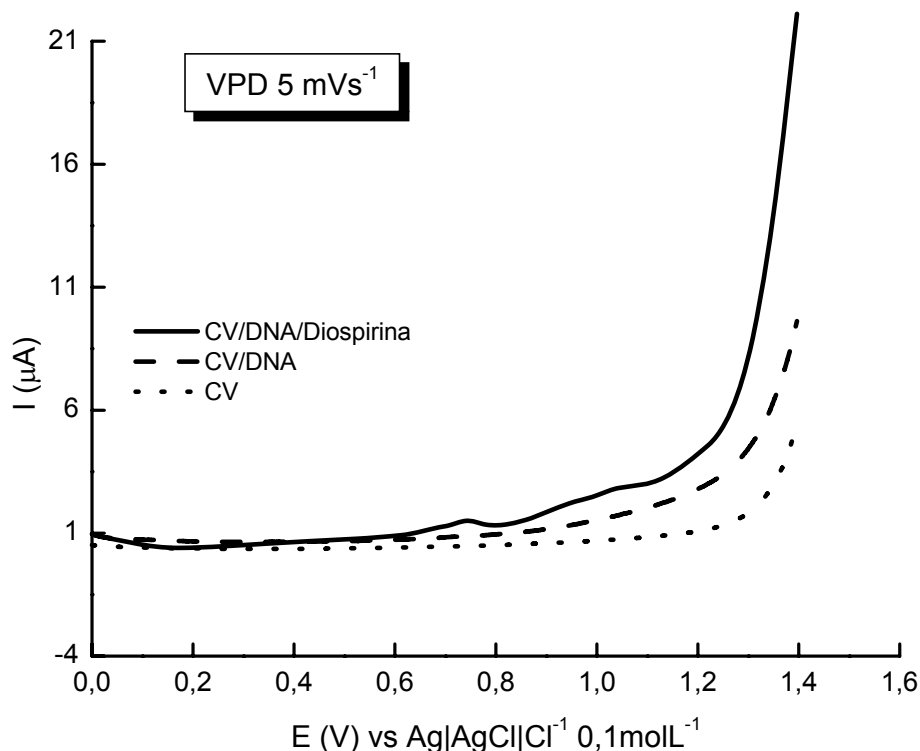


Figura 34. Gráfico do comportamento eletroquímico do eletrodo de Cv limpo e modificado com DNA na presença e ausência de diospirina ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), em solução de tampão acetato, pH 4,5.

A diospirina não apresenta pico de oxidação, porém, em contato com o biossensor, foi observada, após 24 horas de contato e protegido da luz, a presença de um pico de oxidação no potencial de 0,742 V e uma onda larga entre os potenciais 0,908 e 1,088 V. Esses picos são característicos dos picos de oxidação das bases guanina ($\sim 0,8 \text{ V}$) e adenina ($\sim 1,0 \text{ V}$), respectivamente [WU et al., 2000; LA-SCALEA et al., 1999]. Este resultado é um indício de que a diospirina interage com a molécula do DNA, agindo de forma que as ligações de hidrogênio entre as bases A•T e G•C são quebradas, expondo desta forma as mesmas a oxidação. Outros experimentos com o biossensor serão realizados com o intuito de se verificar melhor essa interação e também observar que espécie irá ser formada após a oxidação dessas bases, resultado esse que pode ser muito importante na elucidação do mecanismo de ação da diospirina, que após sua redução *in vivo* pode agir como um fármaco.

4.5.2. Eletrodos Modificados com Complexos Metálicos

Na análise da interação da diospirina com alguns complexos metálicos, o complexo que mostrou uma resposta estável frente à redução de diospirina foi o de Ftalocianina Tetrassulfonada de Cobalto (CoTSPc), o qual foi o único dos complexos testados que apresentou uma resposta catalítica para a redução da mesma. Diante disso, não foram feitas mais análises com os outros complexos testados (pág. 35), tendo em vista que o sensor não era estável o bastante para ser analisado com a diospirina no meio escolhido. Foram feitas, também, análises do complexo escolhido (CoTSPc) em eletrodo de pasta de carbono misturada com sílica modificada com antimônio. Os testes foram satisfatórios, porém, devido à difícil reprodutibilidade desse tipo de eletrodo, as análises não foram levadas adiante.

4.5.2.1. Estudo da Redução Eletrocatalítica da Diospirina no Eletrodo Modificado

Este estudo foi feito com o intuito de observar se havia ou não catálise na reação de redução da diospirina com o eletrodo modificado. A **Figura 35** mostra os voltamogramas cíclicos obtidos em DMSO/tampão acetato (1:1, v/v) pH* 5,4 para o eletrodo limpo (a) e o eletrodo modificado com CoTSPc (b) na ausência de diospirina. Para comparação, esta figura também apresenta o comportamento do eletrodo modificado apenas com PLL (d), eletrodo limpo (c) e modificado com CoTSPc (e), na presença de diospirina.

A **Figura 35** (b) mostra uma onda voltamétrica em $\sim -0,160$ V, muito provavelmente associada com a redução da espécie imobilizada $[\text{Co(II)TSPc}]^{2-}$ em $[\text{Co(I)TSPc}]^{3-}$. Esta redução ocorre no centro metálico dos complexos de ftalocianina de cobalto (II), conforme registros anteriores na literatura [ZAGAL et al., 1992; LEVER et al., 1993]. As **Figuras 35** (d) e (c) mostram ondas voltamétricas da diospirina em eletrodo modificado somente com PLL e eletrodo de carbono vítreo limpo, respectivamente. As respostas voltamétricas foram similares e o eletrodo modificado apenas com PLL não promove a redução catalítica da diospirina. Nesta

faixa de potencial, a diospirina apresenta dois pares redox: $E_{pl_c} = -0,05 \text{ V}$ e $E_{pl_a} = 0,00 \text{ V}$ e $E_{pll_c} = -0,160 \text{ V}$ e $E_{pll_a} = -0,100 \text{ V}$.

