



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

FABRICIA DA ROCHA FERREIRA

EMPREGO DE TÉCNICAS AVANÇADAS EM ESTUDOS BIOELETROQUÍMICOS
DE SUBSTÂNCIAS DE INTERESSE BIOLÓGICO

Maceió-AL

2013

FABRICIA DA ROCHA FERREIRA

**EMPREGO DE TÉCNICAS AVANÇADAS EM ESTUDOS BIOELETROQUÍMICOS
DE SUBSTÂNCIAS DE INTERESSE BIOLÓGICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do grau de Doutora em Química.

Orientadora: Profa. Dra.Fabiane Caxico de Abreu
Galdino

Co-orientadora: Profa. Dra.Marília Oliveira Fonseca
Goulart

Maceió-AL
2013

**Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos

- F383e Ferreira, Fabrícia da Rocha.
Emprego de técnicas avançadas em estudos bioeletroquímicos de substâncias de interesse biológico / Fabrícia da Rocha Ferreira. – 2013.
152 f. : il.
- Orientadora: Fabiane Caxico de Abreu Galdino.
Co-orientadora: Marília Oliveira Fonseca Goulart.
Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2013.
- Bibliografia: f. 140-152.
1. Quinonas. 2. Compostos fenólicos. 3. Beta-ciclodextrina.
4. EQCM. 5. PM IRRAS. 6. SECM. I. Título.

CDU: 543.559:543.645.9



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



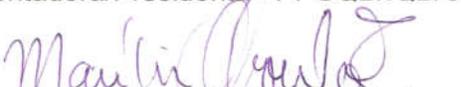
BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1384
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

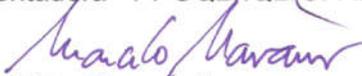
FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Doutoranda **Fabricia da Rocha Ferreira**, intitulada: **“Empregos de Técnicas Avançadas em Estudos Bioeletroquímicos de Substâncias de Interesse Biológico”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 23 de janeiro de 2013, às 14 horas, na Sala de Aulas do PPGQB/IQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA


Prof.^a. Dr.^a. Fabiane Caxico de A. Galdino
Orientadora/Presidenta PPGQB/IQB/UFAL


Prof. Dr.^a. Marília O. F. Goulart
Coorientadora - PPGQB/IQB/UFAL


Prof. Dr. Marcelo Navarro
DQF/UFPE


Prof. Dr.^a. Rosa Amália Fireman Dutra
UFPE/Centro de Tecnologia


Prof.^a. Dr. Mario Roberto Meneghetti
PPGQB/IQB/UFAL


Prof.^a. Dr.^a. Antonio Euzébio Goulart Sant'Ana
PPGQB/IQB/UFAL

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes em minha vida:

- ♥ Ao meu pai Claudenor e minha mãe Francisca, esta que é sem dúvidas, o meu exemplo de Fenix.
- ♥ Aos meus avós: José Marinho e Adelina (*in memorian*) e Pedro e Francisca.
- ♥ As minhas irmãs Patrícia e Clarice e meus sobrinhos Maria Eloise e Bernard.
- ♥ A minha tia Verinha que apoiou a mim a ao meu esposo no momento em que mais precisamos.
- ♥ A minha querida Maria Eduarda.
- ♥ E principalmente ao meu esposo Adielson, que diariamente me dedica todo seu amor, carinho, cuidado e paciência.

AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem acredito e busco refúgio;

Aminha querida orientadora Profa. Dra. Fabiane Caxico, por todo apoio e ensinamentos. Não tenho palavras para descrever sua importância em minha vida.

A Profa. Dra. Marília Goulart, a palavra obrigada não sintetiza minha gratidão.

Ao Professor Nivaldo, que foi de extrema importância em minha formação, pelo qual tenho muitíssimo carinho.

Aos Professores: Dra. Maria Tereza Salles Trevisan (DQOI/UFC), Dr. Vitor Francisco Ferreira e Dra. Sabrina Baptista Ferreira (UFRJ), pelo envio de amostras trabalhadas na presente tese.

A Universidade Federal de Alagoas e ao Instituto de Química e Biotecnologia, pela oportunidade em ter sido por dois anos, professora assistente.

A Lara, Antonio, Cícero, Augusto, Paulo, Camila, Allani, Francisco, Cleylton, Anny, Andresa, Fátima, Gabi, Juliana, Gleidson, Niedja, Jadriane, Aninha, Fred por frutíferas discussões, disposição em ajudar e descontração em momentos tensos.

A Carole Marílya, meus anjinhos ICs, que com sua dedicação, me ajudaram nessa etapa final.

Ao Aldy, esta pessoa maravilhosa que vai muito além de suas obrigações profissionais e nunca deixou de socorrer a mim e a todos do PPGQB.

A todos os Professores do IQB por todo apoio, em especial ao Prof. Walmilson (*in memoriam*), meu primeiro professor de aulas práticas, alegre, divertido e que me deixou com grande saudade. Também agradeço à Lúcia Rebouças, minha primeira orientadora na ciência.

Ao grupo de eletroquímica da Universidade do Chile, “as Paolas”, Paulina, Karla, Claudio, Valéria, Fernanda, aos Professores Claudia, Soledad, Arturo e Claudio em especial Raúl que esteve ao meu lado e de Antonio em nosso estágio em Santiago do Chile. Nunca vi pessoas mais solícitas, gentis e educadas que nos receberam com extrema gentileza e hospitalidade.

Ao Prof. Dr Ernesto Calvo e Dr Lucila P. Mendes de Leopor abrir as portas do seu laboratório e contribuírem com nosso artigo.

Aos Drs. Luciana Edgar Catarí, Daví Alessandro pela gentileza de ambos e auxílio nos experimentos de eletroforese, calorimetria diferencial e modelagem molecular, respectivamente.

Ao CNPq, pela bolsa concedida durante o desenvolvimento deste trabalho. E às agências financiadoras FAPEAL, CAPES e CNPq/PROSUL pelo apoio financeiro ao grupo.

RESUMO

Neste trabalho, derivados da *nor*- β -lapachona e *nor*- α -lapachona, foram estudados eletroquimicamente nos meios prótico (tampão fosfato e acetato) e aprótico (DMF + TBAP), utilizando carbono vítreo como eletrodo de trabalho. Os intermediários da eletro-redução das quinonas reagiram com oxigênio, indicativo da geração de Espécies Reativas de Oxigênio. A interação das quinonas β -lapachona, α -lapachona e *nor*- β -lapachona com DNA foi investigada, utilizando-se a técnica de microbalança de cristal de quartzo. Com o objetivo de aumentar a solubilidade das quinonas, para posteriores estudos *in vivo*, foi avaliada a formação de complexos de inclusão com β -ciclodextrina, sendo a β -lapachona estudada espectroeletroquimicamente através das técnicas de Espectroscopia de Reflexão-Absorção no Infravermelho com Polarização Modulada + Voltametria Cíclica para confirmar a formação da ligação hidrogênio entre a hidroquinona gerada a partir da β -lapachona e as hidroxilas secundárias da β -ciclodextrina. A formação do complexo de inclusão entre a mangiferina, um composto antioxidante polifenólico, e a β -ciclodextrina foi confirmado utilizando-se as técnicas de Infravermelho com transformada de Fourier, Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio, Calorimetria Diferencial e Espectroscopia de Reflexão-Absorção no Infravermelho com Polarização Modulada. Foi, também, demonstrado o aumento da atividade antioxidante da xantona supracitada quando em presença de β -ciclodextrina através da medida da atividade sequestradora de radicais frente ao radical 2,2'-difênil-1-picrilidrazil (RSA-DPPH^{*}), com análise adicional do efeito do solvente sendo assim demonstrado que abaixo de 50% de solvente orgânico, é impossível trabalhar com este método. O ensaio da capacidade de absorvência do radical oxigênio-fluoresceína (ORAC-FL) também foi utilizado, mostrando que o complexo mangiferina: β -ciclodextrina é quinze vezes mais potente que a molécula padrão trolox. Com a utilização de ensaios de Eletroforese e Voltametria de Pulso Diferencial, foi possível enfatizar que o método usado por nosso grupo de pesquisa para a produção de ssDNA (tratamento ácido-base com aquecimento) é útil, simples, barato e completamente reprodutível, sendo este um dos métodos utilizados para mostrar a interação entre DNA e timol livre e complexado com ciclodextrina. Esta interação foi ainda avaliada usando biossensor de dsDNA por Voltametria de Pulso Diferencial, Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo e Microscopia Eletroquímica de Varredura.

Palavras-Chave: Quinonas. Compostos fenólicos. β -ciclodextrina. EQCM. PM IRRAS. SECM.

ABSTRACT

In the present study, compounds derived from β -lapachone were electrochemically studied in protic (phosphate and acetate buffer) and aprotic (DMF + TBAP) media, using glassy carbon as working electrode. The electroreduced intermediates of the quinones reacted with oxygen, indicative of the generation of reactive oxygen species. The interaction of the quinones β -lapachone, α -lapachone and nor- β -lapachone with DNA, was investigated using the technique of quartz crystal microbalance. To increase the solubility of the quinones, in order to allow in vivo studies, the formation of inclusion complexes with β -cyclodextrin was evaluated. Positive results were obtained, leading to a viable formulation alternative for further biological studies with the compounds. β -lapachone was studied spectroelectrochemically through the techniques of Polarization Modulation Infrared Reflection Absorption Spectroscopy + Cyclic Voltammetry to confirm the formation of the hydrogen bond from the electroreduced β -lapachone and the secondary hydroxy group of β -cyclodextrin. The inclusion complex between mangiferin, an antioxidant polyphenol and β -cyclodextrin, was confirmed using the techniques of Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance, Differential Scanning Calorimetry and Polarization Modulation Infrared Reflection Absorption Spectroscopy. Also, the increase of the antioxidant activity of mangiferin was demonstrated when in presence of β -cyclodextrin, by means of radical scavenging activity toward 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (RSA-DPPH[•]), with additional analysis of solvent effects, being demonstrated that below 50% of organic solvent, it is impossible to work with this method. The assay of the capacity of oxygen radical absorbance capacity-fluorescein (ORAC-FL) was also used, showing that the complex mangiferin: β -cyclodextrin is fifteenfold more potent than the standard molecule, Trolox. Using Electrophoresis and Differential Pulse Voltammetry, it was possible to emphasize that the method used by our research group for the ssDNA production (treatment acid-base with heating) is useful, simple, cheap and completely reproducible, being this, one of the methods used to show the interaction between DNA and free or complexed thymol with cyclodextrin. This interaction was still evaluated using dsDNA biosensor through Differential Pulse Voltammetry, Electrochemistry Quartz Crystal Microbalance and Scanning Electrochemistry Microscopy.

Keywords: Quinones. Phenolic Compounds. β -cyclodextrin. EQCM. PM IRRAS. SECM.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Alguns derivados quinônicos obtidos a partir da oxidação de Hooker do lapachol.	22
Figura 2 - Representação esquemática do metabolismo de quinonas. Ciclagem redox e produção de metabólitos.	25
Figura 3 - Estrutura numerada da mangiferina.	27
Figura 4 - Empacotamento cristalino de mangiferina.	28
Figura 5 - Estrutura do timol.	30
Figura 6 - Esquema dos dois possíveis complexos A e B, entre Timol e β -CD.	31
Figura 7- Exemplo de SAM consistindo de um centro redox, uma ponte e um diluente. À esquerda, visão molecular de espaço cheio. À direita constituintes da SAM.	33
Figura 8 - a) Ângulo de corte, em relação aos seus eixos cristalográficos de um cristal de quartzo. b) Aspectos fundamentais de um sensor de cristal de quartzo, representação esquemática de cristal de quartzo com depósito de ouro para aplicação eletroquímica. (c) Deformação tangencial gerada após a aplicação de um campo elétrico.	36
Figura 9 - Ilustração esquemática da radiação p e s-polarizada.	42
Figura 10 - Diagrama esquemático de um sistema de SECM. O UME é conectado em um dispositivo de microposicionamento XYZ e varre através da superfície da amostra. Parâmetros eletroquímicos e de varredura são controlados através de uma interface de computador.	45
Figura 11 - Representação esquemática da retroalimentação positiva (A) e negativa (B) e do modo de geração-coleta (C).	47
Figura 12 - Rota sintética usada para a preparação de α - e β -naftodihidrofuranoquinonas e estruturas das quinonas estudadas neste trabalho.	50
Figura 13 - Reação de conversão do MTT em formazan.	56
Figura 14 - Reação de conversão de DCFH-DA em DCF.	57
Figura 15 - Reação de redução do radical DPPH.	59
Figura 16 - Reação do gerador de radicais AAPH durante os ensaios ORAC-FL e peroxidação lipídica.	60
Figura 17 - Representação esquemática para a perda de fluorescência da sonda fluoresceína.	61
Figura 18 - Sonda fluorescente C11-Bodipy ancorada a uma lipossoma.	62
Figura 19 - Esquema sintético de <i>trio</i> - β -ciclodextrina.	65
Figura 20 - Esquema da imobilização covalente de dsDNA em SAM de AET.	67
Figura 21 - Racionalização mecanística do processo de redução em duas etapas para <i>nor</i> - β -Lapachona.	72

Figura 22 - Voltamogramas cíclicos para <i>nor</i> - β -LP, <i>nor</i> - α -LP ($c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$) e seus respectivos derivados ($c = 0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) em DMF/TBAP ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$	73
Figura 23 - Racionalização mecanística para o processo de desproporcionamento do ânion radical semiquinona para <i>nor</i> - β -LP e comproporcionamento do diânion quinônico para a <i>nor</i> - α -LP.....	76
Figura 24 - a) Análise da corrente de pico (Ip_{c1}), para a primeira onda de redução para <i>nor</i> - β -lapachona, <i>nor</i> - α -lapachona e seus respectivos derivados em função de $v^{1/2}$. b) Gráfico de potencial de pico de primeira onda de redução em função do $\log v$ (DMF/TBAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) para as diferentes quinonas.....	77
Figura 25 - Voltamogramas Cíclicos para o-QFu-Me-Ph ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) na ausência e presença de oxigênio, em DMF/TBAP ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), eletrodo de carbono vítreo.....	82
Figura 26 - a) Voltamogramas Cíclicos para <i>nor</i> - β -lapachona, <i>nor</i> - α -lapachona e <i>orto</i> - e <i>para</i> -derivados em DMF/TBAP ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), eletrodo de carbono vítreo, em presença de diferentes concentrações de oxigênio; $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$. Inset: Curva de saturação para Ip_R / Ip_O em função da concentração de oxigênio. b) Porção linear de Ip_R / Ip_O em função da concentração de oxigênio para cálculo da constante aparente de reatividade.....	83
Figura 27 - Atividade citotóxica expressa em $\mu\text{mol L}^{-1}$ para as quinonas aqui estudadas em várias linhagens de células cancerígenas.	89
Figura 28 - Gráfico de comparação entre reatividade frente a oxigênio (cinza claro) e Células produzindo ERO (cinza escuro).....	92
Figura 29 - Gráfico de reatividade frente a oxigênio versus produção de ERO.....	93
Figura 30 - Racionalização mecanística para a formação de hidroquinonas utilizando como exemplo a <i>nor</i> - β -LP.....	94
Figura 31 - Voltamograma cíclico da <i>nor</i> - β -lapachona ($c = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$) em meio aquoso etanólico (20%), tampão fosfato pH 7,4. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$	95
Figura 32 - Voltamogramas Cíclicos dos derivados dihidrofurânicos da <i>nor</i> - β -lapachona (a-g) em meio aquoso etanólico (20%), tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), pH 7,4, e dos derivados da <i>nor</i> - α -lapachona (h-k) em meio aquoso etanólico (40%), tampão acetato pH 4,5 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Todas as quinonas foram trabalhadas na concentração de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$	96
Figura 33 - a) Voltamogramas cíclicos da <i>nor</i> - β -lapachona ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) em diferentes concentrações de β -CD, (●) 0, (●) 0,01, (●) 0,1 e (●) 1 mmol L^{-1} , respectivamente), eletrodo de carbono vítreo, tampão fosfato pH 7,0, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. b) Estrutura proposta para o complexo formado por <i>nor</i> - β -lapachona: β -CD, podendo ocorrer pelo anel aromático e/ou pelo anel dihidrofurano.	100
Figura 34 - Voltamogramas cíclicos dos derivados da <i>nor</i> - β -LP. a) o-QFu-Ph; b) o-QFu-Me-Ph; c) o-QFu-p-Me; d) o-QFu-2,4-DiMe, ambos $0,1 \text{ mmol}$	

	L ⁻¹ em diferentes concentrações de β-CD, (●) 0, (●) 0,01, (●) 0,1 e (●) 1 mmol L ⁻¹ , respectivamente), eletrodo de carbono vítreo, tampão fosfato pH 7,0, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. e) Estrutura representativa para o complexo entre as quinonas e β-CD.	102
Figura 35 -	a) Voltamogramas cíclicos representativo das quinonas halogenadas (0,1 mmol L ⁻¹) em diferentes concentrações de β-CD, (●) 0, (●) 0,01, (●) 0,1 e (●) 1 mmol L ⁻¹ , respectivamente), eletrodo de carbono vítreo, tampão fosfato pH 7,0, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. b) Estrutura representativa da interação das quinonas halgeno-substituídas com β-CD.	104
Figura 36 -	a) Voltamogramas Cíclicos de β-lapachona ($c = 0,12 \text{ mmol L}^{-1}$) em 5% de EtOH com adições crescentes de βCD = 0; 0,5; 4,9 e 12 mmol L ⁻¹ . b) Esquema de redução da β-lapachona na presença de βCD.	106
Figura 37 -	a) Espectro de PM IRRAS da β-LP em SAM-βCD-HS. b) Esquema representativo do encapsulamento de β-LP em SAM de βCD-SH.	108
Figura 38 -	a) Espectroeletróquímica do processo de oxidação da β-LP reduzida em SAM-CD-HS observado por PMIRRAS em tampão fosfato pH 7.4 + 5% EtOH. b) $\Delta R/R$ em função do potencial.	109
Figura 39 -	Massogramas da formação de SAM AET/dsDNA e interação com as quinonas, a) β-LP; b) <i>nor</i> -β-LP; c) α-LP. Cristal de quartzo com cobertura de ouro em vermelho; 2-aminoetanotiol (AET) em preto; AET/dsDNA em azul e AET/dsDNA/quinona em verde. Inserção: massogramas ampliados para AET, dsDNA e quinonas.	111
Figura 40 -	a) Espectros FT-IR na região de 4000-500 cm ⁻¹ para β-CD, MGN e complexo de inclusão MGN:βCD obtido pelo método de coevaporação. b) Espectros de FT-IR na região de 1800-500 cm ⁻¹ para β-CD, MGN e complexo de inclusão MGN:βCD obtido pelo método de coevaporação.	114
Figura 41 -	Termogramas de DSC. a) MGN; b) β-CD; c) Mistura física e d) Complexo MGN:β-CD obtido pelo método de coevaporação.	116
Figura 42 -	Espectro de RMN ¹ H para MGN livre e complexo MGN:β-CD (1:1) ambos em D ₂ O.	117
Figura 43 -	a) Espectro de PM IRRAS de β-CD-SH e MGN:βCD-SH. b) Esquema representativo do encapsulamento de MGN em SAM de βCD-SH.	119
Figura 44 -	a) Porcentagem de RSA-DPPH para MGN, complexo MGN:β-CD (1:1) e ácido gálico (AG). Tempo de reação com DPPH: 30 min. Para colunas de MGN, branco: 50 μmol L ⁻¹ ; cinza claro: 100 μmol L ⁻¹ e cinza escuro: 500 μmol L ⁻¹ . Ácido gálico: 100 μmol L ⁻¹ . DPPH: 100 μmol L ⁻¹ só metanol. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.	120
Figura 45 -	RSA-DPPH (%) das amostras como função do tipo e quantidade de solvente: a) metanol e b) etanol. Tempo de reação com DPPH: 30 min. Para colunas, branco: MGN 100 μmol L ⁻¹ ; cinza claro: complexo	