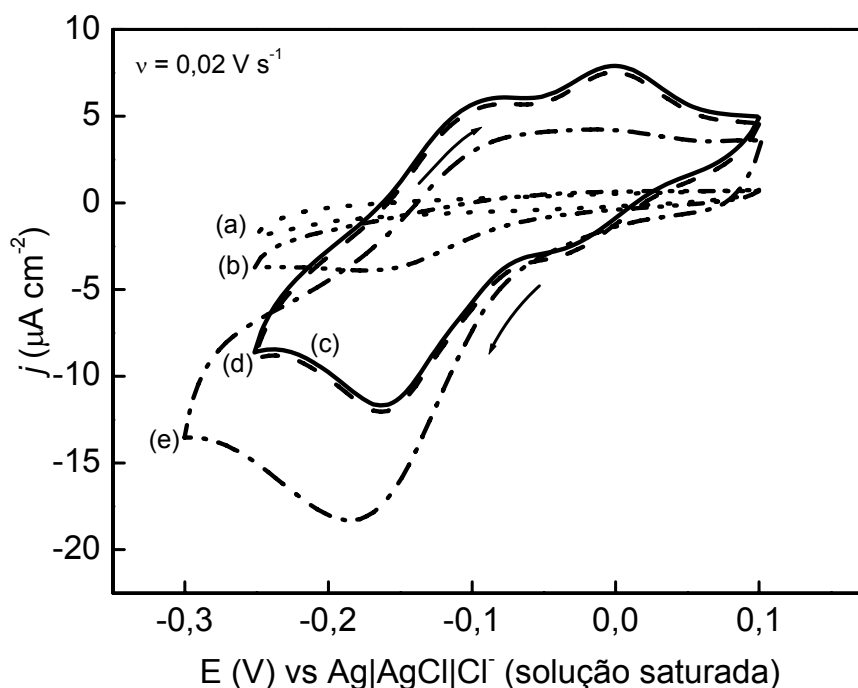


Figura 35. Voltamogramas cíclicos ($v = 0,02 \text{ V s}^{-1}$, $a = 0,01 \text{ V}$) realizados em tampão acetato + DMSO (1:1, v/v) pH* 5,4 para o eletrodo de carbono vítreo limpo na ausência (a) e presença (c) de diospirina, eletrodo modificado apenas com PLL na presença de diospirina (d) e eletrodo modificado com CoTSPc/PLL na ausência (b) e presença de diospirina (e). $[\text{Diospirina}] = 2,67 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Estes pares redox podem estar associados com a redução e oxidação de um dos grupos quinônicos presentes na diospirina, levando à hidroquinona correspondente. O primeiro par redox formado estaria associado com a diospirina adsorvida. Por outro lado, o último par redox pode ser atribuído a diospirina dissolvida. A investigação completa do mecanismo redox encontra-se em realização. Na **Figura 35** (e), um aumento significativo na corrente do segundo pico catódico ($-0,160 \text{ V}$) foi observado no eletrodo modificado com CoTSPc e PLL. O aumento neste potencial de redução causou o desaparecimento do pico catódico em $-0,050 \text{ V}$, indicando que o filme pode suprimir a adsorção da diospirina na superfície do eletrodo. O aumento na corrente de pico foi de aproximadamente 60% (calculado conforme disposto no BARD para sistemas irreversíveis) da corrente de pico medida

no eletrodo limpo (**Figura 35c**) na presença de diospirina. Por essa razão, a alta atividade do eletrodo de carbono vítreo modificado para a redução de diospirina em solução pode estar associada com a baixa resistência na transferência de carga do filme CoTSPc/PLL e da presença de $[\text{Co(II)TSPc}]^{2-}$ como sítios eletroativos.

4.5.2.2. Estudo da Influência das Concentrações de CoTSPc, PLL e Tampão Acetato e da Velocidade de Varredura e Amplitude de Potencial na Resposta do Sensor (Otimização)

Os resultados do estudo da influência das concentrações de CoTSPc e PLL na resposta do sensor indicaram que as melhores respostas foram obtidas com a solução de CoTSPc de $0,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (**Tabela 3**) e para PLL com a concentração de $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (**Tabela 4**). Baixas concentrações de PLL produziram padrões de comportamento menos estáveis e menor corrente de pico, o que foi atribuído a saída do CoTSPc do filme de PLL para a solução, uma vez que, em certas condições, a quantidade de PLL pode ser insuficiente para a imobilização do CoTSPc. Em conclusão, superfícies de carbono vítreo modificadas por soluções preparadas de uma mistura de CoTSPc ($0,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e PLL ($0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), permitiram obter eletrodos quimicamente modificados com boa sensibilidade, repetibilidade e estabilidade. Estas foram, portanto, as concentrações escolhidas para a preparação do filme.

Tabela 3: Influência da concentração de CoTSPc usada na preparação do filme, na densidade da corrente de pico obtida com o sensor para diospirina ($5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão acetato + DMSO ($\text{pH}^* 5,4$) e PLL ($0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), $v = 0,02 \text{ V s}^{-1}$ e $a = 0,09 \text{ V s}^{-1}$.

[CoTSPc] (mmol L ⁻¹)	-j (nA cm ⁻²)
0,40	1742
0,60	1830
0,80	1124
1,00	899
1,50	729

Tabela 4: Influência da concentração de PLL usada na preparação do filme, na densidade da corrente de pico obtida com o sensor para diospirina nas mesmas condições relatadas na **Tabela 3**, $[\text{CoTSPc}] = 0,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

[PLL] (mmol L ⁻¹)	-j (nA cm ⁻²)
0,25	1200
0,40	1313
0,50	1832
0,60	1296
0,75	1245

Nas análises da influência das diferentes concentrações do tampão acetato, uma melhor resposta do sensor foi obtida com a concentração de tampão acetato de $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ (**Tabela 5**). Neste sentido, a concentração de $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ foi escolhida para os demais experimentos com o sensor.

Tabela 5: Influência da concentração do tampão acetato + DMSO (1:1, v/v) na densidade da corrente de pico obtida por VPD com o sensor para diospirina ($5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), $[\text{CoTSPc}] = 0,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{PLL}] = 0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $v = 0,02 \text{ V s}^{-1}$ e $a = 0,09 \text{ V s}^{-1}$.

[Acetato] (mol L ⁻¹)	-j (nA cm ⁻²)
0,07	1830
0,10	2049
0,15	3410
0,20	2710

Nas análises, em VPD, do efeito da velocidade de varredura e amplitude de potencial na resposta do sensor, foi verificada que a proporção entre os valores da corrente de pico /largura à meia altura da corrente de pico ($j_p / W_{1/2}$, $\mu\text{A cm}^{-2} \text{ V}^{-1}$) apresentou um aumento linear com a variação da velocidade de varredura de $0,005$ a $0,035 \text{ V s}^{-1}$ (**Figura 36a**). Por outro lado, em velocidade de varredura $>0,035 \text{ V s}^{-1}$, os valores de corrente de pico permanecem quase constantes, acompanhado pelo alargamento e distorção dos picos. Desta forma, a velocidade de $0,035 \text{ V s}^{-1}$ foi escolhida para os demais experimentos, por apresentar o melhor perfil com maior

sensibilidade. Os valores da corrente de pico também variaram com a amplitude de 0,005 a 0,100 V (**Figura 36b**), aplicada a VPD na velocidade de varredura $0,035 \text{ V s}^{-1}$ para o eletrodo modificado. O uso de amplitudes $>0,090 \text{ V}$ levou a valores de corrente de pico quase constantes e a um aumento na corrente capacitiva. Neste sentido, a melhor sensibilidade voltamétrica foi obtida com $0,090 \text{ V}$ e conseqüentemente, este valor foi escolhido para estudos adicionais. Como pode ser visto, a corrente de pico aumenta rapidamente com o aumento da amplitude e do “step potential” (velocidade de varredura), entretanto, quando baixas amplitudes e “step potential” são usados, a resposta diminui, bem como, quando valores muito altos de amplitude e “step potential” são utilizados [PARRY e OSTERYOUNG, 1965]. Este comportamento foi verificado por outros pesquisadores e foi atribuído a relação exponencial que existe entre a densidade de corrente com a amplitude e o “step potential” [RIFKIN e EVANS, 1976].

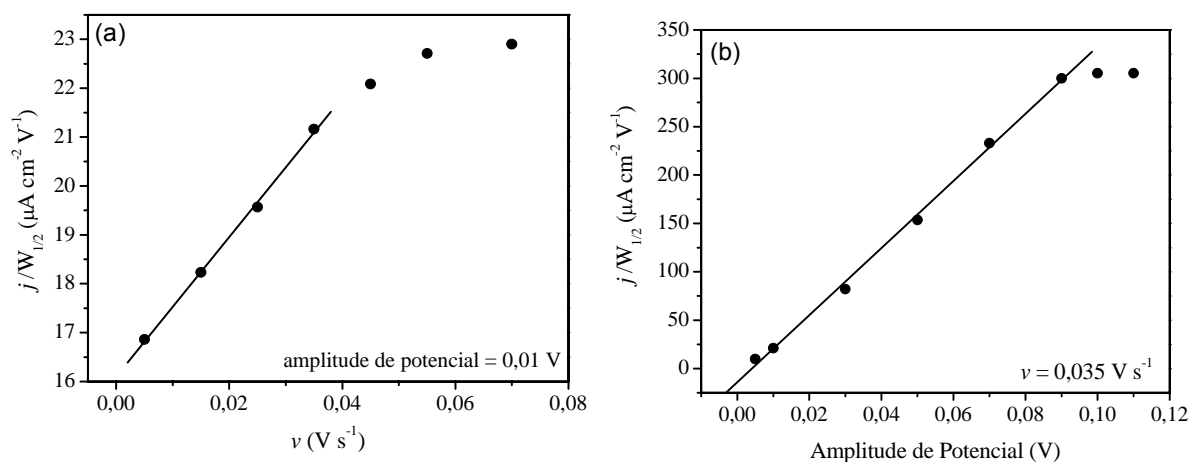


Figura 36. (a) Corrente vs velocidade de varredura (v), com amplitude fixa ($0,01 \text{ V}$). (b) Corrente vs amplitude de potencial, com a velocidade de varredura fixa ($0,035 \text{ V s}^{-1}$). Eletrodo modificado com CoTSPc/PLL sob condições otimizadas.

4.5.2.3. Determinação da Diospirina em VPD Utilizando Eletrodo Modificado com CoTSPc/PLL sob Condições Otimizadas

Sob condições otimizadas, com a finalidade de obter uma curva analítica para o sensor desenvolvido, voltamogramas de pulso diferencial para redução da

diospirina foram realizados nas diferentes concentrações em solução de $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão acetato + DMSO (1:1, v/v) em pH* 5,4. O sensor proposto mostrou uma boa resposta linear na faixa de 1 a 120 nmol L^{-1} (**Figuras 37 e 38**), o que pode ser representado pela seguinte equação:

$$j_p (\mu\text{A cm}^{-2}) = 0,8 (\pm 0,2) + 220,5 (\pm 2,8) \times [\text{diospirina}] (\mu\text{mol L}^{-1}) \quad \text{eq. (03)}$$

com um coeficiente de correlação de 0,999 (para $n = 10$) e sensibilidade de $220,46 \text{ nA L nmol L}^{-1} \text{ cm}^{-2}$. Desta forma, a boa sensibilidade pode ser atribuída à eficiência da transferência eletrônica entre o eletrodo modificado e a diospirina devido ao efeito catalítico e a baixa resistência na transferência de carga do filme. Um limite de detecção (LD) de $0,3 \text{ nmol L}^{-1}$ foi determinado usando a proporção $3\sigma/\text{inclinação}$ e o limite de quantificação (LQ) foi de $1,0 \text{ nmol L}^{-1}$ usando $10 \sigma / \text{inclinação}$, onde σ é o desvio padrão (SD) do valor médio para 10 voltamogramas do branco [OLIVEIRA e MACHADO, 2004], determinado de acordo com as recomendações da IUPAC [Analytical Methods Committee, 1987].

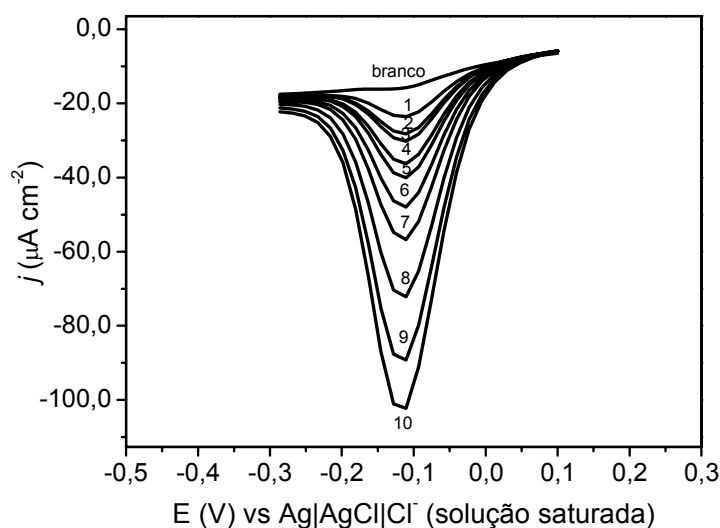


Figura 37. Variação da concentração de diospirina em VPD sob condições otimizadas para o preparo do sensor para diospirina: (1) 1,0; (2) 6,76; (3) 10,4; (4) 17,4; (5) 23,8; (6) 35,4; (7) 50,2; (8) 73,0; (9) 103,0 e (10) $120,0 \text{ nmol L}^{-1}$. Velocidade de varredura = $0,035 \text{ V s}^{-1}$ e amplitude de potencial = $0,090 \text{ V}$.