	MGN: β -CD (1:1) e cinza escuro: ácido de gálico $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. DPPH: $50 \mu\text{mol L}^{-1}$. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.....	121
Figura 46 -	Estrutura numerada de Mangiferina.....	122
Figura 47 -	a) curvas de ORAC-FL na presença de MGN na faixa de concentração $0-50 \mu\text{mol L}^{-1}$. Insert: AUC vs. MGN concentração; b) curvas de ORAC-FL na presença do complexo MGN: β -CD na faixa de concentração gama $0-50 \mu\text{mol L}^{-1}$. Insert: AUC vs. complexo MGN: β -CD.....	123
Figura 48 -	Proteção contra a peroxidação lipídica (%). (-★-) MGN ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$); (-▼-) complexo MGN: β -CD ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) e controle positivo (-◇-) Trolox ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$). (-□-) Tampão fosfato e (-△-) β -CD usados como controles negativos.....	125
Figura 49 -	Gel de agarose para eletroforese de DNA. Pista M: marcador de DNA 1kb; Pista 1 dsDNA de timo de bezerro (Sigma, D1501); Pista 2: ssDNA de timo de bezerro (Sigma, D8899); Pista 3: dsDNA após tratamento térmico por 60 min; Pista 4: dsDNA após tratamento térmico por 30 min; Pista 5: dsDNA após tratamento ácido-base sem aquecimento; Pista 6: dsDNA após tratamento ácido-base com tratamento térmico por 60 min; Pista 7: dsDNA após tratamento ácido-base com tratamento térmico por 30 min. As amostras foram corridas, usando gel de agarose a 1%, a 70 V por 40 min.....	127
Figura 50 -	Voltametria de Pulso Diferencial de $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$ de DNA, em tampão acetato pH = 4,5, após tratamento térmico (60 min) em função de tempo, em um eletrodo de carbono vítreo. Amplitude de pulso 50 mV; largura de pulso 70 ms; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$	128
Figura 51 -	Voltametria de Pulso Diferencial de ssDNA (timo de bezerro) em tampão acetato pH = 4,5. Eletrodo de carbono vítreo. Amplitude de pulso 50 mV; largura de pulso 70 ms; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$	129
Figura 52 -	a) Voltamogramas de pulso diferencial de dsDNA; dsDNA + timol ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Tampão acetato pH = 4,5. Amplitude de pulso 50 mV; largura de pulso 70 ms; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$	131
Figura 53 -	Gráfico de massa em função do tempo da interação de timol com dsDNA, utilizando EQCM.....	132
Figura 54 -	Imagens da corrente limite da oxidação de FcOH em: a) carbono vítreo (CV); b) dsDNA/CV; c) dsDNA/CV em presença de timol ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$); d) dsDNA/CV em presença de timol: β CD (1:1). Tampão acetato pH = 4,5.....	133
Figura 55 -	Estrutura de adenina, guanina, timina e citosina com destaque para os átomos que se ligam através de ligações hidrogênio com o timol...	134
Figura 56 -	a) Voltamogramas de pulso diferencial de ssDNA (preto); ssDNA + timol ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) (azul); ssDNA + timol: β -CD (vermelho) e ssDNA + β -CD (verde). Tampão acetato pH 4,5. Amplitude de pulso 50 mV; largura de pulso 70 ms; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$. Tempo de contato 1h..	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros eletroquímicos para <i>nor</i> - β -lapachona, <i>nor</i> - α -lapachona e seus derivados. Eletrodo de Carbono Vítreo, E vs. Ag AgCl Cl ⁻ (sat.), $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$	81
Tabela 2 - .Moléculas depositadas por cm^2	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH	2,2'-azobis(2-metilpropionamida)
AET	Aminoetatanotiol
β -CD	β -Ciclodextrina
β -LP	β -Lapachona
CI ₅₀	Concentração média inibitória
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido Desoxirribonucléico)
dsDNA	Ácido Desoxirribonucléico em fita dupla (ou dupla hélice)
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetria de varredura diferencial (Differential Scanning Calorimetry)
EQCM	Electrochemical Quartz Crystal Microbalance (microbalança eletroquímica a cristal de quartzo)
E _p	Potencial de pico
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FAD	Flavina dinucleotídeo
FL	Fluoresceína
FT IR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared spectroscopy)
¹ H RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
IRRAS	Infra Red Reflection-Absorption Spectroscopy (espectroscopia de reflexão-absorção no infravermelho)
MM	Massa Molar
MGN	Mangiferina
NAC	Nitrato de amônio cérico
NADH	
ORAC-FL	Oxygen Radical Absorbance Capacity-Fluorescein (capacidade de absorvância do radical oxigênio-fluoresceína)
RAS	Reflection-Absorption Spectroscopy (espectroscopia de reflexão-absorção)
RSA-DPPH	Radical Scavenging Activity – DPPH
SAM	Self Assembled Monolayer (monocamada auto-organizada)
SECM	Scanning Electrochemical Microscopy (microscopia eletroquímica de varredura)
SERS	Surface Enhanced Raman Spectroscopy (Espalhamento Raman)

	intensificado por superfície)
SNIFTIRS	Subtractively Normalized Interfacial Fourier Transform Infrared Spectroscopy (espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier interfacial subtrativa e normalizada)
SPR	Surface Plasmon Resonance (ressonância de plasma de superfície)
SOD	Superóxido dismutase
PEM	Photoelastic modulator (modulador fotoelástico)
PM IRRAS	Polarization Modulation Infrared Reflection Absorption Spectroscopy (espectroscopia de reflexão-absorção no infravermelho com polarização modulada)
QCM	Quartz Cristal Microbalance (microbalança de cristal de quartzo)
THF	Tetrahidrofurano
VPD	Voltametria de Pulso Diferencial
UME	Ultramicroeletrodo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Substâncias de interesse biológico	21
1.1.1	Quinonas	21
1.1.2	Compostos fenólicos	26
1.1.2.1	Mangiferina	27
1.1.2.2	Timol	29
1.2	Monocamadas auto-organizadas	31
1.3	Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo (EQCM)	34
1.4	Espectroscopia de Reflexão-Absorção no Infravermelho com Polarização Modulada (PM IRRAS)	39
1.5	Microscopia Eletroquímica de Varredura (SECM)	44
2	OBJETIVOS	49
2.1	Geral	49
2.2	Objetivos Específicos	49
3	EXPERIMENTAL	50
3.1	Reagentes e Solventes	50
3.2	Estudos Eletroquímicos	53
3.2.1	Estudos em meio aprótico	53
3.2.2	Estudos em Meio Aprótico em Presença de Oxigênio	54
3.2.3	Estudos em meio prótico	54
3.2.4	Estudo da interação da <i>nor-α-lapachona</i> , <i>nor-β-lapachona</i> e respectivos derivados com β -CD	55
3.2.5	Ensaio biológico	55
3.2.6	Teste de citotoxicidade <i>in vitro</i>	55
3.2.7	Atividade hemolítica	56
3.2.8	Medida da geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)	56
3.3	Preparação do complexo de inclusão de MGN:β-CD pelos métodos de mistura física e coevaporação	57
3.3.1	Caracterização físico-química do complexo de inclusão de MGN: β -CD por FT-IR	58
3.3.2	Caracterização físico-química do complexo MGN: β -CD por calorimetria exploratória diferencial (DSC)	58
3.3.3	Caracterização físico-química do complexo MGN: β -CD por ^1H RMN	58
3.4	Avaliação da atividade antioxidante de MGN livre e complexada com β-CD pelos ensaios DPPH, ORAC-FL e peroxidação lipídica	59
3.4.1	Método do DPPH	59
3.4.2	Gerador de radicais AAPH	60

3.4.3	Ensaio ORAC-FL (Oxygen Radical Absorbance Capacity-Fluorescein).....	61
3.4.4	Peroxidação lipídica.....	62
3.5	Interação de β-Lapachona e Mangiferina com β-CD avaliada por PM IRRAS	63
3.6	Interação de Timol e quinonas com DNA avaliado por Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo (EQCM).	66
3.7	Avaliação da interação de Timol com DNA por Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) e Microscopia Eletroquímica de Varredura (SECM).	67
3.7.1	Preparo do gel de dsDNA.....	67
3.7.2	Preparo da solução de ssDNA pelo método ácido-base	68
3.7.3	Preparo da solução de ssDNA por tratamento térmico.....	68
3.7.4	Eletroforese	69
3.7.5	Estudo da interação de timol com ssDNA	69
3.8	Experimentos SECM	69
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4.1	Quinonas	71
4.1.1	Estudo em meio aprótico de <i>nor</i> - α -lapachona, <i>nor</i> - β -lapachona e seus derivados por voltametria cíclica	71
4.1.2	Atividade Citotóxica e Estudos em Presença de Oxigênio	87
4.1.3	Estudo em meio prótico de <i>nor</i> - α -Lapachona e <i>nor</i> - β -Lapachona e seus derivados por voltametria cíclica	94
4.1.4	Comportamento eletroquímico de <i>nor</i> - α -lapachona e <i>nor</i> - β -lapachona e derivados em presença de β -ciclodextrina	99
4.1.5	Espectroeletroquímica da interação entre a β -lapachona e a SAM- β CD-SH usando a técnica de PM IRRAS.	105
4.1.6	Estudo da interação das quinonas (α -lapachona, β -lapachona e <i>nor</i> - β -lapachona) com o biossensor de DNA utilizando EQCM.....	110
4.2	Mangiferina	112
4.2.1	Caracterização do complexo de inclusão MGN: β -CD por FTIR	113
4.2.2	Caracterização do complexo de inclusão MGN: β -CD por DSC (Calorimetria de Varredura Diferencial)	115
4.2.3	Caracterização do complexo de inclusão MGN: β -CD por ^1H RMN	116
4.2.4	Espectroeletroquímica da interação entre a MGN e a SAM- β CD-HS usando PM IRRAS.....	118
4.2.5	Avaliação da atividade antioxidante de MGN livre e complexada com β -CD	119
4.2.5.1	Atividade sequestradora do radical DPPH.....	119
4.2.5.2	Estudo do efeito do solvente	121
4.2.5.3	Ensaio ORAC-fluoresceína (ORAC-FL).....	123

4.2.5.4	Medidas de peroxidação lipídica.....	124
4.3	Biossensores de DNA – comportamento eletroquímico e eletroforese	125
4.4	Estudo da interação de Timol com biossensor de DNA utilizando VPD, EQCM e SECM	130
5	CONCLUSÕES	137
	PERSPECTIVAS.....	139
	REFERÊNCIAS.....	140

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento aprofundado dos processos de transferência de elétrons em nível biológico é de fundamental importância, visto que em condições de estresse, ocorre em nossos corpos um desequilíbrio entre o sistema antioxidante e a produção de espécies oxidantes, incluindo as espécies reativas de oxigênio (ERO) como, por exemplo, ânion radical superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio que levam ao dano celular e problemas de saúde.

O organismo humano tem desenvolvido sistemas de defesa para lidar com esse desequilíbrio denominado estresse oxidativo, que inclui os antioxidantes enzimáticos, especialmente superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e catalase e os antioxidantes não-enzimáticos como a glutatona, bilirrubina e ácido úrico (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007; LEFERINK et al., 2011).

A falta de antioxidantes, que podem capturar espécies reativas, facilita o desenvolvimento de doenças degenerativas, incluindo doenças cardiovasculares, câncer, doenças neurodegenerativas e inflamatórias. Uma maneira de diminuir este problema é complementar a dieta com compostos antioxidantes provenientes de fontes naturais (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007; DE OLIVEIRA et al., 2009). Estes antioxidantes naturais podem servir como um tipo de medicina preventiva e segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) 80% dos habitantes da terra usam extratos de plantas e seus componentes ativos para cuidar da saúde (KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011; AL-GUBORY; FOWLER; GARREL, 2010).

Desta forma, nas últimas décadas, tem crescido o interesse em compostos isolados de fontes naturais, principalmente de plantas, devido à presença de inúmeras substâncias químicas que são consideradas fármacos fitoterápicos importantes correntemente usados em um ou mais países do mundo (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007; SAXENA et al., 2010). Dentre estas substâncias químicas, estão as quinonas, possuidoras de potentes e variados tipos de atividades biológicas como antitumorais, moluscicidas, leishmanicidas, anti-inflamatórias, antifúngicas, tripanocidas, antiprotozoárias (FERREIRA et al., 2011), e compostos fenólicos, que apresentam diversos efeitos biológicos, dentre eles anti-inflamatório e

anticarcinogênico, como resultado,entre outros mecanismos, de sua atividade antioxidante (KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011; ARCHANA; RAO, B. N.; RAO, B. S. S., 2011; AL-GUBORY; FOWLER; GARREL, 2010).

A eletroquímica tem contribuído de forma muito efetiva na compreensão dos processos de transferência de elétrons entre moléculas, avaliando os potenciais de oxidação/redução de vários compostos biologicamente ativos e fornecendo dados cinéticos e termodinâmicos necessários para descrever as complexas reações de oxido-redução de caráter vital para a manutenção da integridade celular (KOHEN; NYSKA, 2002; LEFERINK et al., 2011; PATIL; DAVIS, 2011).

Já é sabido que a maioria dos processos vitais, incluindo a fotossíntese e respiração, é sustentada por reações de transferência de elétrons de proteínas adsorvidas abiomembranas. Estes sistemas biológicos têm inspirado a construção,em superfície eletródica, de monocamadas auto-organizadas (SAMs), que muitas vezes servem como uma ponte entre sistemas artificiais e biológicos mostrando-se excelentes plataformas para estudar o processo de transferência de elétrons (ECKERMANN et al., 2010; SKODA et al., 2010; SARAULI et al., 2011; CAMPBELL-RANCE; DOAN; LEOPOLD, 2011).

Nas últimas décadas, a eletroquímica tem passado por uma notável evolução, integrando técnicas como amicrobalança de cristal de quartzo (QCM), espectroscopia de reflexão-absorção no infravermelho com polarização modulada (PM IRRAS) e microscopia eletroquímica de varredura (SECM) que auxiliam no entendimento da bioeletroquímica molecular, na maioria dos casos, usando monocamadas auto-organizadas (ZHANG et al., 2011; NASIR; BESSON, 2012; MÅRTENSSON; HERNÁNDEZ, 2012; WANG, et al., 2012).

O desenvolvimento desta tese está baseado no estudo de duas classes de compostos de interesse biológico: quinonas derivadas da *nor- α -lapachona* e *nor- β -lapachona* e dois compostos fenólicos, a mangiferina e o timol. Portanto, esta tese pode ser dividida em duas partes principais. A primeira parte está dedicada à estudos bioeletroquímicos de quinonas derivadas da *nor- α -lapachona* e *nor- β -lapachona* que ainda não haviam sido estudadas eletroquimicamente, apesar de

possuírem atividade biológica. A segunda parte desta tese visa estudos complementares de trabalhos anteriores do Grupo de Eletroquímica (LEQUI).

Todos os compostos supracitados apresentam baixa solubilidade em água, e alguns podem interagir com DNA, exibindo potencial genotóxico e mutagênico. Por este motivo, alternativas que possibilitem aumentar a solubilidade, melhorar a estabilidade e diminuir a toxicidade desses compostos são de grande interesse. Tendo em vista o exposto, o processo de transferência de elétrons dessas substâncias foi avaliado em dois diferentes tipos de monocamadas auto-organizadas (SAMs) através das técnicas de microbalança eletroquímica de cristal de quartzo e espectroscopia de reflexão-absorção no infravermelho com polarização modulada, assim como para efeito de comprovação de uma das interações, a microscopia eletroquímica de varredura foi também utilizada.

1.1 Substâncias de interesse biológico

1.1.1 Quinonas

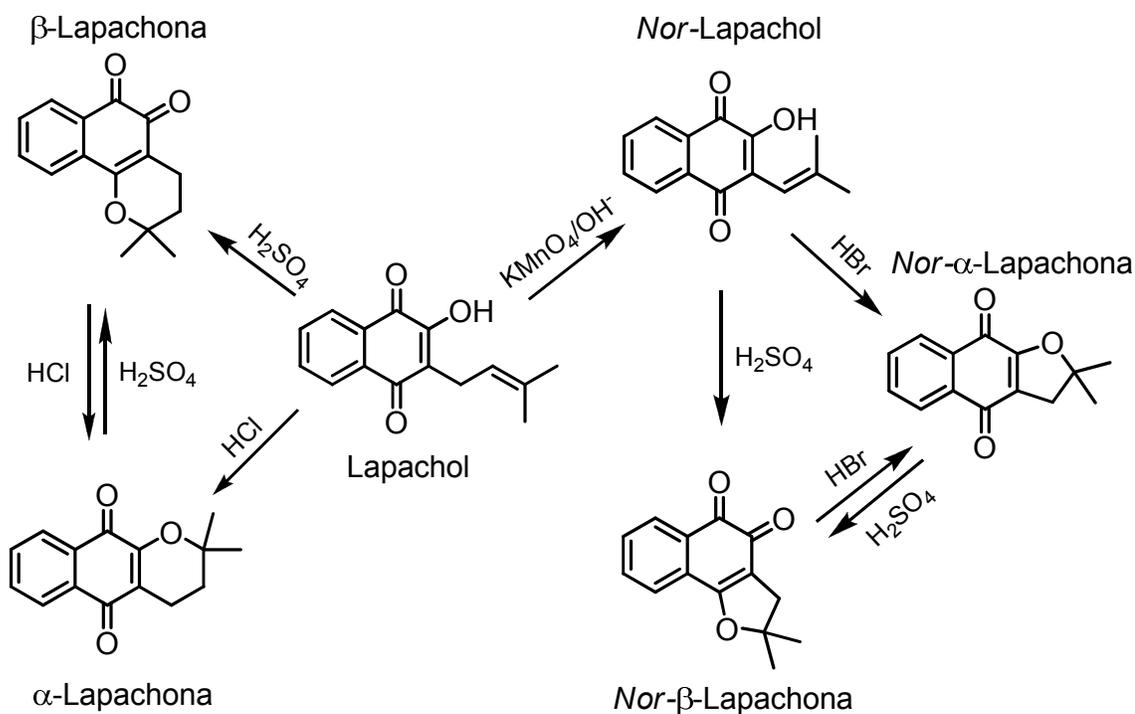
As quinonas são uma classe valiosa de compostos com interessantes propriedades físico-químicas de ocorrência natural; desempenham um papel vital na bioquímica de células vivas e apresentam diversas e potentes atividades biológicas tais como moluscicida, leishmanicida, antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória e particularmente antitumoral (FERRAZ et al., 2001; ELINGOLD et al., 2009; BERNARDO et al., 2011; VALDERRAMA et al., 2011; REICHSTEIN et al., 2012).

As quinonas são divididas em diferentes grupos, utilizando-se como critério o tipo de sistema aromático que sustenta o anel quinonoídico: benzoquinonas – um anel benzênico; naftoquinonas - um anel naftalênico; antraquinonas - um anel antracênico linear ou angular. As naftoquinonas, por sua vez, são consideradas estruturas privilegiadas em química medicinal, com base em suas atividades biológicas e propriedades estruturais. Podem apresentar isomerias 1,2 ou *orto*-quinonoídica (quando as carbonilas são vizinhas) ou 1,4 ou *para*-quinonoídica (quando as carbonilas estão separadas por dois carbonos). Essas formas isoméricas diferem muito em suas propriedades físicas, químicas e quanto à sua atuação biológica. Um exemplo típico é a *orto*-naftoquinona (β -lapachona) que é muito mais

ativa contra formas tripamastigotas de *Trypanosoma cruzi* do que seu isômero α -lapachona (DA SILVA; FERREIRA; DE SOUZA, 2003; MOLFETA, 2007).

Entre as naftoquinonas mais importantes encontra-se a β -lapachona, uma naftodiidropiranoquinona que pode ser facilmente obtida por catálise ácida do lapachol, um composto extraído de plantas da família Bignoniaceae ou de *Lomatia* (Figura1). Além da β -lapachona, sintetizada a partir do lapachol, *nor*- α -lapachona e *nor*- β -lapachona podem ser sintetizadas a partir do *nor*-lapachol, produto obtido pela oxidação de Hooker do lapachol, como pode ser observado na Figura1 (DA SILVA, 2008; ELINGOLD et al., 2009).

Figura1 - Alguns derivados quinônicos obtidos a partir da oxidação de Hooker do lapachol.



Fonte: Adaptado de Da Silva, 2008.

Devido à presença da unidade eletroativa quinonóide, estes compostos apresentam como principal característica, a capacidade de atuar como agente oxidante ou desidrogenante. Desta forma, agem como inibidores potentes do transporte de elétrons, agentes intercalantes na dupla hélice do DNA, agentes alquilantes e biorredutivos de biomoléculas e como produtores de espécies reativas de oxigênio (ERO), por ciclagem redox, em condições aeróbias (FERRAZ et al., 2001; ELINGOLD et al., 2009; BERNARDO et al., 2011; VALDERRAMA et al., 2011; REICHSTEIN et al., 2012).

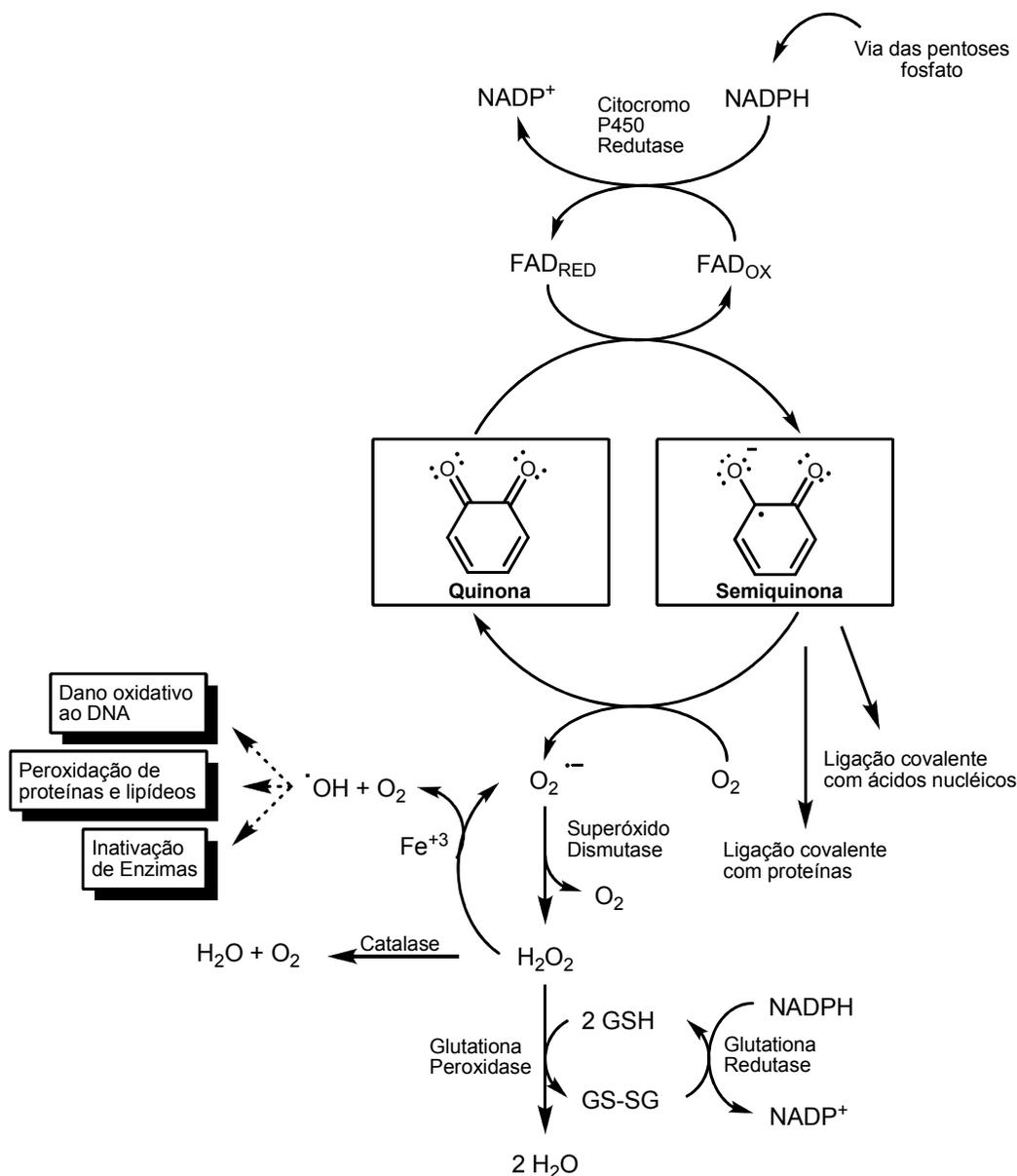
Dois principais mecanismos de ação biológica de compostos quinonóides têm sido identificados. Primeiro, compostos não substituídos em uma ou em ambas posições do anel quinonóide que são potentes eletrófilos, sendo capazes de reagir com por exemplo, nucleófilos sulfurados em uma reação do tipo Michael, e então arilar componentes dos tecidos e causar a morte celular. No caso das quinonas estudadas neste trabalho, ambas as posições eletrofílicas estão fundidas a um anel diidrofurano, tornando-as inadequadas para tal reação. Segundo, evidências circunstanciais mostram que a atividade biológica desejada e alguns outros efeitos tais como toxicidade, estão ligados à geração de EROs, sendo uma característica da função quinona em geral, devido a sua habilidade de sofrer processo de ciclagem redox (HILLARD et al., 2008; REICHSTEIN et al., 2012).

As quinonas por sua vez, podem ser metabolizadas via redução de um ou dois elétrons (Figura 2). A redução de um elétron de quinonas é catalisada por redutases como a NADPH-citocromo P450 redutase mediado pela flavina dinucleotídeo (FAD), citocromo b5 redutase ou NADPH ubiquinona oxidoreductase, levando à formação de semiquinonas instáveis. Estas espécies transferem elétrons para o oxigênio molecular e retornam à sua forma quinoidal original, gerando o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que, na presença da enzima superóxido dismutase (SOD) é transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), por catálise com metais de transição (reação de Fenton), ou por reação com H_2O_2 (reação de Haber-Weiss), gera HO^{\cdot} no interior da célula. Embora o H_2O_2 não seja um radical livre, é uma substância bastante reativa, podendo também promover a oxidação de algumas biomoléculas, e neste sentido a célula conta com o sistema enzimático GSH/GS-SG que age como antioxidante (Figura 2). Em resumo, HO^{\cdot} e

H_2O_2 são as principais espécies responsáveis pelo estresse oxidativo celular. Todas estas espécies reativas de oxigênio (ERO) podem reagir diretamente com o DNA celular ou outras macromoléculas, como lipídios e proteínas, levando a danos celulares (DA SILVA; FERREIRA; DE SOUZA, 2003; ELINGOLD et al., 2009; VALDERRAMA et al., 2011).

Em contraste, a redução via dois elétrons, catalisada pela NAD(P)H/diidronicotinamida ribosídica (NRH):quinona oxidoreductase (NQOs), produz hidroquinonas, relativamente mais estáveis. Porém, essas hidroquinonas podem sofrer auto-oxidação e formar novas semiquinonas. Logo, a redução catalisada por NQOs tem tanto um papel pró quanto antioxidante (detoxificação) (CAVALCANTI, 2010; REICHSTEIN et al., 2012).

Figura2 - Representação esquemática do metabolismo de quinonas. Ciclagem redox e produção de metabólitos.



Fonte: Adaptado de SALAS et al., 2003.

A busca por fármacos mais potentes e/ou seletivos para atuarem frente a patologias, leva pesquisadores em Química Medicinal a fazer mudanças estruturais em compostos cuja atividade já é conhecida ou sintetizar novos compostos que contenham grupos funcionais importantes, como é o caso da função quinona. Tendo em vista o exposto, vários derivados da *nor*-β-lapachona já foram sintetizados, e

inclusive, alguns nitroderivados da *nor*- β -lapachona já foram estudados pelo grupo do Laboratório de Eletroquímica (DE MOURA, 2008; DE SOUZA, 2011).

A eletroquímica desses compostos permite obter dados relativos aos produtos de redução, à estabilidade dos intermediários de redução e/ou interações com alvos biológicos importantes. Essas informações são relevantes para o entendimento dos mecanismos de ação em nível molecular (DE SOUZA, 2011). Na busca por novos fármacos mais potentes, neste trabalho são apresentados novos derivados da *nor*- α -lapachona e *nor*- β -lapachona com substituintes aromáticos, os quais serão estudados eletroquimicamente nos meios aquoso e não-aquoso.

1.1.2 Compostos fenólicos

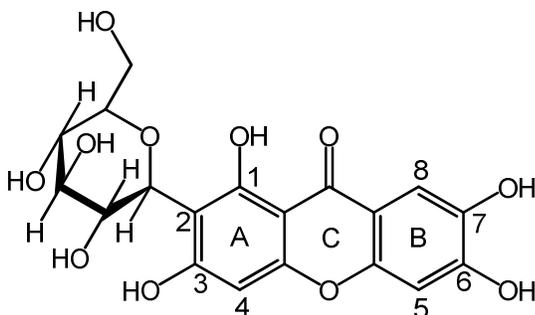
Compostos fenólicos são metabólitos secundários amplamente encontrados em plantas e apresentam diferentes estruturas, mas podem ser definidos como substâncias que possuem pelo menos um anel aromático tendo um ou mais grupos hidroxila, podendo ser classificados de acordo com o número de anéis aromáticos hidroxilados como é o caso dos ácidos fenólicos, mono ou polifenóis (FALLER; FIALHO, 2010; WENG; YEN, 2012).

A elevada capacidade antioxidante de compostos fenólicos tem atraído a atenção de pesquisadores nos últimos anos devido ao seu efeito biológico diversificado. São os principais agentes que podem doar hidrogênio para radicais livres e então quebrar a reação em cadeia da oxidação lipídica na primeira etapa de iniciação. A capacidade em potencial de sequestrar radicais permite aos compostos fenólicos atuarem como anti-inflamatório, anti-carcinogênico e antiaterosclerótico (KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011; EL OUARIACH et al., 2011; WENG; YEN, 2012). Tendo em vista tais efeitos, no presente trabalho estudamos dois compostos fenólicos - mangiferina e timol -, com amplo espectro de atividades biológicas, mas que apresentam limitações em suas aplicações farmacêuticas, a fim de melhorar sua empregabilidade e biodisponibilidade.

1.1.2.1 Mangiferina

A Mangiferina (1,3,6,7-tetraidroxi-2-[3,4,5-triidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]xanten-9-ona) (MGN) (Figura3) é um polifenol de ocorrência natural encontrado em diversos vegetais, dentre os quais *Mangifera indica* L. (mangueira), uma das árvores frutíferas mais populares do mundo, inclusive do Brasil (BARRETO et al., 2008). O interesse em MGN origina-se de sua ampla atividade biológica, por exemplo, gastroprotetiva (CARVALHO et al., 2007), analgésica (DAR et al., 2005), antibacteriana (DUANG et al., 2011) junto com citoprotetiva (PARDO-ANDREU et al., 2006). O potencial terapêutico de MGN também foi investigado na prevenção e tratamento de periodontite (CARVALHO et al., 2009). Essas propriedades foram atribuídas a suas propriedades antioxidantes, sendo MGN o componente principal (10-20%) da formulação aquosa nomeada Vimang® usada na medicina tradicional em Cuba, em pacientes que sofrem de vários tipos de estresse (GARRIDO et al., 2008).

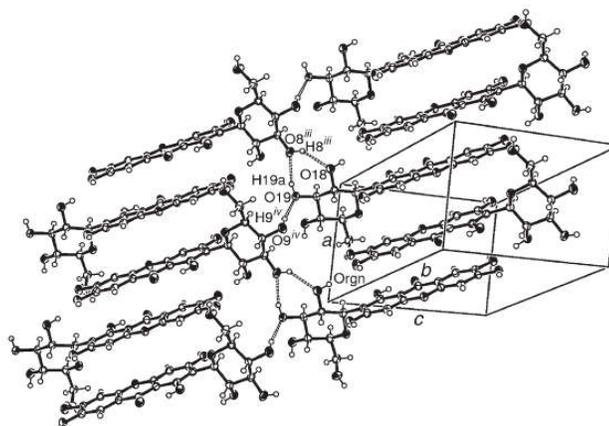
Figura3 - Estrutura numerada da mangiferina.



Fonte: Autora, 2013.

No entanto, a atividade antioxidante supracitada não necessariamente conduz a um efeito biológico *in vivo* (VAN DER MERWE et al., 2012). Segundo o estudo cristalográfico realizado por Cruz Jr. et al. (2008), as moléculas de MGN estão unidas por ligações hidrogênio intermoleculares, formando uma linha do tipo cabeça-cauda. E os planos também se ligam uns aos outros por outras ligações de hidrogênio (Figura 4). Isto talvez explique o motivo pelo qual, apesar de MGN ter uma estrutura contendo várias hidroxilas, sua solubilidade em água é limitada ($0,111 \text{ mg mL}^{-1}$), podendo comprometer sua aplicação farmacêutica (GÓMEZ-ZALETA et al., 2006; WANG et al., 2007).

Figura4 - Empacotamento cristalino de mangiferina.



Fonte: Extraído de CRUZ JR. et al., 2008.

O problema da baixa solubilidade de MGN pode ser minimizado usando ciclodextrinas (CDs), que apresentam uma habilidade especial para formar complexos ou nanoestruturas supramoleculares organizadas com uma variedade de moléculas, tais como compostos orgânicos, inorgânicos e organometálicos com uma variedade de moléculas, mostrando seletividade molecular, sendo capazes de aumentar a solubilidade de substratos lipofílicos em meio aquoso e, como consequência, sua biodisponibilidade e estabilidade, protegem contra decomposição induzida por luz, suprimem odores ou gostos desagradáveis, bem como diminuem a irritabilidade e toxicidade, e favorecem uma liberação controlada de compostos detentores de atividade biológica (LOFTSSON; MASSON, 2001; YANG; LIN; HUANG, 2004; SZENTE; SZEJTLI, 2004; SZEJTLI; SZENTE, 2005; BREWSTER; LOFTSSON, 2007; YAN et al., 2007; VENTURINI et al., 2008; ASTRAY et al., 2009), e ainda aumentam a atividade antioxidante de muitos compostos (LU et al., 2009).

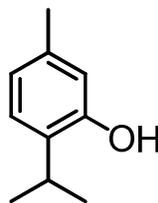
A complexação de MGN em β -ciclodextrina (β -CD) foi descrita por Ferreira (2008) e sua constante de formação aparente (K_F) calculada usando o método de Benesi-Hildebrand e através de voltametria cíclica. Ferreira (2008) assim como outros estudos (TENG et al., 2007; ZHANG et al., 2010; HUANG et al., 2011), mostraram que a inclusão de MGN na cavidade de CDs aumenta sua solubilidade e biodisponibilidade. Na época da realização do trabalho, Ferreira (2008) não conseguiu determinar como se dava a inclusão de MGN na cavidade hidrofóbica de β -CD quando em solução por ^1H RMN (devido a problemas técnicos do

equipamento). Ferreira (2008) também não conseguiu determinar como ocorre esta inclusão quando a ciclodextrina está ancorada na superfície de um eletrodo. Isto é, em ambos os casos, qual parte da molécula (grupo aromático ou resíduo glicosídico), interage com a cavidade da β -CD. Outra dúvida ainda não esclarecida é como a inclusão de MGN na cavidade de β -CD afeta sua atividade antioxidante. Estas são algumas das dúvidas que este trabalho visa esclarecer.

Além do exposto, vários estudos têm sido conduzidos em pesquisas de antioxidantes naturais para preservação de alimentos em substituição ao BHT (hidroxitolueno butilado) que pode ser responsável por danos ao fígado e por carcinogênese (KRISHNAIAH et al., 2011). Uma alternativa para este problema é a suplementação de alimentos e bebidas com antioxidantes naturais complexados com ciclodextrinas (BASU; DEL VECCHIO, 2001). Assim, o complexo MGN: β -CD pode ter aplicação futura na indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos.

1.1.2.2 Timol

O timol (isopropil-*m*-cresol) (Figura 5) é um fenol derivado do *p*-cimeno encontrado em óleos essenciais de *Carum copticum* e *Thymus vulgaris* que apresenta atividades antibacteriana (IVANOVIC et al., 2012), antimicrobiana (GUARDA et al., 2011) e antioxidante (ARCHANA et al., 2011), dentre outras (BUYUKLEYLA; RENCUZOGULLARI, 2009). Além dessas propriedades, o timol age como expectorante, pode também relaxar os músculos lisos, contribuindo assim para a digestão e para o alívio de cólicas menstruais. Timol é um componente encontrado em muitos produtos, incluindo sabonetes, pastas dentífricas, xampus, desodorantes e antissépticos bucais (BUYUKLEYLA; RENCUZOGULLARI 2009; ARCHANA et al., 2011; DEB et al., 2011).

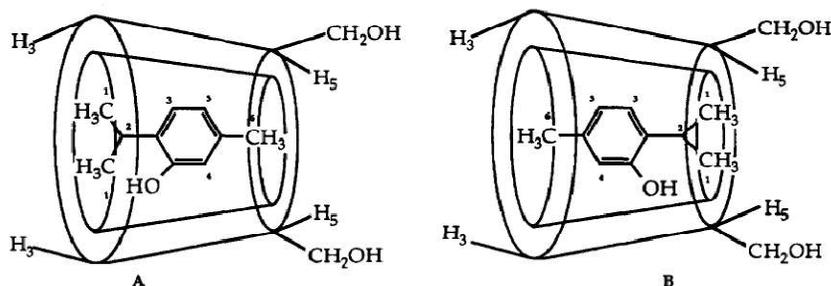
Figura5 - Estrutura do timol.

Fonte: Autora, 2013.

Apesar de sua aplicação nas indústrias de alimentos, bebidas, farmácia, perfumaria e cosméticos, e de mostrar atividade antioxidante comparável ao trolox, timol induz quebra nas fitas simples e duplas do DNA, causa um aumento na aberração cromossômica, altera a estrutura, função e resposta dos produtos celulares e afeta a velocidade de síntese do DNA; desta forma, timol apresenta efeito clastogênico (quebra de cromossomos) e genotóxico (alteração de genes), ambos dependentes da concentração. Por isto, é necessário ter cuidado em seu uso e desenvolver metodologias que minimizem seus efeitos colaterais (ÜNDEGER et al., 2009; BUYUKLEYLA; RENCUZOGULLARI, 2009).

Ciclodextrinas são conhecidas por, dentre tantas outras habilidades, a de diminuir a toxicidade de substâncias incluídas em sua cavidade (VENTURINI et al., 2008). Timol forma um complexo de inclusão estável com β -CD na razão molar 1:1. As conformações estruturais do complexo timol: β -CD foram determinadas usando ^1H RMN e modelagem molecular por Mulinacci et al. (1996). Eles mostraram que dois possíveis complexos podem ser formados (A e B), no entanto, os dados experimentais mostraram que o complexo real que existe em solução aquosa é o complexo A, que tem os hidrogênios do grupo isopropila do timol do lado largo da cavidade hidrofóbica da β -CD (Figura 6). Tendo em vista a formação efetiva deste complexo de inclusão, e o efeito genotóxico e clastogênico apresentado por timol, ciclodextrinas podem ser usadas para diminuir a toxicidade deste fenol usado em diversas formulações.

Figura6 - Esquema dos dois possíveis complexos A e B, entre Timol e β -CD.



Fonte: Extraído de MULINACCI et al. (1996).

Os testes do micronúcleo e do cometa são os mais usados para avaliar a extensão do dano causado por uma determinada substância ao DNA (DE MOURA, 2008), no entanto, eles não mostram qual o tipo de ligação e em qual das bases, o timol, por exemplo, pode se ligar. Nafisiet al. (2004), utilizando as técnicas no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia no ultravioleta visível (UV-vis), reportaram que a interação de timol com DNA ocorre através de ligação hidrogênio do grupo hidroxila do fenol principalmente com os átomos N7 da guanina e N3 da citosina. Ligações hidrogênio também ocorrem com os átomos O2 da timina, N7 da adenina e em altas concentrações de timol, também ocorre interação com esqueleto fosfato. Este trabalho, por sua vez, visa determinar o sítio de interação do timol livre e do complexo Timol: β -ciclodextrina com DNA, utilizando biossensores de DNA por meio das técnicas de Voltametria de Pulso Diferencial, Microbalança de Cristal de Quartzo e Microscopia Eletroquímica de Varredura.

1.2 Monocamadas auto-organizadas

Monocamada auto-organizada (SAM, do inglês “Self Assembled Monolayer”) é uma camada de espessura molecular formada por moléculas quimicamente ligadas à superfície de um sólido com alto grau de organização, sendo composta de três partes principais: um grupo ativo com forte interação por um substrato, uma cadeia alquila para promover estabilidade à montagem devido às interações de van der Waals e um grupo funcional na cauda da cadeia alquila que desempenha um papel importante em termos de acoplamento de uma biomolécula à monocamada (ARYA et al., 2009).