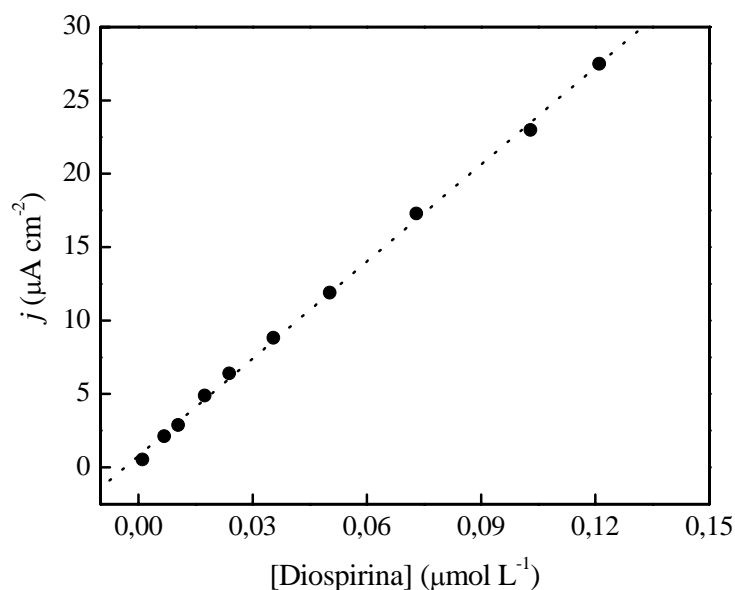


Figura 38. Curva analítica obtida por VPD para determinação de diospirina com eletrodo modificado com CoTSPc/PLL sob condições otimizadas nas concentrações descritas na **Figura 37**.

A estabilidade do eletrodo modificado com o filme de CoTSPc/PLL foi estabelecida pela análise sucessiva de voltamogramas cíclicos. Após 80 ciclos, nenhuma mudança foi observada no perfil voltamétrico do eletrodo modificado. Mesmo na presença de diospirina, o eletrodo modificado permaneceu estável e os voltamogramas foram reproduzíveis até 80 ciclos sucessivos (**Figura 39**). Além do mais, nenhuma mudança significativa na resposta da corrente foi observada nos experimentos realizados com o eletrodo modificado guardado ao ar livre por 1 mês.

O eletrodo modificado apresentou uma boa repetibilidade para determinações de diospirina. O desvio padrão relativo (RSD) da corrente de pico para 10 determinações em soluções contendo diospirina ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi de 4,4%. Estes experimentos indicam que eletrodos de carbono vítreo modificados com filmes de CoTSPc/PLL têm uma boa estabilidade e repetibilidade, provavelmente associados com a habilidade da PLL de fixar e proteger a molécula de CoTSPc na superfície do eletrodo através de fortes interações eletrostáticas [PONOMARENKO et al., 1996].

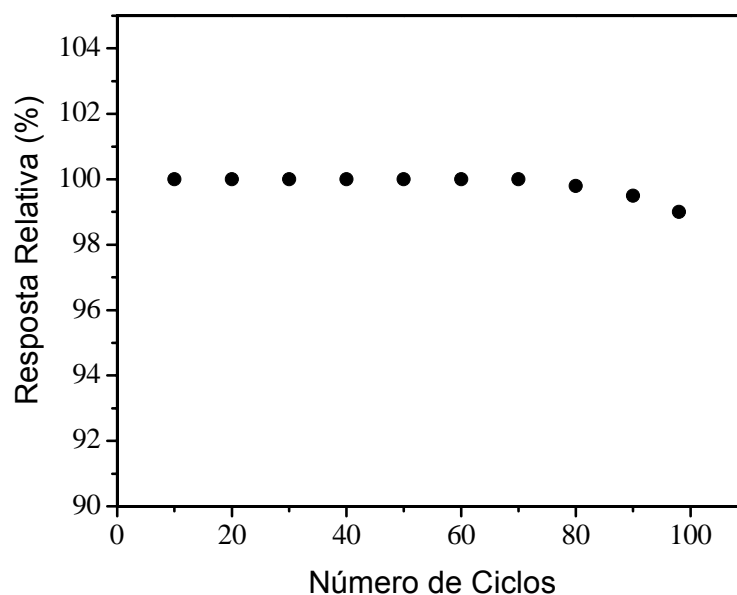


Figura 39. Resposta relativa (%) em função do número de ciclos, em voltametria cíclica, analisadas sob as mesmas condições em que a curva analítica (**Figura 38**) foi confeccionada.

4.5.2.4. Estudos da Aplicação do Sensor e de Adição e Recuperação do Analito no Extrato Bruto da Planta *Diospyros montana* Roxb.

Este método foi aplicado para determinação de diospirina em duas amostras do mesmo extrato clorofórmico bruto da *D. montana* Roxb. em triplicata (**Tabela 7**). As amostras apresentaram valores de 20,2 ($\pm 3,0$) ng g⁻¹ e 36,3 ($\pm 1,9$) ng g⁻¹, respectivamente. A concentração de diospirina foi determinada usando o método de adição de padrão. Os resultados mostraram que o método eletroanalítico é muito efetivo para determinação de diospirina em baixos níveis de detecção, obtendo-se resultados similares aos dados dos métodos analíticos mais usuais, como o HPTLC e o RPLC (**Tabela 6**) [SANYAL et al., 2003; RAVISHANKARA et al., 2000], tendo como principal destaque, a ausência de etapas de preparação da amostra nas análises do extrato da planta *D. montana* Roxb., etapas essas observadas em HPTLC e RPLC.

Tabela 6: Comparação entre LDs e LQs obtidos para a diospirina entre os métodos mais usuais e o método eletroanalítico desenvolvido.

LDs e LQs Obtidos pelos Métodos Analíticos mais usuais e o Eletroanalítico para a Diospirina		
Método Analítico	LD (nmol L⁻¹)	LQ (nmol L⁻¹)
Eletroanalítico	0,3	1,0
HPTLC	0,08	0,267
RPLC	0,021	0,053

O estudo da recuperação para as amostras é mostrado na **Tabela 7**, como uma análise adicional em relação à interferência da matriz. Observa-se, claramente, que as matrizes não influenciaram na resposta do sensor.