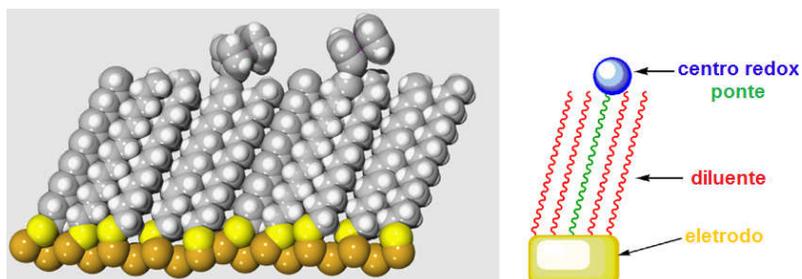
Para a formação de monocamadas auto-organizadas, o grupo mais empregado e estudado é, sem dúvida, constituído de tióis e alcanotióis sobre superfícies de ouro, devido à estabilidade da ligação Au-SR que resulta em uma estrutura altamente ordenada e inclinada de 20 a 30 graus em relação à normal. A técnica de imobilização de SAM sobre a superfície do eletrodo por meio da imersão em solução é, frequentemente, realizada em um período de 24 horas, em que o acoplamento do adsorvato, ou seja, a adsorção do tiol ao ouro é realizada em uma etapa rápida, seguido por um processo de organização muito lento. No entanto em um período de 6h já é possível obter uma monocamada auto-organizada a depender do tamanho e estrutura do alcanotiol utilizado (FREIRE et al., 2003; CANCINO, 2008; ECKERMANN et al., 2010).

A velocidade de transferência de elétrons entre um doador e um aceptor, em uma monocamada auto-organizada, está baseada em quatro variáveis:

- a energia livre de Gibbs (ΔG) que é uma grandeza que busca medir a totalidade de energia atrelada a um sistema termodinâmico disponível para execução de trabalho “útil”;
- a energia de reorganização (λ) que é energia requerida para distorcer a configuração nuclear dos reagentes para a configuração nuclear dos produtos, sem que ocorra transferência de elétrons ($-\Delta G = \lambda$);
- a temperatura (T);
- e o acoplamento eletrônico entre um doador e aceptor (H_{AB}), que pode ser controlado experimentalmente, visando eliminar problemas associados ao transporte de massa difusivo (ARYA et al., 2009; ECKERMANN et al., 2010).

Na Figura 7 está representada uma monocamada contendo um centro redox separado dos demais por uma espécie diluente.

Figura7 - Exemplo de SAM consistindo de um centro redox, uma ponte e um diluente. À esquerda, visão molecular de espaço cheio. À direita constituintes da SAM.



Fonte: Adaptado de ECKERMANN et al., 2010.

A estrutura, formação e estabilidade de monocamadas altamente organizadas têm sido amplamente estudadas por inúmeras técnicas, tais como: eletroquímicas, ressonância de plásmon de superfície (SPR), espalhamento Raman (SERS), microscopia de varredura eletroquímica (SECM), microbalança de cristal de quartzo (QCM) e também por polarização modulada da espectroscopia de reflexão-absorção no infravermelho (PM IRRAS) (SKODA et al., 2009; MOREL et al., 2010).

1.3 Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo (EQCM)

A microbalança de cristal de quartzo (QCM) já provou ser uma ferramenta eficiente para detectar moléculas, estimar constantes de afinidade, e estudar os processos de adesão celular (CARRILLO et al., 2012; VIITALLA et al., 2012). Também permite a determinação de parâmetros específicos de camadas imobilizadas, tais como a densidade de carga na superfície e viscosidade. Como mudanças nas propriedades viscoelásticas podem ser indicativas de mudanças conformacionais que não estão associados à adsorção ou dessorção de massa. Estudos por QCM estão agora sendo direcionados para a possibilidade de deduzir informações a respeito da mudança conformacional de proteínas e DNA, e em investigar diferentes aspectos da biologia da célula, como processos que envolvem a adesão celular, diferenciação e estresse (FERREIRA; DASILVA; TOMÉ, 2009).

Para entender o princípio desta técnica precisamos definir sua peça chave: os cristais. Os cristais são estruturas em que os átomos se dispõem de uma forma ordenada que se repete em toda a sua extensão. Assim, forma-se uma espécie de rede de átomos com uma disposição totalmente ordenada em toda sua extensão. A maioria dos cristais apresenta uma estrutura perfeitamente simétrica, o que significa que as forças de natureza elétrica manifestadas pelos átomos no seu interior são balanceadas, e nada de anormal ocorre ou é notado em termos de seu comportamento. No entanto, dependendo da disposição dos átomos que formam o cristal, como é o caso do quartzo formado por unidades de SiO_2 , pode ocorrer uma assimetria em relação às forças elétricas manifestadas entre as partículas. Assim, existem os casos em que essa assimetria se manifesta de tal maneira que nas faces do cristal predominem cargas de determinadas polaridades, ou seja, o material permanece constantemente carregado com cargas estáticas.

Ao final do século XIX, o físico francês Charles Augustin de Coulomb, foi o primeiro a teorizar sobre a produção de cargas por manipulação mecânica de matéria sólida. Em 1817, o mineralogista francês René-Just Haüy, observou que certos cristais apresentavam efeitos elétricos quando comprimidos, efeito que foi confirmado três anos depois por Antoine-César Becquerel (DE SOUZA, 2006). Este efeito foi chamado *efeito piezoelétrico* e sua descoberta propriamente dita, é

atribuída aos irmãos Jacques e Pierre Curie, que em 1880, demonstraram este efeito em quartzo e sal de Rochelle. Eles observaram a existência de cargas na superfície de cortes específicos do cristal desencadeadas pela colocação de pesos nestas superfícies, onde a magnitude de carga era proporcional à força aplicada. Este fenômeno é denominado efeito piezoelétrico direto e os cristais que exibem este efeito são chamados cristais piezoelétricos. O efeito piezoelétrico inverso que é a deformação de um material piezoelétrico através da aplicação de um campo elétrico foi proposto por um dos colaboradores de Pierre Curie, Gabriel Lipmann, o que se provou correto em 1881 (DE SOUZA, 2006; SMITH, 2008; FERREIRA; DA-SILVA; TOMÉ, 2009).

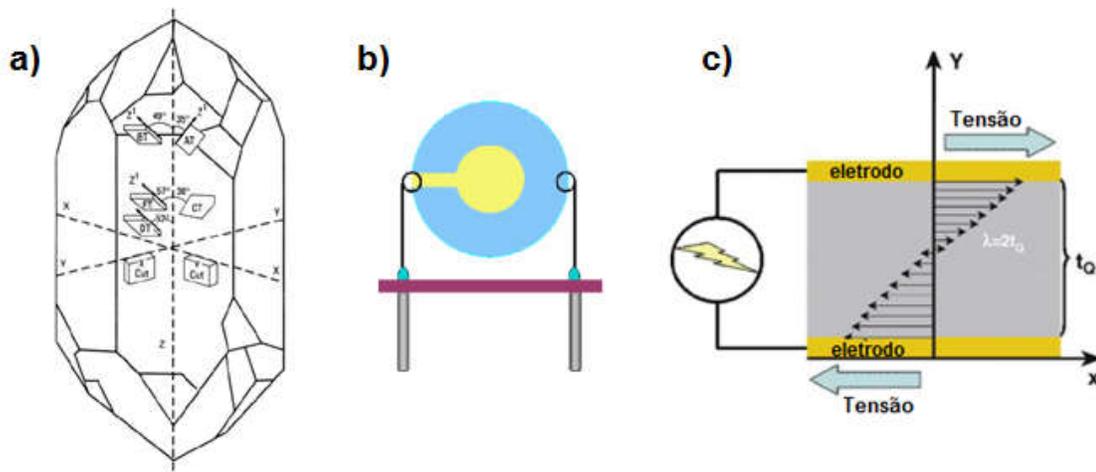
A piezoelectricidade é, portanto, uma propriedade intrínseca de materiais que não apresentam centro de simetria, de forma que, das trinta e duas classes de estruturas cristalinas, vinte delas são assimétricas. As propriedades vibratórias destes cristais podem ser alteradas dependendo do tipo de corte laminar dos mesmos em relação ao eixo óptico do monocristal.

Em geral, os discos de quartzo apresentam 10 mm de diâmetro e espessura de 0,7 a 0,1 mm para operar na faixa de frequência de 2-15 MHz. Assim, quando uma fina pastilha de um cristal de quartzo é colocada em um campo elétrico alternado na sua frequência de ressonância ou em múltiplos dessa frequência, ele irá oscilar mecanicamente em um determinado modo ressonante (VARELA; MALTA; TORRESI, 2000; BUCK et al., 2004; CASTRO, 2005). Esse é, portanto, o princípio da operação da microbalança de cristal de quartzo, um transdutor de onda acústica que está sendo amplamente utilizado para aplicações nas áreas da física, química e biologia (TUANTRANONT et al., 2011).

O modo de vibração mais sensível do quartzo é o transversal de espessura (thickness-shear mode) de alta frequência, sendo, portanto, o modo utilizado em trabalhos analíticos que utilizam a microbalança de cristal de quartzo. Neste último caso, um fino disco de quartzo é cortado no ângulo do tipo AT ($35,15^\circ$ ou $35,25^\circ$ com relação ao eixo Z) devido ao coeficiente de dependência com a temperatura ser praticamente zero a 25°C (Figura 8a). Estas finas placas de quartzo com depósitos metálicos (tipicamente de ouro) em ambos os lados (Figura 8b), sofrem uma deformação após a aplicação de um campo elétrico alternado, onde ambas as

superfícies se movem em paralelo, mas em direções opostas, gerando ondas acústicas que se propagam através do cristal, com comprimentos de onda que são fatores múltiplos do dobro da espessura do substrato (Figura 8c) (BUCKET al., 2004; CASTRO, 2005; FERREIRA; DA-SILVA; TOMÉ, 2009).

Figura 8 -a) Ângulo de corte, em relação aos seus eixos cristalográficos de um cristal de quartzo. b) Aspectos fundamentais de um sensor de cristal de quartzo, representação esquemática de cristal de quartzo com depósito de ouro para aplicação eletroquímica. (c) Deformação tangencial gerada após a aplicação de um campo elétrico.



Fonte: Adaptado de FERREIRA et al., 2009.

Sauerbrey (1959) foi o primeiro a mostrar que um cristal de quartzo pode ser usado como um micro dispositivo de “pesagem” quando operado em vácuo ou no ar. Ele mostrou que quando um fino filme rígido (um depósito metálico, por exemplo) é adsorvido na superfície de um cristal de quartzo, a massa adicional vibra de forma sincronizada com o cristal e a mudança de frequência de ressonância (Δf_m , em Hz) está relacionada com o aumento de espessura Δh através da relação (CASSIÈDE et al., 2010):

$$\frac{\Delta f_m}{f_r} = - \frac{\Delta h}{h_q} \quad (1)$$

onde h_q é a espessura do cristal de quartzo e f_r a frequência de ressonância no n -ésimo *overtone* (sobretono). A introdução de uma área piezoelectricamente ativa permite

estabelecer uma relação linear entre a frequência de ressonância e a massa adicionada de acordo com a relação de Sauerbrey (CASSIÈDE et al., 2010):

$$\Delta f_m = -\frac{2f_0^2}{A\sqrt{\rho_q\mu_q}}\Delta m \quad (2)$$

onde μ_q é o módulo de cisalhamento do quartzo, em $\text{g cm}^{-2} \text{ s}^{-2}$, ρ_q é a densidade do quartzo, em g cm^3 , A é a área do cristal em cm^2 e f_0 representa a frequência de ressonância nominal do cristal de quartzo, sendo representado por (CASSIÈDE et al., 2010; Tutorial METROHMAutolab EQCM):

$$f_0 = \frac{1}{2h_q} \sqrt{\frac{\mu_q}{\rho_q}} \quad (3)$$

Para um cristal de 6 MHz, a equação 2 pode ser reduzida para:

$$-\Delta f = \Delta m C_f \quad (4)$$

onde C_f , é $0,0815 \text{ Hz cm}^2 \text{ ng}^{-1}$.

Por muito tempo acreditou-se que a relação de Sauerbrey se aplicava apenas a filmes rígidos, isto porque quando o cristal de quartzo é utilizado em um ambiente fluido, a energia é perdida para o fluido através das ondas de cisalhamento acústico, resultando em perda na qualidade da frequência. No entanto, na década de 1980, estudos mostraram que QCM é aplicável também a líquidos e surge então uma relação para a frequência de oscilação exercida por um líquido. Dessa forma, para líquidos Newtonianos como a água, a mudança na frequência depende da densidade (ρ) e viscosidade (η) do fluido de acordo com a seguinte relação (FERREIRA; DA-SILVA; TOMÉ, 2009; CASSIÈDE et al. 2010; LEINARTAS; MIECINSKAS; JUZELIUNAS, 2009):

$$\Delta f_n = \frac{f_0^{3/2}}{\sqrt{\pi\rho_q\mu_q}} \sqrt{\rho_{fluido}\eta_{fluido}} \quad (5)$$

O desenvolvimento desta relação permitiu o uso da QCM em eletroquímica, onde a mesma serve como eletrodo de trabalho em uma célula eletroquímica. Surge então a microbalança eletroquímica de cristal de quartzo (EQCM), também amplamente utilizada em química eletroanalítica e bioeletroquímica, pois permite detectar mudanças de massa associadas a reações *eletroquímicas* e ajuda na elucidação de mecanismos de vários processos físico-químicos importantes (BUCKET al., 2004). A interpretação quantitativa dos dados da EQCM é baseada na combinação da equação de Sauerbrey e lei de Faraday (BOTT, 1991).

As vantagens do método incluem alta sensibilidade, medidas *in situ* não-invasivas e em tempo real e possibilidade de realizar outras medidas simultaneamente, por outro lado, o depósito metálico no cristal de quartzo piezoelétrico usado em EQCM limita-se a poucos metais, especialmente ouro. Isto representa um fator limitante em estudos eletroquímicos (LEINARTAS; MIECINSKAS; JUZELIUNAS, 2009; PINTO et al., 2009).

EQCM vem corroborando com várias outras técnicas como microscopia eletroquímica de varredura (SECM) e espectroscopia de reflexão-absorção no infravermelho com polarização modulada (PM IRRAS), a fim de obter informações mais detalhadas principalmente sobre a formação de monocamadas na superfície do cristal de quartzo (GABRIELLI et al., 2007; TAGLIAZUCCHI et al., 2010).

O procedimento supracitado foi bem discutido por Marcotte e Tabrizian (2008), onde eles mostram que devido à complexidade de muitos sistemas, muitas vezes faz-se necessário o uso de várias técnicas recentes com métodos bem estabelecidos para se chegar a uma conclusão plausível, e aponta ainda a microbalança de cristal de quartzo com uma técnica versátil e não invasiva. Tendo em vista esta característica de QCM, Ribaut et al. (2008) reportaram uma estratégia de imobilização de eritrócitos em ouro de maneira reprodutível via superposição de camadas ligadas uma a outra por ligação covalente ou interação eletrostática, e todas as etapas foram acompanhadas por EQCM.

Além de tudo, a microbalança de cristal de quartzo é uma técnica capaz de detectar baixíssimas concentrações de um analito. Wang et al. (2009)

desenvolveram um imunossensor pelo princípio da monocamada sobre um cristal de quartzo recoberto com ouro usando nanopartículas de ZrO_2 como sorvente seletivo para detecção de acetilcolinaesterase fosforilada como um novo biomarcador para biomonitoração de pesticidas organofosforados. Esse imunossensor permitiu a detecção de acetilcolinaesterase fosforilada em plasma humano com um limite de detecção de $0,020 \text{ nmol L}^{-1}$.

No presente trabalho, a técnica supracitada foi utilizada para acompanhar a formação e posterior caracterização de monocamada auto-organizada de DNA e a interação do mesmo com substâncias de interesse biológico.

1.4 Espectroscopia de Reflexão-Absorção no Infravermelho com Polarização Modulada (PM IRRAS)

A espectroscopia no infravermelho (IV) é uma das técnicas mais usadas por químicos orgânicos e inorgânicos, isto porque a luz com comprimento de onda entre $2,5$ e $25 \mu\text{m}$ interage com a matéria e entra em ressonância com os dipolos das moléculas. Com isso é possível determinar os diferentes grupos funcionais ou ligações químicas que uma molécula possui, permitindo a confirmação da identidade de um composto puro ou para detectar a presença de impurezas específicas [HSU, 1997; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005].

As espectroscopias vibracionais no infravermelho *in situ* são ferramentas valiosas para caracterizar filmes ultrafinos e camadas simples e múltiplas ancoradas em uma interface metálica. Estas técnicas permitem detectar, identificar e quantificar as espécies na interface e converter a informação obtida em sua orientação e ambiente (TAGLIAZUCCHI et al., 2010).

A investigação da adsorção de moléculas orgânicas em superfícies metálicas data do final da década de 1960, sendo Greenler o pioneiro da espectroscopia de reflexão-absorção (RAS). Na década seguinte, a técnica foi adaptada para a investigação eletroquímica *in situ* que usa a modulação do potencial do eletrodo para atingir a sensibilidade de superfície de RAS. A técnica desenvolvida é atualmente conhecida como espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier interfacial subtrativa e normalizada (SNIFTIRS). Simultaneamente, outro

grupo de pesquisa usou a modulação da polarização do feixe incidente para alcançar a melhoria da sinal da superfície metálica. Esta abordagem foi posteriormente melhorada com o uso da transformada de Fourier, resultando em uma técnica conhecida como Espectroscopia de Reflexão Absorção no Infravermelho com Polarização Modulada (PMIRRAS) (BLATT; ROSCOE; ZAMLYNNY, 2010; BLAUDEZ; CASTANO; DESBAT, 2011).

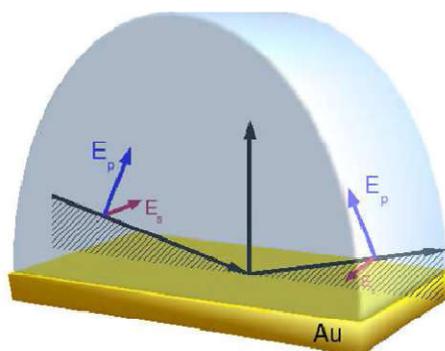
A espectroscopia de reflexão-absorção no infravermelho (IRRAS) é uma técnica analítica usada para estudar finas camadas em substratos reflexivos. As orientações moleculares de um filme fino em um substrato metálico podem ser determinadas baseando-se na absorção seletiva da luz p -polarizada e s -polarizada pelas moléculas adsorvidas (BLAUDEZ; CASTANO; DESBAT, 2011). A componente p refere-se à radiação polarizada paralela e a s refere-se à radiação polarizada perpendicular com respeito ao plano de incidência (SKODA et al., 2009).

Quando a luz é refletida da superfície de um metal, o vetor elétrico da radiação incidente sofre uma mudança de fase que depende do ângulo de incidência e do estado de polarização. A mudança de fase para luz s -polarizada não é uma função fortemente dependente do ângulo de incidência, permanecendo próximos de 180° para todos eles, dessa forma, os vetores elétricos incidente e refletido somam aproximadamente zero na superfície, resultando em somente um pequeno campo elétrico líquido na superfície metálica. Por outro lado, para luz p -polarizada, a mudança de fase é fortemente dependente do ângulo de incidência e varia de aproximadamente 0° (à incidência normal) à 180° (à incidência rasante), com isso, a soma vetorial entre os vetores elétricos incidente e refletido resulta num campo elétrico na superfície (Figura 9). Este campo elétrico é ainda intensificado nas proximidades da superfície com quatro vezes a intensidade incidente, uma vez que a intensidade é o quadrado da amplitude do campo elétrico, a ângulos rasantes (TRASFERETTI; DAVANZO, 2001).

Tendo em vista o supracitado, fica claro que somente o componente paralelo da radiação incidente pode ser apreciavelmente absorvido por um filme adsorvido e que absorções máximas ocorrerão a ângulos de incidência próximos ao rasante. Tais particularidades de cada estado de polarização frente a superfícies metálicas são conhecidas como “regras de seleção” da superfície metálica. Essas “regras de

seleção”, entretanto, deixam de existir conforme a espessura do filme aumenta (TRASFERETTI; DAVANZO, 2001).

Figura9 -Ilustração esquemática da radiação *p* e *s*-polarizada.



Fonte: Extraído de SKODAet al., 2009.

Geralmente, os experimentos IRRAS consistem na gravação da refletividade da luz *p*-polarizada $R_p(d)$ do filme em um substrato metálico e, em seguida, normalizando-o com respeito ao do substrato $R_p(0)$. Então o espectro IRRAS é representado em termos de um espectro de pseudo absorção, como mostra a equação 6 (BUFFETEAU; DESBAT; TURLET, 1991).

$$A(d) = 1 - \frac{R_p(d)}{R_p(0)} \quad (6)$$

Ao contrário do estudo de filmes finos, a caracterização de filmes ultrafinos, tal como uma camada de Langmuir-Blodgett, necessita de várias horas de medida utilizando a espectroscopia IRRAS para conseguir uma razão sinal/ruído aceitável. Além disso, como absorções que ocorrem na atmosfera em tornada amostradas também são detectadas, torna o espectro menos legível, experimentos *in situ* em uma determinada atmosfera geralmente não são possíveis com IRRAS (BUFFETEAU; DESBAT; TURLET, 1991).

A sensibilidade do método pode ser significativamente melhorada através do emprego da técnica de modulação de polarização (PM). A técnica PM-IRRAS, combina a modulação de Fourier produzida pelo interferômetro FTIR com uma rápida modulação de polarização produzida pelo modulador fotoelástico e extrai da intensidade detectada, os dois sinais $(R_p - R_s)$ e $(R_p + R_s)$ para compor o espectro de refletividade diferencial $\Delta R/R$ (equação 7) (BUFFETEAU; DESBAT; TURLET, 1991; CASTANO et al., 2009).

$$\left(\frac{\Delta R}{R}\right) = \frac{R_p - R_s}{R_p + R_s} \quad (7)$$

A alta sensibilidade superficial e imunidade a absorções do ambiente ao redor da amostra permitem ao PM IRRAS: um ganho de duas a três ordens de magnitude na detectividade da absorção superficial; melhor caracterização de monocamadas e realização de estudos cinéticos rápidos nesses sistemas, além de obter informações como conformação, orientação e ordem estrutural das moléculas ancoradas na superfície do substrato metálico. Outra principal vantagem do método PM IRRAS, é que as medidas são tomadas em uma sala com atmosfera normal, onde os espectros são dominados por bandas de absorção de CO₂ e vapor de água, no entanto, no espectro diferencial, estas absorções isotrópicas são quase perfeitamente compensadas, devido às amostragens simultâneas precisas ($R_p - R_s$) e ($R_p + R_s$) do interferograma (BUFFETEAU; DESBAT; TURLET, 1991; MENDELSON; MAO; FLACH, 2009).

As medidas *in situ* de PM IRRAS podem ser obtidas tanto para filmes ou monocamadas auto-organizadas em contato com líquidos e ar, no entanto, em ambos os casos o controle preciso dos parâmetros experimentais tais como espessura do filme de água e ângulo de incidência, é requerido, para uma análise quantitativa de forma a obter uma boa razão sinal/ruído. Em geral, a razão sinal/ruído em experimentos com medidas em solução, é menor comparada a medidas ao ar (SKODA et al., 2009).

A técnica acima citada vem sendo utilizada na caracterização de filmes finos depositados em semicondutores e isolantes; no estudo da interação lipídeo/proteína e lipídeo/DNA em ambiente fisiológico; na formação e caracterização de SAMs (TRASFERETTI; DAVANZO, 2001; BRIAND et al., 2006; MENDELSON; MAO; FLACH, 2009; CASTANO et al., 2009).

Para quem trabalha com modificação de eletrodos utilizando o princípio de SAM, um de seus objetivos é visualizar e entender as implicações estruturais e conformacionais das moléculas que estão distribuídas na superfície do substrato. Foi partindo desse princípio que ZORNet al. (2012) utilizou a técnica de PM IRRAS juntamente com espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS, sigla do

inglês) para avaliar a influência da luz ambiente sobre uma monocamada de hexa(etileno)glicol em ouro.

RAHMAN; LEE, (2013) prepararam um nanoimunosensor baseado em microbalança de cristal de quartzo através da formação de monocamada auto-organizada para a detecção de anexina, uma proteína usada como biomarcador para câncer de próstata e pulmão. Os autores apontaram a técnica de PM IRRAS como útil para determinar a estrutura e orientação da proteína sobre diferentes monocamadas de lipídeos.

Neste trabalho, a técnica discutida acima, foi utilizada na caracterização de uma monocamada auto-organizada de ciclodextrina e para avaliar a formação de complexos de inclusão com substâncias de interesse biológico.

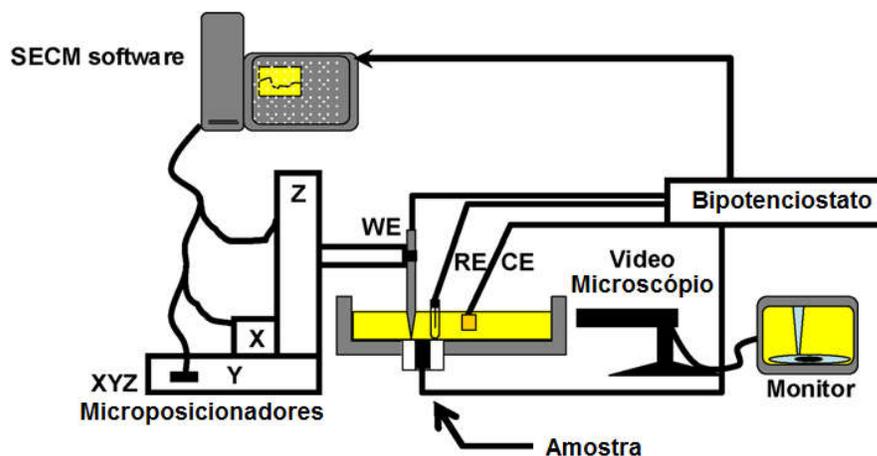
1.5 Microscopia Eletroquímica de Varredura (SECM)

A microscopia eletroquímica de varredura(SECM)é uma poderosa técnica para investigação quantitativa de processos físico-químicos interfaciais como é o caso de reações heterogêneas de transferência de elétrons, transportemolecularatravés de membranas, processos de adsorção/dessorção e corrosão, ede transferência de carga na interface líquido/líquido(EDWARDS et al., 2006; LU; WANG, LIU, 2007). SECM permite uma alta resolução de imagem da atividade eletroquímica em uma superfície da mesma maneira que a microscopia de força atômica pode ser utilizada para obter informação topográfica (ROBERTS et al., 2013).

SECM baseia-se na teoria eletroquímica, onde a mudança de carga faradáica é medida quando um ultramicroeletrodo (UME)com uma pontaentre 1 e 25 μm é mantido estático ou movido sobre a superfíciede um substrato que pode ser sólido (vidro, metal, polímero, material biológico) ou líquido (mercúrio, óleos imiscíveis), imerso em uma solução contendo uma espécie eletroativa, possibilitando assim a obtenção de informações localizadas sobre propriedades químicas, eletroquímicas, cinéticas e topográficas das interfaces em estudo (BARD e MIRKIN, 2001; LU; WANG; LIU, 2007; DE FREITAS, 2007).

Na Figura10, está representado um diagrama esquemático de um sistema de SECM, onde o UME e o substrato servem como eletrodos de trabalho e fazem parte de uma cela eletroquímica juntamente com os eletrodos de referência e auxiliar, além de um eletrólito contendo um mediador redox ativo. Os potenciais da ponta e do substrato são controlados por um bipotenciostato para garantir que as reações em ambos, ocorram a uma velocidade de difusão controlada. Quando uma diferença de potencial é aplicada entre o substrato e o UME, o mediador sofrerá uma reação redox e a corrente registrada dependerá da distância entre eles e da natureza condutora ou isolante do substrato (BRETT e BRETT, 1996; BARD e MIRKIN, 2001; BOLLO; FERREYRA; RIVAS, 2007; ROBERTS et al., 2007).

Figura10 - Diagrama esquemático de um sistema de SECM. O UME é conectado em um dispositivo de microposicionamento XYZ e varre através da superfície da amostra. Parâmetros eletroquímicos e de varredura são controlados através de uma interface de computador.



Fonte: Adaptado de ROBERTS et al., 2007.

Para uma reação redox do tipo $O + ne^- \rightarrow R$, a corrente gerada alcança um valor limite no qual o processo é totalmente controlado pela taxa de transporte de massa por difusão da espécie O para a superfície do eletrodo, onde a reação de redução diminui sua concentração para zero. Logo, a corrente em estado estacionário de um processo controlado por difusão quando o microeletrodo, imerso em uma solução eletrolítica contendo a espécie eletroativa, está infinitamente afastado da superfície é dada pela equação 8 (BRETT e BRETT, 1996; DE FREITAS, 2007)

$$i_{T,\infty} = 4nFDCa \quad (8)$$

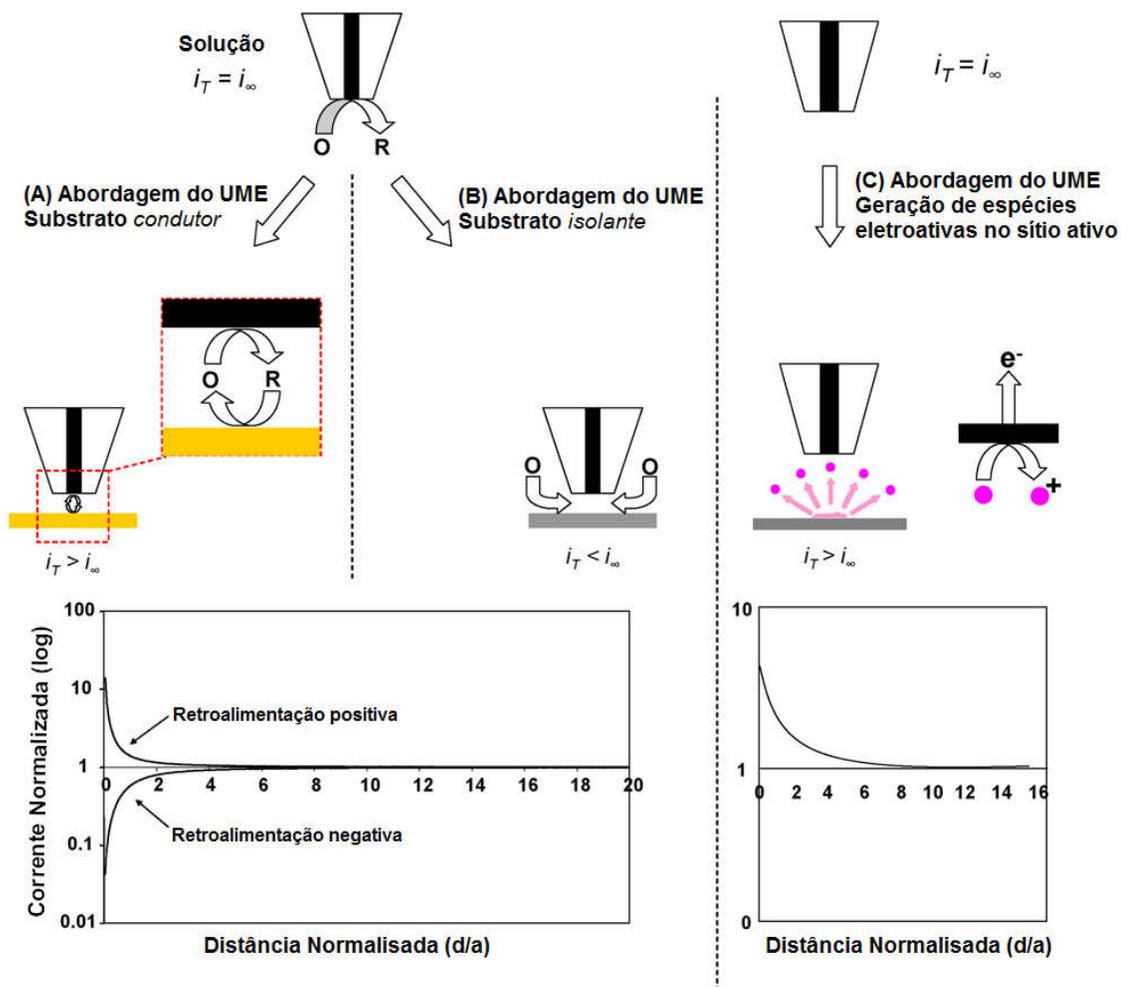
onde i_T é a corrente limite de difusão em Àmpere, F é a constante de Faraday (96 485 C mol⁻¹), n é o número de elétrons transferidos na reação, D é o coeficiente de difusão das espécies eletroativas (m² s⁻¹), C é a concentração da espécie eletroativa na solução (mol L⁻¹), a é o raio da ponta (µm). No entanto, quando o UME é movido em direção ao substrato, observa-se que a corrente limite de difusão (i_T), aumenta ou diminui, dependendo das propriedades de transferência de carga do substrato (BOLLO; FERREYRA; RIVAS, 2007; ROBERTS et al., 2007).

A microscopia eletroquímica de varredura possui basicamente dois modos de operação em estado estacionário, o modo de retroalimentação (*feedback*) e o modo geração-coleta. No modo de retroalimentação, o microeletrodo é mantido em um potencial que proporciona a eletrólise em estado estacionário de uma espécie em solução (DE FREITAS, 2007; ROBERTS et al., 2007).

Quando o substrato é condutor ou eletroquimicamente ativo, o mediador é reciclado no substrato, tornando-se mais uma vez disponível para sofrer a reação redox no UME, resultando em um aumento na corrente faradáica observada, logo, $i_T > i_{T,\infty}$, sendo o processo denominado retroalimentação ou *feedback* positivo (Figura 11a). Quando o substrato é isolante ou eletroquimicamente inerte, a difusão do par redox para o UME é fisicamente dificultada pelo substrato, resultando em uma diminuição da corrente faradáica ($i_T < i_{T,\infty}$), sendo o processo denominado retroalimentação ou *feedback* negativo, como representado na Figura 11b (ROBERTS et al., 2007; BOLLO ; FERREYRA; RIVAS, 2007).

No modo de geração-coleta (Figura 11c), ao contrário da retroalimentação, o UME atua apenas como detector de espécies eletroativas produzidas pelo substrato. É um modo de operação particularmente importante quando usado em meios biológicos, onde a bioquímica do processo sob investigação é independente da presença do UME (ROBERTS et al., 2007).

Figura11 -Representação esquemática da retroalimentação positiva (A) e negativa (B) e do modo de geração-coleta (C).



Fonte: Adaptado de ROBERTSet al., 2007.

A microscopia eletroquímica de varredura é utilizada para acompanhar transferência de elétrons heterogênea, reações químicas homogêneas, caracterização de filmes e membranas, investigação de interfaces líquido-líquido, dentre outros.

ROBERTSet al., 2011 (*apud* ROBERTS et al. 2012) desenvolveram um método simplificado no qual SECM pode ser usada para fabricar microdispositivos para imobilizar a peroxidase horseradish e então visualizar sua atividade. Os diferentes modos de uso de SECM podem ser usados para complementar estudos utilizando outras técnicas. Foi o que fizeram DOBRZENIECKAet al. (2013), que complementaram estudos de eletrodo de disco rotatório e eletrodo anel disco

rotatório, para estudar a reação de redução de O_2 em diferentes catalisadores. Em trabalho recente, LUQUE et al. (2011) acompanharam a formação de um complexo entre *dsDNA* em solução com polietilenimina disperso em nanotubos de carbono utilizando técnicas eletroquímicas e SECM. Neste trabalho, esta técnica auxiliará na investigação da interação de uma substância de interesse biológico com características genotóxica e mutagênica (timol) com DNA imobilizado na superfície de um eletrodo.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo geral desta tese é estudar duas classes de compostos: as quinonas, que ainda não foram estudadas eletroquimicamente, mas que apresentam potencial atividade farmacológica e, dois fenóis, a mangiferina e o timol, para os quais objetiva-se a realização de estudos complementares a trabalhos do grupo de Eletroquímica da UFAL, com utilização de técnicas avançadas.

2.2 Objetivos Específicos

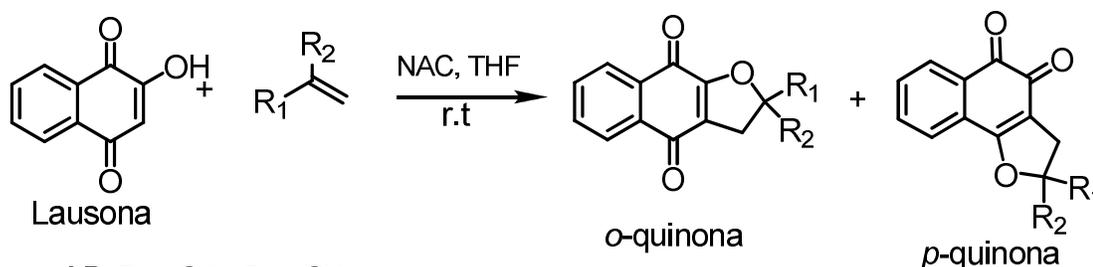
- ✓ Investigar o comportamento eletroquímico de quinonas diidrofurânicas em meio aquoso e não-aquoso, visando a obtenção de parâmetros eletroquímicos que possam ser correlacionados com atividades biológicas, em busca do entendimento do mecanismo de ação.
- ✓ Avaliar a interação das quinonas diidrofurânicas com β -ciclodextrina;
- ✓ Desenvolver biossensores de DNA utilizando a técnica de microbalança eletroquímica de cristal de quartzo e estudar a interação de quinonase timol com o DNA.
- ✓ Utilizar a técnica de espectroscopia de reflexão-absorção no infravermelho com polarização modulada (PM IRRAS) para caracterizar a monocamada auto-organizada de β CD-S-Au, e comprovar a formação dos complexos de inclusão de β -Lapachona: β -ciclodextrina e Mangiferina: β -ciclodextrina;
- ✓ Utilizar as técnicas de voltametria de pulso diferencial, microbalança eletroquímica de cristal de quartzo e microscopia eletroquímica de varredura para avaliar a interação de timol tanto livre quanto complexado com β -ciclodextrina com DNA.
- ✓ Caracterizar o complexo MGN: β -CD através das técnicas de FT-IR, DSC, ^1H RMN e avaliar sua atividade antioxidante usando os métodos do DPPH e ORAC-FL. Além disso, avaliar seu efeito protetor contra peroxidação lipídica iniciada pelo radical peroxila.
- ✓ Provar a eficiência do método de preparo de ssDNA utilizando eletroforese.

3 EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e Solventes

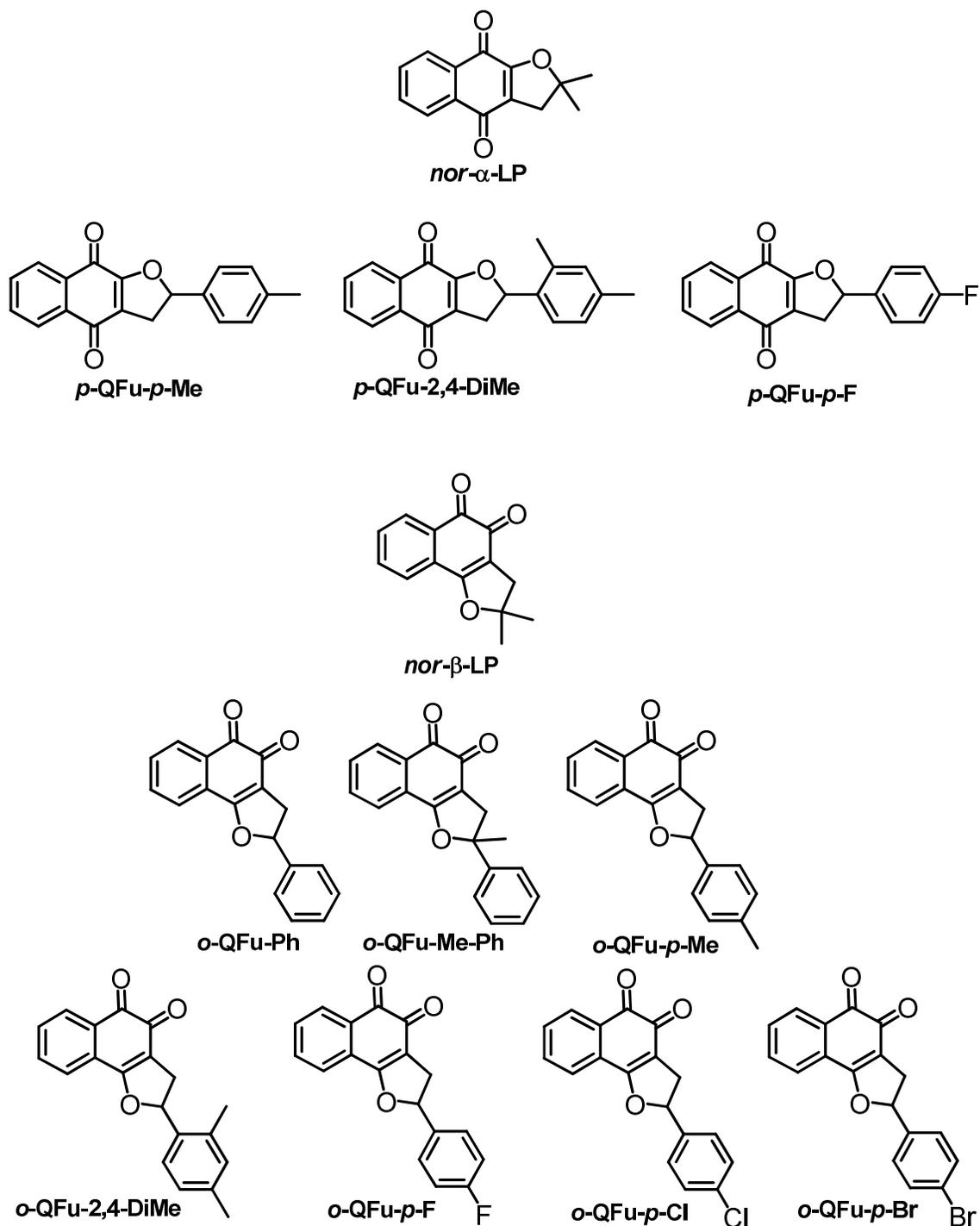
As naftodiidrofuranoquinonas estudadas neste trabalho foram cordialmente cedidas pelos professores Dr. Vitor Francisco Ferreira (UFF) e Dra. Sabrina Baptista Ferreira (UFRJ) e sua síntese já foi reportada (FREIRE et al., 2010). Estas quinonas foram obtidas pela reação da lausona com estirenos na presença de nitrato de amônio cérico (NAC) como agente oxidante e o solvente usado foi tetraidrofurano (THF) anidro (Figura 12). Nessa reação, uma solução de nitrato de amino cérico (1.260 g, 2.3 mmol) em THF seco (10 mL) foi gotejada a uma solução resfriada de 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (0.174 g, 1 mmol) e dieno (2 mmol) em THF seco (10 mL). A mistura resultante foi agitada por 30 min e então extraída com acetato de etila e água. Os extratos orgânicos foram lavados com água, filtrados em concentrado sob vácuo, e secos sob sulfato de sódio anidro. A reação levou dois produtos α - e β -naftodiidrofuranoquinonas, as quais foram separadas por cromatografia em coluna usando hexano / AcOH como eluente. As estruturas foram confirmadas por infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C e análise elementar.