Tabela 7: Adição e recuperação de diospirina em duas amostras do extrato bruto (n = 3) obtidas com o eletrodo modificado.

Amostras	Diospirina Adicionada (nmol L⁻¹)	Diospirina Esperada (nmol L⁻¹)	Diospirina Encontrada (nmol L⁻¹)	Diospirina Encontrada (ng g⁻¹)	Recuperação (%)
A	0	-	54 (± 8)	20,2 (± 3,0)	-
	100	154	160 (± 14)		103,9 (± 7,0)
B	0	-	97 (± 5)	36,3 (± 1,9)	-
	100	197	196 (± 22)		99,5 (± 8,1)

4.6. Estudo Eletroquímico da Interação de Diospirina com Zn²⁺ em VPD

Este estudo foi aplicado com o intuito de analisar a complexação da diospirina com íons Zn²⁺ em VPD, através da adição de quantidades inferiores e superiores de diospirina em relação à quantidade de zinco presente em solução (**Tabela 2**). Esse estudo tem como objetivo observar a interação entre diospirina e zinco através do deslocamento do potencial de redução referente à diospirina e desta forma

determinar através de cálculos analíticos a estequiometria da complexação entre a diospirina e Zn^{2+} , tendo em vista que a mesma apresenta uma série de grupos hidroxila e é um agente inibidor da enzima topoisomerase I [RAY et al., 1998], que tem como centro metálico o átomo de zinco [PLYTA et al., 1998]. Porém, não foi observada mudança no potencial de redução da diospirina (**Figura 40**), mas um aumento significativo na corrente de redução referente ao Zn^{2+} , como também o deslocamento do potencial de redução do mesmo (**Figura 41**). Inicialmente, esse aumento foi atribuído à interação da molécula de diospirina com o íon Zn^{2+} . Porém, foram realizados vários experimentos com vários análogos da diospirina com o intuito de determinar qual dos grupos funcionais da mesma promovia tal interação. Todavia, como todos os análogos da diospirina apresentaram comportamentos idênticos à mesma, o que não deveria ocorrer tendo em vista que cada um possui um grupo funcional diferente, foi realizada uma análise em que foi adicionado apenas o tampão acetato. Desta forma, teve-se a suposição de que a interação na verdade, ocorria entre o tampão acetato e o íon Zn^{2+} , não sendo observada, portanto, a interação com a substância alvo.

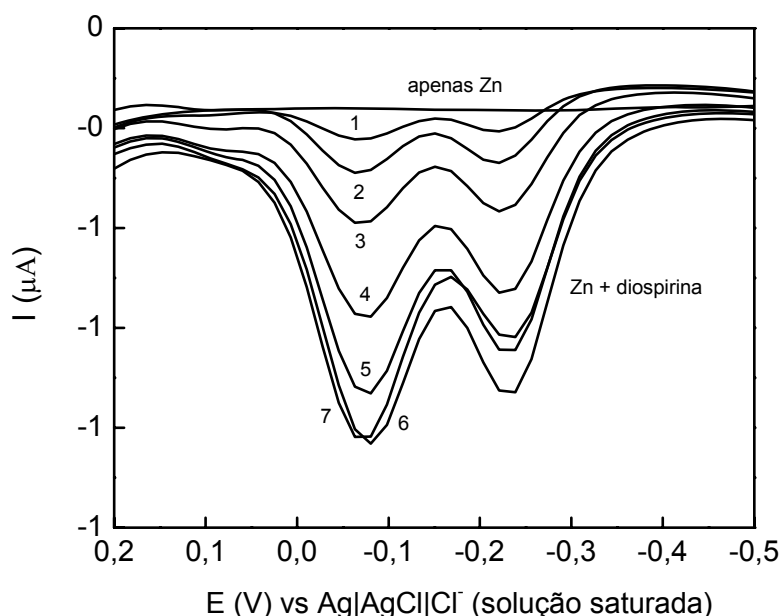


Figura 40. Análise em VPD da interação entre diospirina e Zn^{2+} , estabelecida através de adições de quantidades inferiores e superiores de diospirina em relação à de zinco presente em solução (**Tabela 2**), sem nenhuma mudança significativa observada no potencial de redução da diospirina.

$$v = 0,035 \text{ V s}^{-1}, a = 0,09 \text{ V}.$$

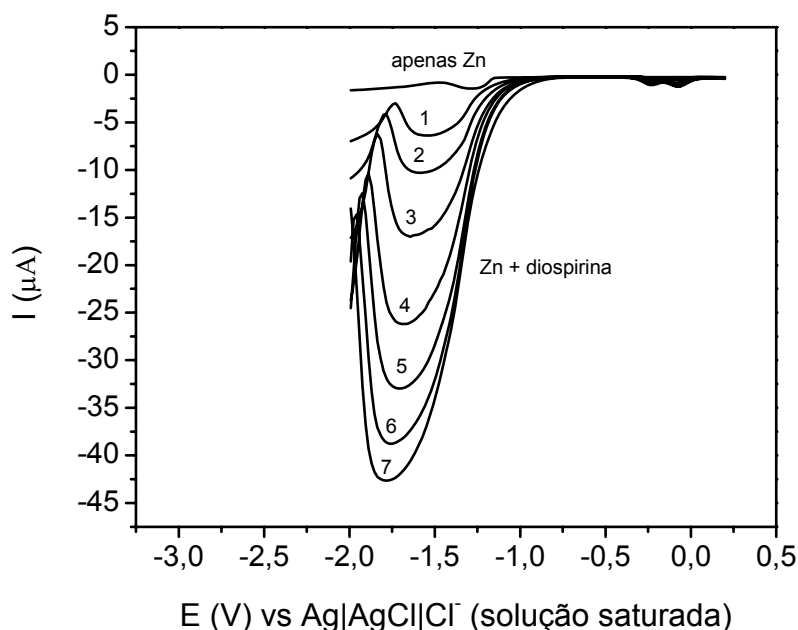


Figura 41. Análise em VPD da interação entre diospirina e Zn^{2+} , estabelecida através de adições de quantidades inferiores e superiores de diospirina em relação à de zinco presente em solução (**Tabela 2**). Aumento atribuído à presença de tampão acetato ($pH^* 5,4$) na solução de diospirina. $v = 0,035 V s^{-1}$, $a = 0,09 V$.

Apesar dos resultados insatisfatórios, novas propostas de análises serão feitas visto que o conhecimento da estequiometria, termodinâmica e forma de complexação da diospirina com átomos de Zn^{2+} , antes e após redução, é essencial para a elucidação do mecanismo de ação biológica em topoisomerase, tendo em vista que a inibição da enzima topoisomerase I está relacionada com o controle da leishmaniose e outras doenças parasitárias e com a diminuição do crescimento de células cancerígenas, já que essa enzima está presente em grandes quantidades nessas enfermidades [YARDLEY et al., 1996; CHAKRABARTY et al., 2002].