Figura 12 - Rota sintética usada para a preparação de α - e β -naftodiidrofuranoquinonas e estruturas das quinonas estudadas neste trabalho.



nor- α -LP: $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{CH}_3$
p-QFu-2,4-DiMe: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = 2,4\text{-diCH}_3\text{-C}_6\text{H}_5$
p-QFu-p-Me: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = p\text{-CH}_3\text{-C}_6\text{H}_5$
p-QFu-p-F: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = p\text{-F-C}_6\text{H}_5$

nor- β -LP: $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{CH}_3$
 α -QFu-Ph: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{C}_6\text{H}_5$
 α -QFu-Me-Ph: $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{C}_6\text{H}_5$
 α -QFu-p-Me: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = p\text{-CH}_3\text{-C}_6\text{H}_5$
 α -QFu-2,4-DiMe: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = 2,4\text{-diCH}_3\text{-C}_6\text{H}_5$
 α -QFu-p-Cl: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = p\text{-Cl-C}_6\text{H}_5$
 α -QFu-p-F: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = p\text{-F-C}_6\text{H}_5$
 α -QFu-p-Br: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = p\text{-Br-C}_6\text{H}_5$



Fonte: Autora, 2013.

A mangiferina (M: 422 g mol⁻¹) com 95% de pureza, foi isolada, purificada e caracterizada por Barreto et al.(2008),e gentilmente cedida pela Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, em colaboração com o Laboratório de Eletroquímica

do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL. O Timol ($M = 140,22 \text{ g mol}^{-1}$) foi obtido da Ecibra (São Paulo, Brasil).

O radical DPPH[•] (2,2'-difenil-2-picril-hidrazil), β -ciclodextrina (β -CD), ferrocenometanol (FcCH_2OH), ácido perclórico, ácido desoxirribonucleico fita dupla (*dsDNA*) do tipo I, altamente polimerizado de *calf thymus* (timo de bezerro, com as seguintes especificações: 6,2 % de Na^+ e 13% (v/v) de H_2O , dessecado e armazenado à 8°C), e ácido desoxirribonucleico fita simples (*ssDNA calf thymus* pó liofilizado, massa molar – 50 kb, *ssDNA*, $\geq 65\%$), AAPH (2,2'-azobis(2-metilpropionamida)diidrocloreto, fluoresceína sal dissódio, Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico ácido), Trizma hidrocloreto e fosfatidilcolina de soja foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

Ácido Gálico (AG), iodo, tiouréia, hidróxido de sódio (NaOH), hidrogenossulfato de potássio (KHSO_4), fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) e fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), sulfato de cobre (CuSO_4 anidro), brometo de tetrabutilamônio (TBABr) *N,N*-dimetilformamida (DMF), metanol (MeOH), etanol (EtOH), cloreto de sódio (NaCl), acetato de sódio, ácido acético e acetato de etil têm procedência da Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil). Trifenilfosfina (PPh_3) foi adquirida da Fluka. Metóxido de sódio (MeONa) foi obtido da Alfa Aesar. Ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) foi obtido da Merck (Darmstadt, Germany). Óxido de alumínio (Al_2O_3) foi adquirido da Acrós Organics (New Jersey, USA). Hidrocloreto de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etil-carbodiimida (EDC) foi adquirido da Fluka (Sigma-Aldrich Steinheim, Germany). Ácido 4,40-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-S-indaceno-3-undecanóico ($\text{C11-BODIPY}^{581/591}$), é proveniente de Molecular Probes (Ontario, Canada).

Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas em água ultrapura (18 $\text{M}\Omega \text{ cm}$) de um sistema de purificação Milli-Q da Millipore Inc.

3.2 Estudos Eletroquímicos

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PGSTAT (AUT73222) da MetrohmAutolab[®] em um sistema de três eletrodos. Como eletrodo de trabalho utilizou-se eletrodos de carbono vítreo (BAS, diâmetro 1,6 mm) e cristal de quartzo com cobertura de ouro em ambos os lados; como eletrodo auxiliar foi utilizado um fio de platina espiralado e, como eletrodo de referência foi utilizado o sistema Ag|AgCl|Cl⁻ (saturado) da BAS. As medidas foram realizadas à temperatura de 25 ± 1 °C. O tratamento posterior dos gráficos foi realizado através do programa Origin 8.0.

Os experimentos utilizando microbalança eletroquímica de cristal de quartzo foram realizados utilizando um potenciostato/galvanostato PGSTAT (AUT73222) da Metrohm Autolab[®] acoplado a um oscilador EQCM (EQCM7029). Foram utilizados cristais de quartzo de corte AT (Metrohm Autolab[®]) com frequência de oscilação de 6 MHz recobertos em ambas as faces por uma fina camada de ouro, servindo como eletrodos de trabalho.

3.2.1 Estudos em meio aprótico

As análises em meio aprótico foram conduzidas utilizando como eletrólito de suporte a solução de *N,N*-dimetilformamida (DMF) e perclorato de tetrabutilamônio (TBAP, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Ambos os reagentes foram cuidadosamente purificados antes das análises como descrito a seguir.

A purificação do DMF foi realizada sob pressão reduzida, após tratamento com o CuSO₄ (sulfato de cobre) anidro (para remoção de aminas), ou fazendo-o passar por uma coluna contendo alumina (Al₂O₃).

Para a síntese de TBAP procedeu-se da seguinte forma: 101,44 g de brometo de tetrabutilamônio (TBABr) foram lentamente dissolvidos em 300 mL de água destilada, sendo adicionada posteriormente à solução aquosa de TBABr, uma alíquota de 30 mL de ácido perclórico, resultando em uma suspensão branca. O produto formado foi filtrado a vácuo, originando pequenos cristais brancos. A água mãe desse processo de filtração apresentava pH ~ 1,0, o precipitado foi lavado até o filtrado apresentar pH ~7,0. Para a recristalização, os cristais filtrados foram

dissolvidos em acetato de etila a quente e a mistura colocada num funil de separação para remoção de água residual. A fase acetato de etila foi então colocada em um banho de gelo para cristalização e, em seguida, os cristais formados foram secados sob pressão reduzida.

3.2.2 Estudos em Meio Aprótico em Presença de Oxigênio

Estudos eletroquímicos em meio aprótico (DMF + TBAP 0,1 mol L⁻¹) foram realizados em presença e ausência de oxigênio para averiguar a reatividade, após redução da *nor-α*-lapachona e *nor-β*-lapachona e seus derivados arilados, frente a oxigênio. Analisaram-se os parâmetros eletroquímicos, como o potencial e corrente de pico para a primeira onda de redução. Cada componente foi adicionado ao eletrólito de suporte e a solução foi desaerada com argônio antes das medidas por voltametria cíclica. O oxigênio foi então borbulhado dentro da célula e sua concentração foi monitorada com oxímetro (Digimed DM-4). Voltamogramas cíclicos foram registrados em diferentes concentrações de oxigênio.

A constante catalítica (k_{app}) para reação com oxigênio foi determinada a partir da equação descrita por BARD e FAULKNER (1990), como segue:

$$I_{pc} = \frac{I_{pR}}{I_{pO}} = \frac{k R T [O_2]}{n F v} \quad (eq. 9)$$

onde, I_{pc} = corrente catalítica; I_{pR}/I_{pO} = corrente normalizada; $k[O_2]$ = k_{app} é a constante catalítica aparente (s⁻¹); v = velocidade de varredura (V s⁻¹); n = número de elétron; F = Constante de Faraday (96485 C mol⁻¹); T = temperatura (298 K); R = 8,314 J mol⁻¹ K⁻¹.

3.2.3 Estudos em meio prótico

Nas análises eletroquímicas em meio prótico foi utilizado como eletrólito suporte solução de tampão fosfato (pH 7,0, força iônica 0,2 mol L⁻¹). Para o preparo do tampão, foram utilizados fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄) e fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄), dissolvidos em água purificada em um sistema Milli-Q Millipore. O valor de pH da solução foi determinado em pH-metro modelo Quimis Q400A.

3.2.4 Estudo da interação da *nor-α*-lapachona, *nor-β*-lapachona e respectivos derivados com β-CD

A interação da *nor-α*-lapachona, *nor-β*-lapachona e respectivos derivados com β-CD foi realizada em experimentos de transferência de fase, em que massas correspondentes a 0,1 mmol L⁻¹ de cada quinona foram adicionadas à cela eletroquímica contendo tampão fosfato pH 7,0 em atmosfera inerte obtida por desaeração com nitrogênio. Após 15 minutos de agitação, a resposta eletroquímica foi registrada.

Em seguida, foram adicionadas massas de β-CD correspondentes às concentrações de 0,01, 0,1 e 1,0 mmol L⁻¹, sendo a solução agitada e desaerada, a cada adição de β-CD, por 15 minutos, para então ser realizada a medida eletroquímica. A interação e consequente formação de complexos de inclusão foram avaliadas através das mudanças observadas nos parâmetros eletroquímicos de potencial e corrente de pico, em cada procedimento.

3.2.5 Ensaios biológicos

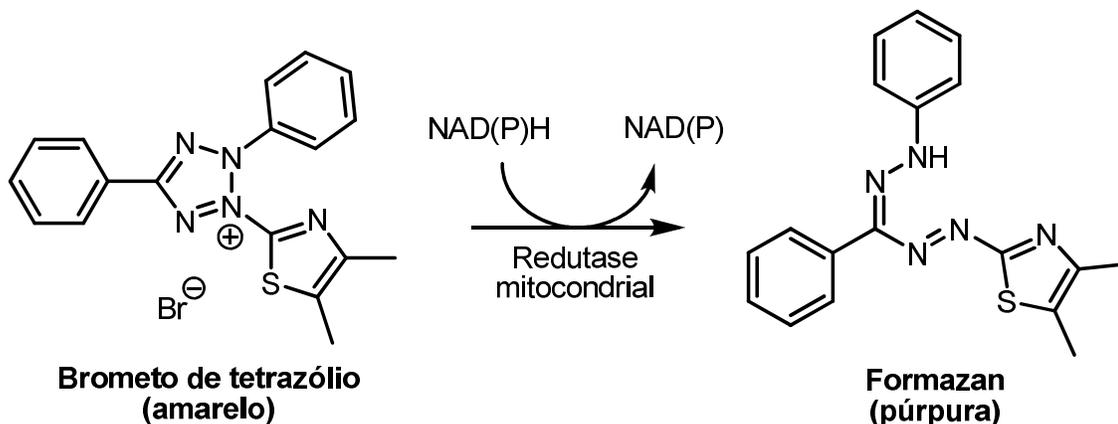
Ensaios biológicos foram realizados para as naftodihidrofuranoquinonas pelo grupo de pesquisa em farmacologia da Universidade Federal do Ceará, para avaliar a citotoxicidade e mecanismo de ação dos compostos ora estudados.

3.2.6 Teste de citotoxicidade *in vitro*

As naftodihidrofuranoquinonas, também foram objeto de avaliação para atividade antitumoral em diferentes linhagens de células MDA-MB435 (melanoma), HCT-8 (carcinoma de cólon), SF-295 (glioblastoma, sistema nervoso), HL-60 (leucemia) gentilmente cedidas pelo Instituto Nacional de Câncer (Bethesda, MD, USA). As células foram mantidas em meio RPMI 1649 suplementado com soro fetal bovino a 10%, glutamina 2 mmol L⁻¹, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 μg/mL a 37 °C with 5% CO₂. Estas células foram testadas pelo método do MTT *in vitro* na presença das quinonas. O ensaio do MTT consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H brometo de tetrazólium (MTT) de coloração amarela para formazan de coloração púrpura, pela

atividade da enzima succinildesidrogenase presente na mitocôndria de células viáveis (Figura13), permitindo desta forma quantificar a citotoxicidade dos compostos frente às linhagens de células levando ao valor de concentração média inibitória (CI_{50}). O controle usado foi a doxorubicina ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$), que é uma naftoquinona usada na terapia do câncer.

Figura13 - Reação de conversão do MTT em formazan.



Fonte: Autora, 2013.

3.2.7 Atividade hemolítica

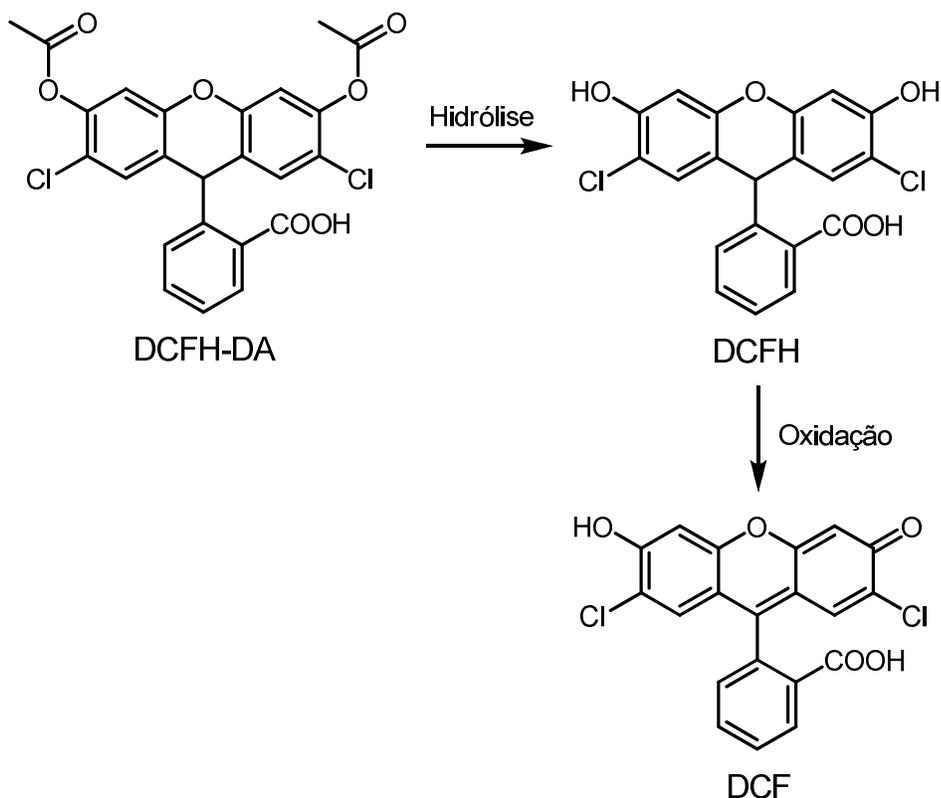
A ruptura da membrana foi realizada em placas de 96 poços, seguindo o método descrito por JIMENEZ et al. (2003). Resumidamente, cada poço recebe 100 μL de solução de NaCl 0,85% contendo 10 mmol L^{-1} de CaCl_2 e 100 μL de uma suspensão a 2% de eritrócitos de rato no mesmo meio. Os compostos foram testadas a concentrações que variam de 3,9-200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Triton X-100 (Isofar, Brasil), 0,1% (em NaCl a 0,85%) foi utilizado como um controle positivo. Após incubação durante 60 min à temperatura ambiente, a placa foi centrifugada, o sobrenadante foi removido e a hemoglobina liberada foi medida a 540 nm (DTX Detector 880 multimodo, Beckman Coulter, Inc. Fullerton, Califórnia, EUA).

3.2.8 Medida da geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

A acumulação intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO) foi monitorada utilizando diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína, que é convertido a diclorofluoresceína altamente fluorescente na presença de ERO intracelular, como representado na Figura 14 (LEBEL; ISCHIROPOULOS; BONDY, 1992). As células

HL-60, foram mantidas em $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína e incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos ao abrigo da luz. As quinonas foram adicionadas em concentração de $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ e incubadas por 1 h. As células foram então colhidas, lavadas, ressuspensas em tampão fosfato e analisadas imediatamente por citometria de fluxo com os comprimentos de onda de excitação e emissão de 490 e 530 nm, respectivamente.

Figura14 - Reação de conversão de DCFH-DA em DCF.



Fonte: Autora, 2013.

3.3 Preparação do complexo de inclusão de MGN: β -CD pelos métodos de mistura física e coevaporação

A mistura física de MGN+ β -CD, em uma razão equimolar (1:1), foi preparada utilizando um grau e pistilo de ágata, misturando-se até homogeneização. O complexo MGN: β -CD foi preparado em uma razão molar de 1:1 pelo método de coevaporação. Uma solução aquosa de MGN + β -CD foi preparada em 5% de etanol. A solução foi protegida da luz agitada a 170 rpm à temperatura ambiente

em uma incubadora Marconi MA-420 (São Paulo, Brasil) durante 24 h para atingir o equilíbrio da reação de complexação. Após a evaporação do etanol da mistura reacional, a MGN não complexada foi removida por filtração utilizando filtros de acetato de celulose 0,2 μm (Minisart, Sartorius Stedin). Então, a água foi evaporada sob pressão reduzida utilizando um rotaevaporador Büchi (Büchi, Alemanha). A amostra foi então seca sob vácuo para obtenção do complexo MGN: β -CD.

3.3.1 Caracterização físico-química do complexo de inclusão de MGN: β -CD por FT-IR

Os espectros FT-IR de MGN, β -CD e do complexo de inclusão foram registrados à temperatura ambiente em uma região espectral entre 4000 e 400 cm^{-1} utilizando o espectrômetro IR Prestige-21 com transformada de Fourier (Shimadzu Corp, Kyoto, Japão). As amostras foram preparadas como pequenas pastilhas, misturando cada uma delas em um almofariz com KBr (1:100).

3.3.2 Caracterização físico-química do complexo MGN: β -CD por calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As análises de DSC foram realizadas para MGN, β -CD e para o complexo MGN: β -CD utilizando um calorímetro DTG-60 (25-1100 $^{\circ}\text{C}$) (Shimadzu, Kyoto, Japão). A escala de temperatura foi calibrada usando α -alumina em pó. As amostras (5,0 a 10,0 mg) foram colocadas em cadinhos de alumínio e as medições foram realizadas a uma taxa de aquecimento de 5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ de 25 a 400 $^{\circ}\text{C}$ em uma atmosfera de nitrogênio (taxa de fluxo = 70 mL min^{-1}).

3.3.3 Caracterização físico-química do complexo MGN: β -CD por ^1H RMN

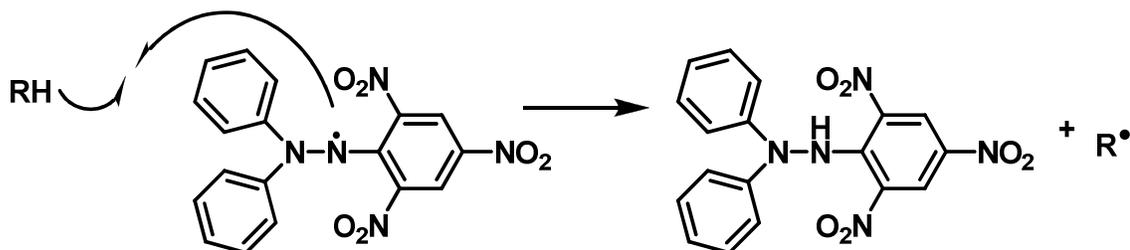
Para esta análise, amostras de MGN e β -CD foram dissolvidas isoladamente em D_2O . Para o complexo, uma solução foi preparada pela dissolução de ambas as substâncias na razão molar de 1:1 em D_2O . A solução permaneceu ao abrigo da luz e sob agitação por 48 horas. Após este período, os espectros ^1H RMN foram registrados à temperatura ambiente em um espectrômetro Bruker Avance 400 que opera na frequência de próton de 400 MHz.

3.4 Avaliação da atividade antioxidante de MGN livre e complexada com β -CD pelos ensaios DPPH, ORAC-FL e peroxidação lipídica

3.4.1 Método do DPPH

DPPH(2,2'-difenil-1-picrilidrazil) é um radical livre estável que reage com compostos que podem doar um átomo de hidrogênio. Este método é baseado na redução do radical DPPH por outro radical ou uma espécie antioxidante. A solução do radical DPPH, inicialmente na cor púrpura, passa a ter uma coloração amarelada após redução (Figura 15) (KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011).

Figura 15 - Reação de redução do radical DPPH.



Fonte: Autora, 2013.

O ensaio do DPPH foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Sánchez-Moreno; Lurrari e Saura-Calixto (1999). 0,30 mL de soluções de MGN, β -CD ou MGN: β -CD foi misturado com 2,7 mL de DPPH em uma cubeta de quartzo de 3 mL. Quando somente metanol foi usado no ensaio, a concentração do DPPH foi de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. Por outro lado, para o estudo do efeito do solvente a concentração do DPPH foi reduzida para $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ em virtude de sua baixa solubilidade em água (LI et al., 2009), sendo possível trabalhar em diferentes proporções de metanol:água ou etanol: água (20:80, 30:70, 50:50 ou 100:0). Os valores de absorção de DPPH foram obtidos em 516 nm a cada 5 minutos, durante 50 min por espectrofotômetro UV-vis (MultiSpec-1501, Shimadzu, Japão). Os resultados são expressos como remanescentes de DPPH (RSA-DPPH %) em função do tempo. Todas as determinações foram realizadas em triplicata. A porcentagem da atividade sequestradora de radicais (RSA-DPPH) de cada amostra foi calculada como abaixo:

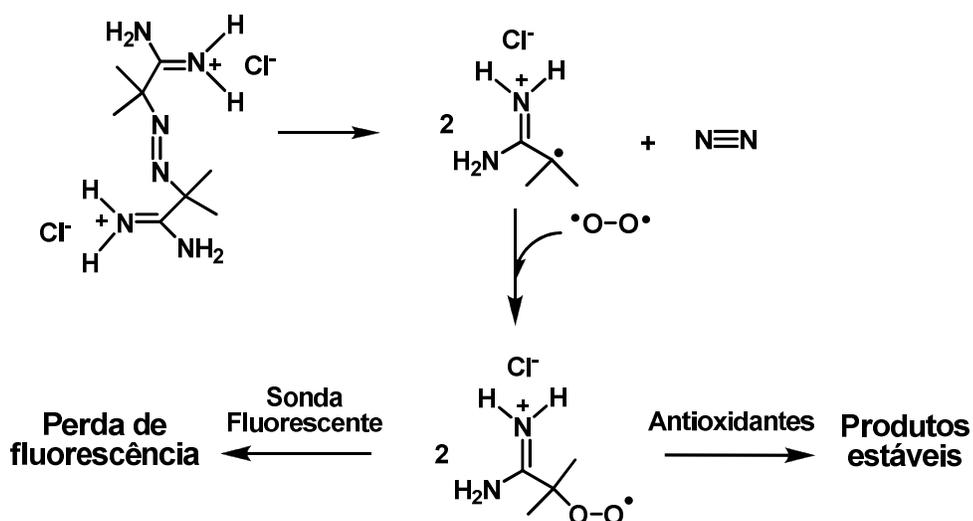
$$\%RSA = \left(1 - \frac{A_S}{A_D}\right) \times 100 \quad (10)$$

onde: A_S é a absorvência da solução quando a amostra foi adicionada em um nível particular; A_D é a absorvência da solução de DPPH.

3.4.2 Gerador de radicais AAPH

O AAPH é um composto azo extensivamente usado como gerador de radicais livres. À 37 °C, o AAPH sofre termólise, produzindo nitrogênio molecular e radicais alquila, que podem se combinar para formar produtos estáveis ou reagir com oxigênio molecular formando os radicais peroxil (ZULUETA; ESTEVE; FRÍGOLA, 2009). Abaixo está representado um diagrama da reação de termólise do AAPH durante os ensaios ORAC-FL e peroxidação lipídica que serão discutidos a seguir.

Figura16 - Reação do gerador de radicais AAPH durante os ensaios ORAC-FL e peroxidação lipídica.

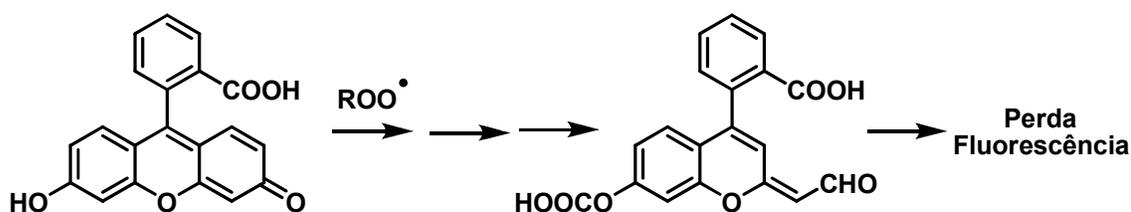


Fonte: Adaptado de ZULUETA; ESTEVE; FRÍGOLA, 2009.

3.4.3 Ensaio ORAC-FL(Oxygen Radical Absorbance Capacity-Fluorescein)

O ensaio ORAC-FL consiste na medida da diminuição na fluorescência da sonda fluoresceína (FL) quando esta é atacada por radicais peróxido, como representado na Figura17(ZULUETA; ESTEVE; FRÍGOLA, 2009;LUCAS-ABELLÁN et al., 2011).

Figura17 - Representação esquemática para a perda de fluorescência da sonda fluoresceína.



Fonte: Adaptado de OU; HAMPSCH-WOODILL E PRIOR (2001).

Para avaliar a atividade antioxidante pelo método ORAC-FL, as soluções aquosas de MGN (5% EtOH) e β -CD foram preparadas na concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. O complexo MGN: β -CD foi preparado na razão molar 1:1, sob agitação (40 rpm) por 24 h na ausência de luz.

A capacidade de absorção do radical oxigênio foi determinada conforme descrito por OU; HAMPSCH-WOODILL e PRIOR (2001), com ligeiras modificações. O ensaio ORAC automatizado foi realizado em uma leitora de microplacas Synergy HT (Bio-Tek Instruments, Inc. Winooski, EUA) com filtros de fluorescência para um comprimento de onda de excitação de 485/20 nm e um comprimento de onda de emissão de 528/20nm. O leitor de placas foi controlado por software Gen 5.

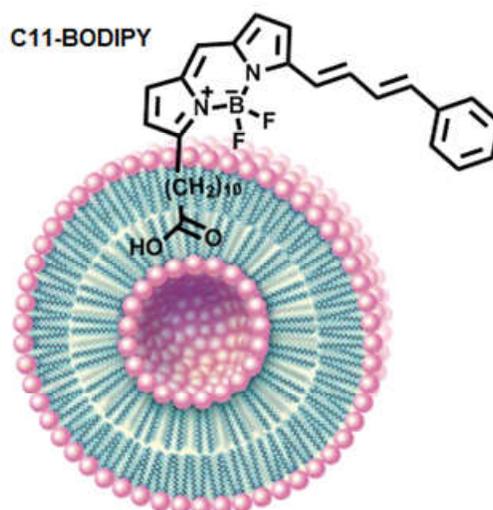
As medidas foram feitas utilizando uma microplaca de 96 poços de poliestireno branco (Nunc, Dinamarca). A reação foi realizada em tampão fosfato de sódio $75 \mu\text{mol L}^{-1}$ (pH 7,4) e o volume final da mistura foi de $200 \mu\text{L}$. A fluoresceína ($150 \mu\text{L}$; concentração final de 40 nmol L^{-1}) e MGN livre e complexada com β CD ($25 \mu\text{L}$) foram colocados nos poços da microplaca. A mistura foi pré-incubada por 15 min

a 37 °C, antes darápida adição da solução AAPH (25 µL, concentração final de 18 mmol L⁻¹) utilizando uma pipeta multicanal.A microplaca foi imediatamente colocado no leitor e automaticamente agitada antes de cada leitura.A fluorescência foi registrada a cada 1 min por 90 min.Um branco com FL e AAPH usando água e etanol, em vez da solução antioxidante e cinco soluções de calibração usando Trolox (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 µmol L⁻¹) como antioxidante também foram utilizados em cada ensaio.A capacidade de inibição foi expressa como equivalentes de Trolox (mol L⁻¹) e foi quantificada pela integração da área sob a curva de decaimento de fluorescência (AUC).AUC foi calculado integrando o decaimento da fluorescência no tempo zero e a fluorescência lida a qualquer momento.A AUC líquida correspondente à amostra foi calculada subtraindo-se a AUC correspondente ao branco.O valor ORAC foi calculado traçando a AUC líquida em função da concentração, como descrito por Folch-Caño et al. (2010).

3.4.4 Peroxidação lipídica

O método da peroxidação lipídica fundamenta-se no decaimento da fluorescência emitida por uma sonda ancorada a um lipossomo (Figura18)(KAROLIN et al.,1994)após o ataque de uma espécie reativa (MACDONALD; MURRAY; AXELSEN, 2007).

Figura18 - Sonda fluorescente C11-Bodipy ancorada a uma lipossoma.



Fonte: Adaptado de Enciclopædia Britannica (2007) e KAROLIN et al., 1994.

Neste método, é necessário o preparo prévio de vesículas unilamelares de fosfatidilcolina de soja. Uma solução de fosfatidilcolina de soja (1 mmol L^{-1}) em 10 mL de tampão fosfato (50 mmol L^{-1} , pH 7,4) foi passada 15 vezes por uma extrusora com membranas de 100 nm de diâmetro de poros conforme descrito por MACDONALD et al. (1991) com a incorporação adicional de $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ da sonda fluorescente C11-BODIPY^{581/591} (DRUMMEN et al., 2002). O tamanho de partícula foi confirmado por Nanotracer-Zetatracer, modelo NPA151-31A-0000-D30-10M. Após o preparo das vesículas, medidas de fluorescência foram realizadas a 37 °C usando um espectrofotômetro RF-5301PC (Shimadzu, Japão). Em uma cubeta de quartzo de 1,0 mL, quantidades adequadas de suspensão de vesícula unilamelar, de tampão fosfato pH 7,4, e da amostra ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$ MGN ou MGN- β CD) ou Trolox ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), com um controle positivo, foram misturados. A solução aquosa de β CD e o tampão foram utilizados como controle negativo. A reação foi iniciada com a adição de 100 μL de AAPH (100 mmol L^{-1}). O decaimento de fluorescência (excitação $\lambda = 580 \text{ nm}$, λ emissão = 600 nm) foi monitorado continuamente durante 30 min.

3.5 Interação de β -Lapachona e Mangiferina com β -CD avaliada por PM IRRAS

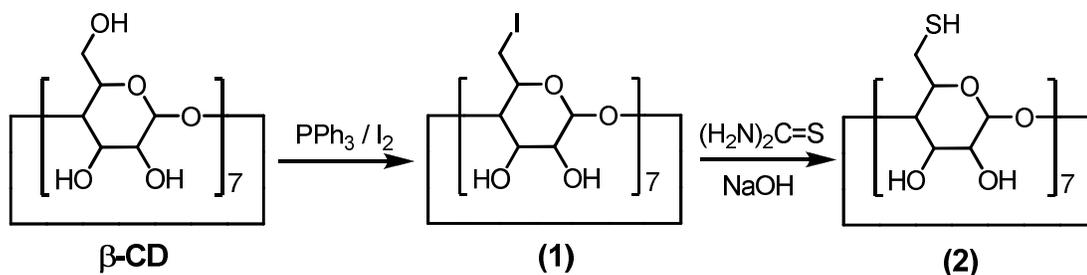
Para avaliar a interação de β -Lapachona e Mangiferina com β -CD por PM IRRAS, inicialmente foi realizada uma síntese para substituir as hidroxilas primárias da β -CD por grupos tióis de acordo com o procedimento descrito na literatura por Choi et al. (2005) e atualizado por Ferreira, 2007.

Inicialmente foi realizada a síntese do intermediário *per-7*-iodo- β -ciclodextrina, onde trifetilfosfina (PPh_3) foi dissolvida sob agitação em *N,N*-dimetilformamida (DMF) previamente seco sob atmosfera de nitrogênio (N_2); em seguida, iodo (I_2) foi adicionado cuidadosamente até levar a uma coloração castanho escura. Finalmente, β -CD, seca sob pressão reduzida a 100 °C, foi adicionada à esta solução marrom e o sistema mantido sob agitação, a 70 °C sob atmosfera de N_2 , por 18 horas. Ao final, a solução foi concentrada sob vácuo seguido por ajuste do pH 9-10 pela adição de metóxido de sódio $3,0 \text{ mol L}^{-1}$. A solução foi deixada em repouso por 30 minutos, para destruir o éster formado na reação e, em seguida, a mistura foi vertida sobre metanol (MeOH) e deixada em repouso por ~25 minutos para

precipitação. O precipitado formado foi filtrado e lavado com MeOH até não mais colorir a solução. O produto obtido (**1**–Figura19) foi seco sob vácuo à temperatura ambiente e caracterizado como iodo- β -ciclodextrina por RMN. Rendimento 43,6 %.

A iodo- β -ciclodextrina obtida na etapa anterior (**1**) foi dissolvida sob agitação em DMF seco; seguido por adição de tiouréia. A mistura foi aquecida a 70 °C, sob atmosfera de N₂. Decorridas 19 horas de agitação, o DMF foi removido sob pressão reduzida, sendo obtido um óleo amarelo, que foi dissolvido em água. Subsequentemente, uma solução aquosa de $5,71 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH foi adicionada e o sistema mantido sob refluxo e em atmosfera de N₂. Após 1 hora, a suspensão foi acidificada com solução aquosa de $3,23 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ de KHSO₄. O precipitado foi filtrado e abundantemente lavado com água, resultando em um pó fino de coloração acinzentado. O precipitado (**2**) foi seco sob vácuo e caracterizado como tio- β -ciclodextrina por RMN(Figura19). Rendimento 16,2 %.

Figura19 - Esquema sintético de tio-β-ciclodextrina.



Fonte: Adaptado de CHOlet al. (2005).

Para a análise PM IRRAS, a SAM de β -CD em substrato de ouro foi construída imergindo o substrato de Au em uma solução etanólica de β -CD-SH por 20 h. Após este período, o substrato foi lavado com etanol e água e submetido ao PM IRRAS para obtenção do espectro de infravermelho da SAM. Após este procedimento, a SAM foi imersa em uma solução de β -lapachona ou mangiferina por 2h e novamente lavado com etanol e água para remover espécies fisicamente adsorvidas (não encapsulados), deixando apenas a substância de interesse encapsulado na cavidade da β -CD ancorada na superfície do eletrodo.

Para o experimento de espectroeletroquímica (PM IRRAS + voltametria cíclica), a substância de interesse encapsulada na cavidade da β -CD ancorada na superfície do eletrodo, foi imersa em uma solução de eletrólito suporte (tampão fosfato pH 7,4 + 5% de etanol) e realizadas varreduras na faixa de -0,1 a -0,5 V.

Os experimentos de PM IRRAS foram realizados no Laboratório de Eletroquímica Molecular na Universidade de Buenos Aires, em um espectrômetro Thermo Nicolet 8700 (Nicolet, Madison, WI) equipado com uma mesa externa preparada para montagem óptica, um detector MCT-A (Nicolet), um modulador fotoelástico (PEM) (PM-90 com II/Zs50 ZnSe 50 kHz de cabeça óptica, Hinds Instrumento, Hillsboro, OR), e um demodulador de amostragem síncrono (SSD) (GWC Instruments, Madison, WI).

Os espectros no IV foram gravados com o conjunto de moduladores fotoelásticos (PEM) para uma retardação de meia-onda em 3000 cm^{-1} para a região de estiramento CH e 1500 cm^{-1} para as regiões de deformação CO, CH, C=O e aromáticos. O ângulo de incidência foi de 80° , o que dá o máximo de força do campo elétrico ao quadrado para a interface ar/ouro. A técnica de demodulação utilizada neste trabalho segue o procedimento desenvolvido por BARNER et al. (1991) e GREEN BARNER; CORN (1991). O sinal foi corrigido pela resposta PEM, usando o método descrito por FREY; CORN; WEIBEL (2001). 1500 varreduras foram realizadas e a resolução foi fixada em 4 cm^{-1} .

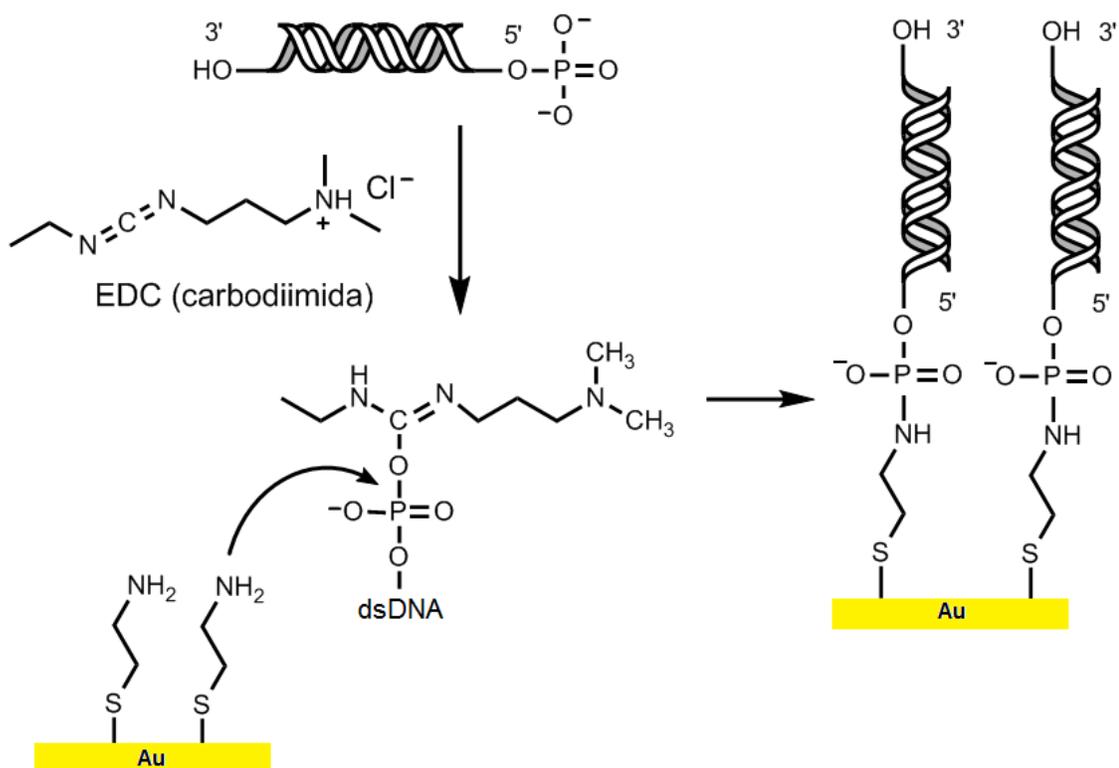
3.6 Interação de Timol e quinonas com DNA avaliado por Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo (EQCM).