Conclusão

5. CONCLUSÃO

O estudo farmacológico das quinonas tem sido relatado na literatura, demonstrando um variado campo de ação para as mesmas em sistemas biológicos. A obtenção e a determinação analítica dessas substâncias são de grande importância, devido ao uso das mesmas contra uma série de doenças ou alvos farmacológicos. Dentre as técnicas analíticas, o método eletroquímico tem sua utilidade, tanto por ser um método rápido, quanto pelas modificações que podem ser feitas no sistema. Essas mudanças possibilitam uma melhora nas respostas eletroquímicas que estão diretamente relacionadas com a concentração e a estrutura da substância analisada.

Nesse trabalho, uma das primeiras análises realizadas foi à verificação da estabilidade fotoquímica da diospirina. Foi observado que a mesma sofre degradação pela luz, comportamento normal para quinonas, exigindo, desta forma, certos cuidados nas análises, com o intuito de se minimizar os efeitos causados pela incidência da luz ambiente na substância, evitando resultados duvidosos principalmente nas confecções das curvas analíticas.

Foi demonstrado também, que dentre as técnicas eletroquímicas utilizadas, a VPD foi a que apresentou um melhor perfil de corrente para a redução da diospirina, possibilitando assim, a quantificação da mesma em eletrodo de carbono vítreo, mesmo sem as devidas otimizações, as quais poderiam melhorar a sensibilidade da técnica. Por outro lado, no caso de eletrodos modificados, foi demonstrado que os mesmos são alternativas viáveis para a determinação analítica tanto da diospirina quanto de outras substâncias, por serem estáveis, sensíveis e reprodutíveis [LUZ et al., 2004], desta forma, sendo possível obter limites de detecção comparáveis aos métodos analíticos mais usuais (HPTLC e RPLC) na quantificação de substâncias [SANYAL et al., 2003; RAVISHANKARA et al., 2000]. Foi demonstrado também, que as análises com este tipo de eletrodo são muito promissoras para a determinação de diospirina no extrato bruto da *D. montana* Roxb.. O método analítico de recuperação e de adição de padrão pôde ser realizado sem a necessidade de etapas preliminares de separação de interferentes, diminuindo consideravelmente, o tempo de análise.

Na análise da diospirina com biossensor de DNA, pôde-se verificar que houve uma interação com o DNA após a adição da mesma ao biossensor, através da aparição de picos de oxidação referentes às bases adenina e guanina, as quais só são observadas quando há a quebra da ligação de hidrogênio das bases presentes na dupla fita do DNA. Essa análise prévia com o biossensor possibilita novos rumos para a análise da interação da diospirina com o DNA, através da verificação das substâncias formadas após a oxidação das bases, entre outras análises, a qual será de grande importância na elucidação do mecanismo de ação da diospirina, que após redução *in vivo* pode agir como um fármaco, podendo assim, ser utilizada tanto no combate ao câncer quanto no combate à leishmaniose, caso os experimentos feitos pelos grupos de pesquisa envolvidos sejam promissores.

Em adição, o método eletroquímico foi utilizado na tentativa de se verificar a complexação da diospirina e seus análogos com Zn^{2+} . Tais análises não foram satisfatórias por conta de interferentes no meio utilizado. Por outro lado, novo método será proposto com o intuito de se verificar essa interação, tendo em vista a grande importância dessa análise, devido a enzima topoisomerase, presente em grandes quantidades no câncer e na leishmaniose, possuir o átomo de zinco no centro enzimático.

Perspectivas

6. PERSPECTIVAS

- Propor um método eletroanalítico para a verificação da interação da diospirina e seus análogos com zinco, bem como da estequiometria envolvida, tanto em eletrodo de carbono vítreo quanto outros tipos de eletrodos;
- Análise, através de microscopia de varredura eletrônica ou fluorimetria de raios-X, da interação da diospirina com Zinco;
- Determinação do mecanismo de redução da diospirina;
- Análise de análogos da diospirina com biossensor de DNA.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABREU, F.C.; GOULART, M.O.F.; BRETT, A.M.O.; **Biosensors and Bioelectronics**, 2002, v. 17, p. 913.
2. AL-GHANNAM, S.M.; **Mikrochim. Acta**, 2002, v. 138, p. 29.
3. Analytical Methods Committee; **Analyst**, 1987, v. 112, p. 199.
4. BARD, A.J.; FAULKNER, L.R.; **Electrochemical Methods: Fundamentals and applications**, New York, John Wiley & Sons LTD., 1990.
5. BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M.; Aspectos Gerais da Ação dos Fármacos. In: **Química Medicinal - As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**, Porto Alegre, Artmed, 2001, p. 1.
6. BRABEC, V.; **Bioelectrochem. Bioenerg.**, 1980, v. 7, p. 69.
7. BRABEC, V.; DRYHUST, G.; **J. Electroanal. Chem.**, 1978, v. 89, p. 161.
8. BRABEC, V.; KOUDELKA, J.; **Bioelectrochem. Bioenerg.**, 1980, v. 7, p. 793.
9. BRETT, A.M.O.; BRETT, C.M.A.; **Eletroquímica: princípios, métodos e aplicações**, Coimbra, Almedina, 1996, p. 1.
10. BRETT, A.M.O.; PAQUIM, A.M.C.; DICULESCU, V.; ORETSKAYA, T.S.; **Bioelectrochemistry**, 2005, v. 67, p. 181.
11. CARDELLINA, J.H.; **J. Nat. Prod.**, 2002, v. 65, p. 1073.

12. CDC - **Centers for Disease Control & Prevention**. Disponível em: http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Leishmaniasis_il.htm. Acessado em 18 de abril de 2006.
13. CHAKRABARTY, S.; ROY, M.; HAZRA, B.; BHATTACHARYA, R.K.; **Cancer Letters**, 2002, v. 188, p. 85.
14. CRAWFORD, P.W.; CARLOS, E.; ELLEGOOD, J.C.; CHENG, C.C.; DONG, Q.; LIU, D.F.; LUO, Y.L.; **Electrochim. Acta.**, 1996, v. 41, n. 15, p. 2399.
15. DA SILVA, M.N.; FERREIRA, V.F.; DE SOUZA, M.C.B.V.; **Quim. Nova**, 2003, v.26, n.3, p. 407.
16. DAY, R.,W.; KARIMI, H.; FRANCIS, C.V.; KINSTLE, J.F.; CHAMBERS, J.Q.; **J. Polymer Sci. Part A: Polymer Chem.**, 2003, 24, p. 645.
17. DE ABREU, F.C.; FERRAZ, P.A.L.; GOULART, M.O.F.; **J. Braz. Chem. Soc.**, 2002, v.13, p.19.
18. DE ABREU, F.C.; FERREIRA, D.C.M.; WADHAWAN, J.; AMATORE, C.; FERREIRA, V.F.; DA SILVA, M.N.; DE SOUZA, M.C.B.V.; GOMES, T.S.; XIMENES, E.A.; GOULART, M.O.F.; **Electrochem. Comm.**, 2005, v. 7, p. 767.
19. DICULESCU, V.C.; PAQUIM, A.M.C.; BRETT, A.M.O.; **Sensors**, 2005, v. 5, p. 377.
20. EWING, G.W.; **Métodos Instrumentais de Análise Química**, São Paulo, Edgard Blücher LTDA., 1998, v. 1, p. 40.
21. FILANOVSKY, B.; **Anal. Chim. Acta**, 1999, v. 394, p. 91.

22. GOULART, M.O.F.; LIWO, A.; FALKOWSKY, P.; OSSOWSKY, T.; **Bioelectrochem.**, 2003, v.59, p. 85.
23. GREEF, R.; PEAT, R.; PETER, L.M.; PLETCHER, D.; ROBINSON, J.; **Instrumental Methods in Electrochemistry**, New York, John Wiley & Sons LTD., Ellis Horwood Limited, 1985.
24. HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K.; **Phytochem.**, 1991, v. 30, p. 3864.
25. HARRISON, W.T.A.; MUSGRAVE, O.C., **Acta Cryst.**, 2004, v. C60, p. 399.
26. HAZRA, B.; SUR, P.; ROY, D.K.; SUR, B.; BANERJEE, A.; **Planta Med.**, 1984, v. 51, p. 295.
27. HAZRA et al.; **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, 1987, v. 81, p. 738.
28. HAZRA, B.; SARMA, M.D.; SANYAL, U.; **J. Chromatogr. B**, 2004, v. 812, p. 259.
29. JACQ, J.; **Electrochim. Acta**, 1967, v. 12, p. 1345.
30. JELEN, F.; FOJTA, M.; PALECEK, E.; **J. Electroanal. Chem.**, 1997, v. 427, p. 49.
31. KIM, Y.; JEONG, C.; LEE, Y.; CHOI, S.; **Bull. Korean Chem. Soc**, 2002, 23, p. 1754.
32. LALL, N.; SARMA, M.D.; HAZRA, B.; MEYER, J.J.M.; **J. Antimicrob. Agents Chemother.**, 2003, v. 51, p. 435.
33. LANE, R.F.; HUBBARD, A.T.; **J. Phys. Chem.**, 1973, v. 77, p. 1401.

34. LA-SCALEA, M.A.; SERRANO, S.H.P.; GUTZ, I.G.R.; **Quim. Nova**, 1999, v. 22, n. 3, p. 417.
35. Leishmaniose visceral e tegumentar, disponível em: <http://biolab.cin.ufpe.br/leishmania/sobre.html#geog>. Acessado em 27 de abril de 2005.
36. LEVER, A.B.P.; MILAEVA, E.R.; SPEIER, G.; in: LEZNOFF, C.C.; LEVER, A.B.P. (Eds.); **Phthalocyanine: Properties and Applications**, New York, VCH, 1993, v. 3.
37. LODGE, R.; DESCOTEAUX, A. ; **Clinical Immun.**, 2005, v. 114, p. 256.
38. LONG, A.; WALKER, J.D.; **Ann. Rev. Environ. Toxicol. Chem.**, 2003, v. 22, n. 8, p. 1894.
39. LUZ, R.C.S.; DAMOS, F.S.; OLIVEIRA, A.B.; BECK, J.; KUBOTA, L.T.; **Talanta**, 2004, v. 64, p. 935.
40. LUZ, R.C.S.; DAMOS, F.S.; OLIVEIRA, A.B.; BECK, J.; KUBOTA, L.T.; **Electrochim. Acta**, 2005, v. 50, p. 2675.
41. LUZ, R.C.S.; DAMOS, F.S.; TANAKA, A.A.; KUBOTA, L.T.; **Sensors and Actuators B**, 2006, v. 114, p. 1019.
42. McKEOWN, N.B.; **Phthalocyanine Materials: Synthesis, Structure and Function**, Cambridge, Cambridge University Press, 1998.
43. OLIVEIRA, R.T.S.; MACHADO, S.A.S.; **Quim. Nova**, 2004, v. 27, n. 6, p. 911.
44. ONI, J.; DIAB, N.; REITER, S.; SCHUHMANN, W.; **Sens. Actuators B**, 2005, v. 105, p. 208.

45. OZOEMENA, K.; WESTBROEK, P.; NYOKONG, T.; **Electrochem. Comm.**, 2001, v. 3, p. 529.
46. PAIVA, S.R.; FONTOURA, L.A.; FIGUEIREDO, M.R.; **Quim. Nova**, 2002, v. 25, p. 717.
47. PALECEK, E.; **Electroanal.**, 1996, v. 8, p. 7.
48. PARRY, E.P.; OSTERYOUNG, R.A.; **Anal. Chem.**, 1965, v. 37, p. 1934.
49. PEREIRA, A.C.; SANTOS A.S.; KUBOTA, L.T.; **Quim. Nova**, 2002, v. 25, n. 6, p. 1012.
50. PLYTA, Z.F.; LI, T.; PAPAGEORGIU, V.P.; MELLIDIS, A.S.; ASSIMOPOULOU, A.N.; PITSINOS, E.N.; COULADOUROS, E.A.; **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 1998, v. 8, p. 3385.
51. PONOMARENKO, E.A.; TIRRELL, D.A.; MacKNIGHT, W.J.; **Macromolecules**, 1996, v. 29, p. 8751.
52. POWIS, G.; **Pharmacol. Ther.**, 1987, v. 35, p. 57.
53. RAJSKI, S.R.; WILLIAMS, R.M.; **Chem. Rev.**, 1998, v. 98, p. 2723.
54. RAUF, S.; GOODING, J.J.; AKHTAR, K.; GHOURI, M.A.; RAHMAN, M.; ANWAR, M.A.; KHALID, A.M.; **J. Pharm. Biom. Anal.**, 2005, v. 37, p. 205.
55. RAVISHANKARA, M.N.; SHRIVASTAVA, M.; JAYATHIRTHA, M.G.; PADH, H.; RAJANI, M.; **J. Chromatogr. B**, 2000, v. 744, p. 257.
56. RAY, S.; HAZRA, B.; MITTRA, B.; DAS, A.; MAJUMDER, H.K.; **Mol. Pharmacol.**, 1998, v. 54, p. 994.

57. REVENGA-PARRA, M.; LORENZO, E.; PARIENTE, F.; **Sens. Actuators B**, 2005, v. 107, p. 678.
58. RIFKIN, S.C.; EVANS, D.H.; **Anal. Chem.**, 1976, v. 48, p. 1616.
59. RIFKIN, S.C.; EVANS, D.H.; **Anal. Chem.**, 1976, v. 48, p. 2174.
60. SANYAL, U.; BHATTACHARYA, S.; PATRA, A.; HAZRA, B.; **J. Chromatogr. A**, 2003, v. 1017, p. 225.
61. Shimadzu: <http://www.shimadzu.com.br>. Acessado em 4 de fevereiro de 2006.
62. SOLOMONS, T.W.G.; **Química Orgânica**, 6ª ed., Rio de Janeiro, LTC, 1996, p. 555.
63. SOUZA, D.; MACHADO, S.A.S.; AVACA, L.A.; **Quim. Nova**, 2003, v.26, n.1.
64. TAZI, J.; BAKKOUR, N.; SORET, J.; ZEKRI, L.; HAZRA, B.; LAINE, W.; BALDEYROU, B.; LANSIAUX, A.; BAILLY, C.; **Mol. Pharmacol.**, 2005, v. 67, p. 1186.
65. WANG, J.; **Anal. Electrochem.**, 2nd ed., New York, Wiley-VCH, 2000, p. 68.
66. WARDMAN, P.; **Curr. Med. Chem.**; 2001, v. 8, n. 7, p. 739-61.
67. WEBER J.H.; BUSCH, D.H.; **Inorg. Chem.**, 1965, v. 4, p. 469.
68. WILLIAMS, D.A.; LEMKE, T.L.; **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2002, p. 872.
69. WU, L.; ZHOU, J.; LUO, J.; LIN, Z.; **Electrochim. Acta**, 2000, v. 45, p. 2923.

70. WYLLIE, S.; CUNNINGHAM, M.L.; FAIRLAMB, A.H.; **J. Biol. Chem.**, 2004, v. 279, p. 39925.
71. YARDLEY, V.; SNOWDON, D.; CROFT, S.; HAZRA, B.; **Phytother. Res.**, 1996, v. 10, p. 559.
72. ZAGAL, J.; PÁEZ, M.; TANAKA, A.A.; DOS SANTOS Jr., J.R.; **J. Electroanal. Chem.**, 1992, v. 339, p. 13.
73. ZHANG, Q.; WANG, W.; YE, G.; YAN, X.; ZHANG, Z.; HUA, Z.; **Synthetic Metals**, 2004, 144, p. 285.

Atividades Extras

8. ATIVIDADES EXTRAS

- Trabalho de orientação dos bolsistas de Iniciação Científica Junior, Waldomiro Pinho Junior e Levy Leanderson Chicuta Tavares, na execução dos projetos: Obtenção do extrato etanólico das frutas do jambolão e sua utilização como indicador ácido-base e Extração do lapachol da serragem da madeira do ipê-roxo, sob a supervisão e orientação da Profa. Dra. Marília O. F. Goulart, desde dezembro de 2003.
- Estágios de pesquisa laboratorial utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com complexos metálicos na análise da diospirina, sob a supervisão do Prof. Dr. Lauro T. Kubota, no Laboratório de Eletroquímica, Eletroanalítica e Desenvolvimento de Sensores (LEEDS) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) – SP, durante o período de 19 a 30 de outubro de 2004.
- Estágios de pesquisa laboratorial utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com complexos metálicos na análise da diospirina e da interação da mesma com o íon Zn^{2+} , sob a supervisão do Prof. Dr. Lauro T. Kubota, no Laboratório de Eletroquímica, Eletroanalítica e Desenvolvimento de Sensores (LEEDS) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) – SP, durante o período de 04 a 29 de maio de 2005.

Participação em Congressos

9. PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS

- Participação no XLIII Congresso Brasileiro de Química com o trabalho intitulado “Estudo eletroanalítico do corante índigo carmim e sua interação com o biopolímero quitosana utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada”, durante o período de 22 a 26 de setembro de 2003 em Ouro Preto/MG.
- Participação no Congresso Latino-americano de Química e da 27^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química com o trabalho intitulado “Estudo da oxidação da niclosamida e sua adsorção no biopolímero quitosana”, durante o período de 23 a 29 de maio de 2004 em Salvador/BA.
- Participação na 28^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química com o trabalho intitulado “Estudo eletroanalítico da diospirina: substância inibidora de topoisomerasas”, durante o período de 30 de maio a 02 de junho de 2005 em Poços de Caldas/MG.
- Participação no 13^o Encontro Nacional de Química Analítica / 1^o Encontro Ibero-Americano de Química Analítica com o trabalho intitulado “Desenvolvimento de um sensor para diospirina utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com CoTSPc/Poli-L-Lisina”, durante o período de 12 a 16 de setembro de 2005 em Niterói/RJ.
- Participação no 13^o Encontro Nacional de Química Analítica / 1^o Encontro Ibero-Americano de Química Analítica com o trabalho intitulado “Estudo espectroscópico (UV-VIS) da 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona (lapachol) e sua adsorção no biopolímero quitosana”, durante o período de 12 a 16 de setembro de 2005 em Niterói/RJ.

- Participação no II Congresso Acadêmico da UFAL com o trabalho intitulado “Desenvolvimento de um sensor para diospirina utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com CoTSPc/Poli-L-Lisina”, durante o período de 03 a 07 de outubro de 2005 em Maceió/AL.
- Participação no 11th International Conference on Electroanalysis (ESEAC, 2006), com o trabalho intitulado “The determination of pKa of hydroxyquinones: relevance in terms of biological activities”, durante o período de 11 a 15 de junho de 2006 em Bordeaux, França.

Anexos

10. ANEXOS

- COSTA, C.O.; MIRANDA, P.R.B.; HAZRA, B.; SARMA, M.D.; LUZ, R.C.S.; KUBOTA, L.T.; GOULART, M.O.F.; **Talanta**, 2006, v. 68, p. 1378.