No presente trabalho, um biossensor de DNA foi construído, utilizando o princípio de monocamada auto-organizada (SAM) sendo a metodologia adaptada de ZHAO et al. (1999). Cada etapa de desenvolvimento deste biossensor foi acompanhada por EQCM, onde inicialmente foi observada a frequência de oscilação de um cristal de quartzo ao ar. Em seguida, uma solução aquosa $0,01\text{ mol L}^{-1}$ de hidrocloreto de 2-aminoetanotiol (AET) foi colocada na cela da microbalança, e a solução foi cuidadosamente desaerada com N_2 e isolada. Como o 2-aminoetanotiol é uma molécula com pequena cadeia alquílica, o tempo de 6h foi considerado ótimo para o acompanhamento da formação desta monocamada por EQCM. Ao fim deste tempo, a solução de AET foi retirada da cela, e esta última foi então cuidadosamente lavada com água deionizada, sendo obtida a SAM de AET (Figura 20).

A SAM de AET foi então ativada com hidrocloreto de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etil-carbodiimida (EDC) ($1,0\text{ mg mL}^{-1}$) em uma solução de dsDNA ($1,0\text{ mg mL}^{-1}$) em tampão acetato pH 5,6. Esta solução permaneceu na cela da EQCM por 1h sendo aplicado um potencial de 0,0 V, desta forma, obteve-se a SAM de AET/dsDNA, que foi então posta em contato com a solução do analito na concentração de $5,0 \times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$ em tampão Tris-HCl e NaCl ambos a $5,0\text{ mmol L}^{-1}$). A interação da substância de interesse biológico com o DNA foi monitorada através da variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo por 2h. Todos os experimentos foram realizados em temperatura de $25 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$.

O hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) é usado para mediar a formação de ligação amida entre carboxilatos e aminas ou ligações fosforamidas entre fosfatos e aminas (HERMANSON et al., 1996). Neste estudo, foi usado para promover a condensação entre o grupo 5'-fosfato terminal ou 3'-hidroxiterminal do DNA e o grupo amino-terminal da SAM, resultando na imobilização de DNA na superfície do cristal como está representado na Figura20.

Figura20 - Esquema da imobilização covalente de dsDNA em SAM de AET.



Fonte: Adaptado de ZHAO et al., 1999 e HERMANSON et al., 1996.

3.7 Avaliação da interação de Timol com DNA por Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) e Microscopia Eletroquímica de Varredura (SECM).

3.7.1 Preparo do gel de dsDNA

O gel de dsDNA foi preparado após solubilização de 12,0 mg de dsDNA em 1,0 mL de tampão acetato pH 4,5, e submetidos à refrigeração por 24 h, para completa formação do gel de DNA. Após completa formação do gel, 8,0 a 10 μ L do mesmo foram colocados sobre o eletrodo de carbono vítreo cuidadosamente polido com alumina e condicionado eletroquimicamente para assegurar a imobilização do

dsDNA. Este condicionamento foi realizado por meio da técnica de Voltametria de Pulso Diferencial (VPD), varrendo-se uma faixa de potencial ($E_a = 0$ a $+1,4$ V) em velocidade de $5,0 \text{ mV s}^{-1}$ em um mínimo de três ciclos até completa estabilização da superfície eletródica (organização da dupla camada elétrica). Uma vez executado esse procedimento, o eletrodo se encontra polarizado positivamente, permitindo assim interações eletrostáticas entre este e os grupos fosfato do dsDNA. O gel sobre o eletrodo foi seco com um leve fluxo de nitrogênio para formar um filme e disposto para os estudos de VPD e SECM.

O eletrodo com filme de dsDNA foi imerso em uma solução de tampão acetato pH 4,5 e varrido na faixa de potencial de 0 a $+1,4$ V. Simultaneamente, um outro eletrodo com filme de dsDNA foi imerso em uma solução contendo timol ($c = 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), ou timol: β -CD ou ainda β -ciclodextrina onde permaneceu por 1h e depois foi exposto para análise voltamétrica.

3.7.2 Preparo da solução de ssDNA pelo método ácido-base

OdsDNA(3,0 mg) foi desnaturado pela adição de 1,0 mL de ácido clorídrico ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) e aquecimento durante 1 h a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ em banho-maria até solubilização. Em seguida, para neutralização do meio, foi adicionado 1,0 mL de solução de NaOH ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$), completando-se o volume para 10,0 mL com tampão acetato (pH 4,5), para finalização do procedimento. Este preparo também foi executado excluindo a etapa da temperatura.

3.7.3 Preparo da solução de ssDNA por tratamento térmico

Inicialmente, para o preparo de ssDNA por tratamento térmico, $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de dsDNA foi solubilizado em tampão acetato pH 4,5, agitado por 5 min e submetido à refrigeração por 24 h (este procedimento auxilia na solubilização do DNA). Após este período, esta solução foi aquecida em banho-maria durante 30 ou 60 minutos a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ e em seguida, imersa em um banho de gelo por 2 min a $-2 \text{ }^\circ\text{C}$ para interromper a desnaturação.

3.7.4 Eletroforese

Para avaliar o melhor método para produção de ssDNA a ser usado nos estudos eletroquímicos, foi utilizado a técnica de eletroforese. Nestes experimentos, foi utilizado gel de agarose a 1%. Para cada tratamento, 20µL das amostras de DNA foram acrescentadas ao gel e a eletroforese foi realizada a 70 V por 40 min. As corridas eletroforéticas foram realizadas usando o equipamento Electrophoresis Power Supply – EPS 601. Após a corrida, as amostras foram coradas com brometo de etídio ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), e fotografadas sob luz UV usando um sistema digital da Kodak (Gel Logic 200, Molecular Imaging System CARESTREAM HEALTH, INC). Vários tratamentos (seções 3.7.2 e 3.7.3) foram usados e os resultados foram analisados através da comparação com dsDNA disponível comercialmente (sal de sódio; tipo I) e ssDNA, ambos de timo de bezerro e adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA).

3.7.5 Estudo da interação de timol com ssDNA

Em princípio, fez-se varredura anódica de potencial (0 a +1,4 V) em VPD a 10 mV s^{-1} da solução de ssDNA para conhecer o perfil voltamétrico da solução de ssDNA. Após obter as correntes máximas relativas à oxidação de guanina e adenina, observou-se o efeito da adição das substâncias avaliadas nas correntes de pico das bases. Foi adicionada uma alíquota de timol a partir de uma solução estoque em etanol ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), de tal modo que a concentração do mesmo na cela eletroquímica foi de $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Também foi avaliada a interação de ssDNA com timol, timol:β-CD e β-CD.

3.8 Experimentos SECM

As medidas de microscopia eletroquímica de varredura foram realizadas em uma estação de trabalho CHI 900, modelo 900B (CH Instrument Inc., E.U.A.) no laboratório de bioeletroquímica, localizado na Universidade do Chile, com orientação da Profa Dra Claudia Yañez. A solução do mediador redox foi preparada pela dissolução de ferrocenometanol (FcCH_2OH) em tampão fosfato pH 7,4 ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$). Para as medições de SECM, um eletrodo de 10 µm de diâmetro feito de fibra de carbono serviu como ponta para SECM enquanto eletrodos de carbono vítreo, de

3mm de diâmetro (BAS) foram utilizados como substrato SECM. Um fio de platina e Ag|AgCl|Cl⁻ (sat.) (RE-5B, BAS) foram utilizados como contra eletrodo e eletrodo de referência, respectivamente. Todos os potenciais são referidos ao eletrodo de referência.

Parte do filme de dsDNA (não mais que 1/3 da superfície) foi removido do eletrodo de carbono vítreo modificado. Em seguida, uma curva de abordagem foi realizada na superfície do carbono vítreo exposta, a uma velocidade de varredura do tipo de 0,5 µm/s. O movimento do UME foi interrompido quando i_T atingiu 1,25 vezes o valor da $i_{T,\infty}$. De acordo com a curva teórica que descreve a dependência de i_T com a distância entre a ponta do UME e o substrato (d), 1,25 vezes de $i_{T,\infty}$ corresponde ao $d \approx 10$ mm, quando a ponta de um UME de raio de 5µm de diâmetro é utilizado (BARD; MIRKIN, 2001).

Após a curva de abordagem, o UME foi movido na direção x para se certificar de que está sobre o filme e uma série de imagens SECM de 100µm de altura x 100 µm área foram gravadas em uma velocidade de varredura de 1µm/s. Os resultados são apresentados sob a forma adimensional da i_T , normalizando a corrente de retroalimentação experimental (i_T) pelo estado atual de equilíbrio obtido quando a ponta do UME estava longe do substrato ($i_{T,\infty}$), ou seja, ($I_T = i_T / i_{T,\infty}$).

Após o procedimento da curva de abordagem o biossensor de DNA foi imerso em uma solução contendo timol na concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e permaneceu nesta solução por 30 minutos, após este período, imagens de SECM foram obtidas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Quinonas

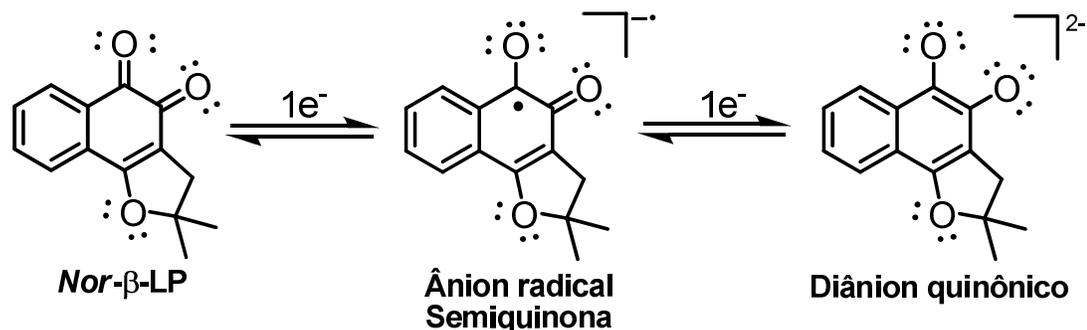
4.1.1 Estudo em meio aprótico de *nor*- α -lapachona, *nor*- β -lapachona e seus derivados por voltametria cíclica

Dentre os vários métodos eletroquímicos, a voltametria cíclica tem se mostrado uma técnica experimentalmente simples e precisa para aquisição quantitativa de dados cinéticos e termodinâmicos que auxiliam na elucidação do mecanismo de ação de fármacos ou até mesmo pode colaborar no planejamento de compostos biologicamente ativos. É uma das principais técnicas utilizadas no estudo eletroquímico de uma infinidade de compostos, inclusive quinonas, tanto em meio aprótico, quanto em meio prótico (WANG et al., 2010; JIMÉNEZ-ALONSO, et al., 2011; MA et al., 2011; DE SOUZA, 2011).

Por meio de parâmetros eletroquímicos definidos em literatura específica, pode-se analisar o processo eletródico ocorrido. Os parâmetros eletroquímicos normalmente obtidos e empregados são os potenciais de oxidação (E_{pa}) e redução (E_{pc}), $(E_{pc} + E_{pa})/2$ (para sistemas reversíveis) ou $E_{pc} - E_{pc/2}$ (para os processos irreversíveis), a magnitude da função corrente ($I_p/v^{1/2} \times C$) e a razão entre as correntes de pico catódico e anódico I_{pa}/I_{pc} (SOUTHAMPTON ELECTROCHEMISTRY GROUP; DE MOURA, 2008; DE SOUZA, 2011)

Em meio aprótico, quinonas podem sofrer dois processos de redução de um elétron cada. O primeiro processo está relacionado ao par redox quinona (Q) / ânion radical semiquinona ($Q^{\bullet-}$), enquanto que o segundo processo está relacionado ao par redox ânion radical semiquinona ($Q^{\bullet-}$) / diânion quinônico (Q^{2-}), como representado na Figura 21 para *nor*- β -Lapachona (WANG et al., 2010; MA et al., 2011).

Figura21 - Racionalização mecanística do processo de redução em duas etapas para nor-β-Lapachona.



Fonte: Autora, 2013.

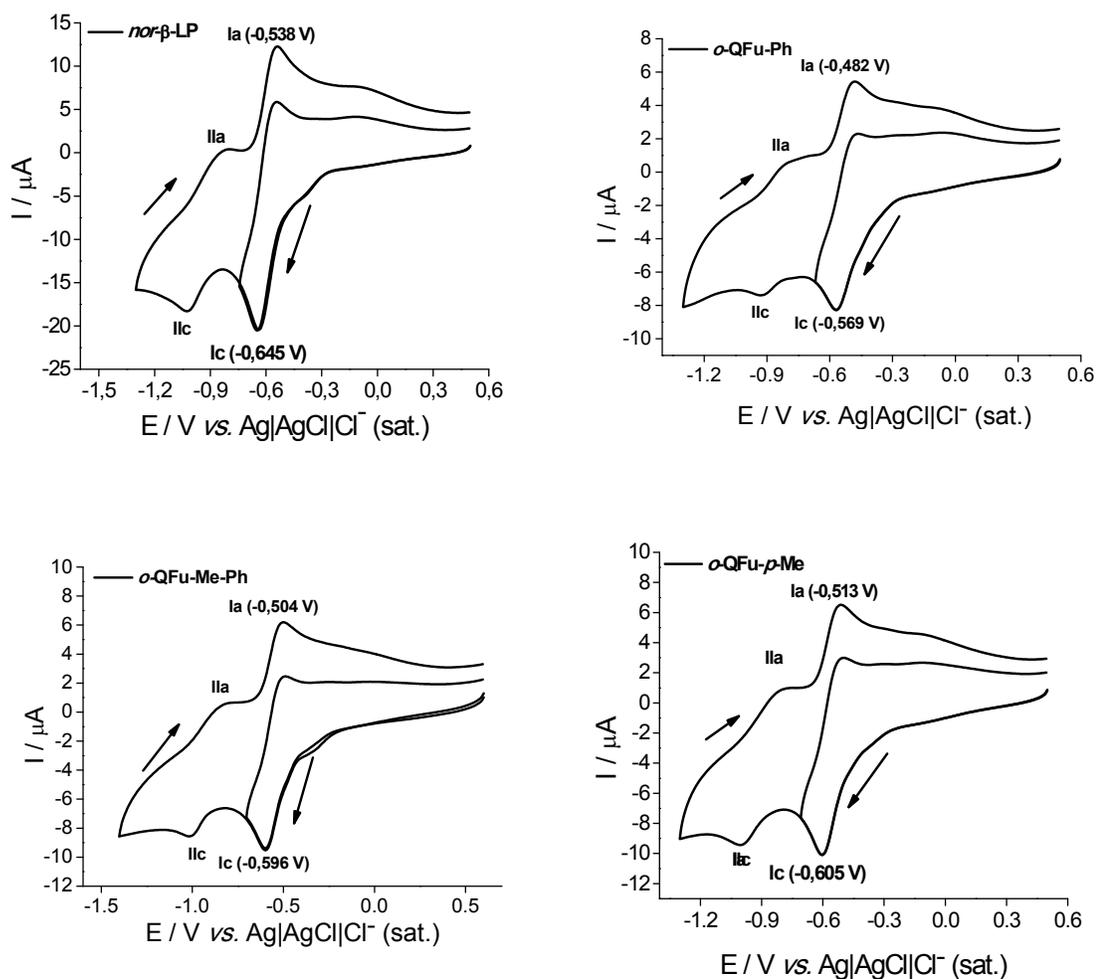
Os voltamogramas cíclicos para a *nor*-β-lapachona e seus derivados em meio aprótico estão representados na Figura22. Todos os compostos mostraram dois pares de pico redox, os quais correspondem a dois processos de transferência de um elétron cada, gerando as espécies mono- e dianiônicas, respectivamente. O primeiro processo de redução (Ic) mostrou característica de quase-reversibilidade, onde a primeira onda catódica é acompanhada da correspondente onda de oxidação, de intensidade de corrente correspondente à onda de redução. A diferença entre os potenciais de pico catódico e anódico para as quinonas foi de 87-122 mV para a velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , sendo o radical semiquinônico suscetível a reações químicas posteriores a sua formação.

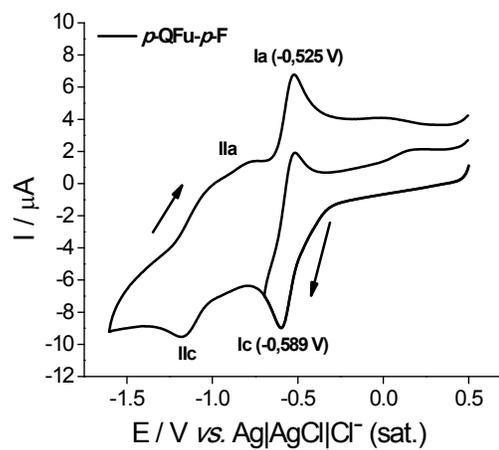
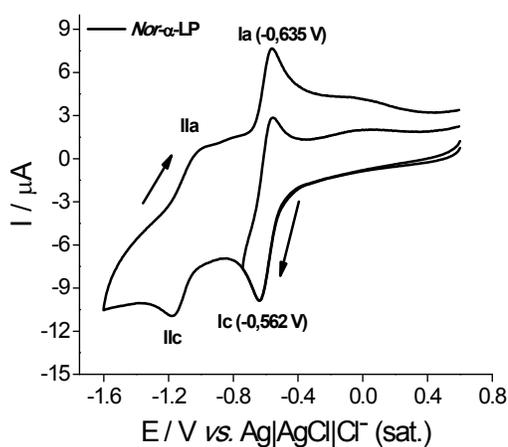
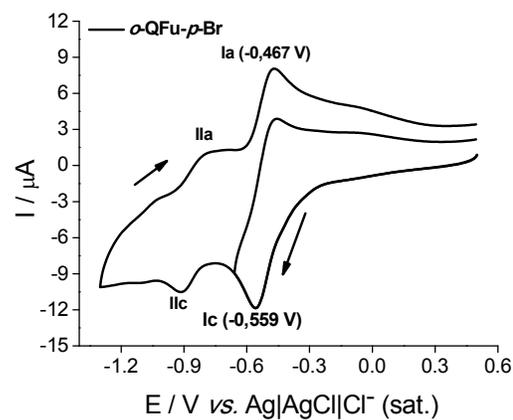
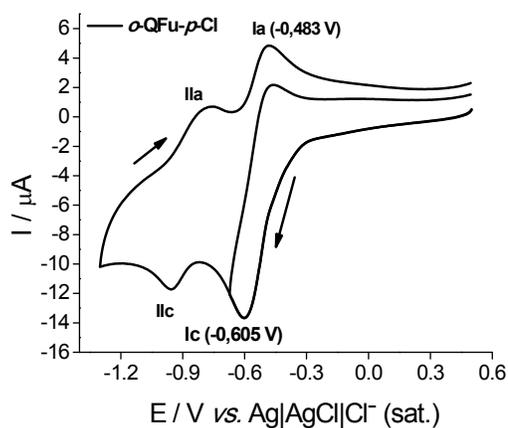
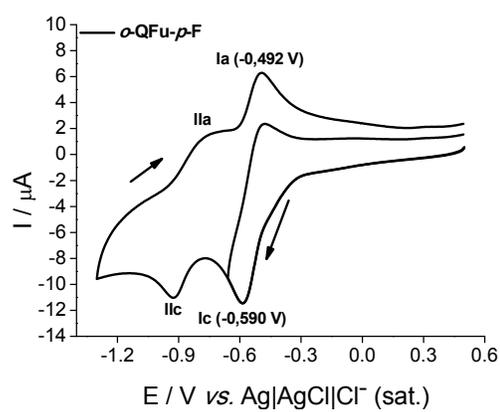
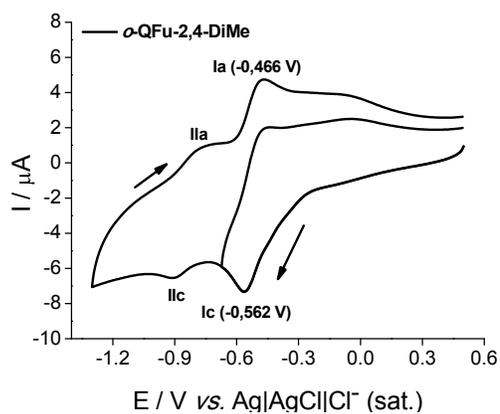
O segundo processo de redução (IIc), relacionado à formação do diânion quinônico apresentou menor característica de reversibilidade, sendo observado um sinal anódico correspondente (IIa), de baixa intensidade de corrente (Figura22). Observa-se também que a intensidade de corrente da onda IIc para as *orto*-quinonas, é metade da corrente observada em Ic. A menor reversibilidade do intermediário diânion quinônico, assim como sua menor corrente de pico decorre de sua maior basicidade, sendo, portanto mais reativo que a semiquinona, o que o torna mais suscetível a reações químicas acopladas a sua eletrogeração, como protonação, dimerização ou desproporcionamento.

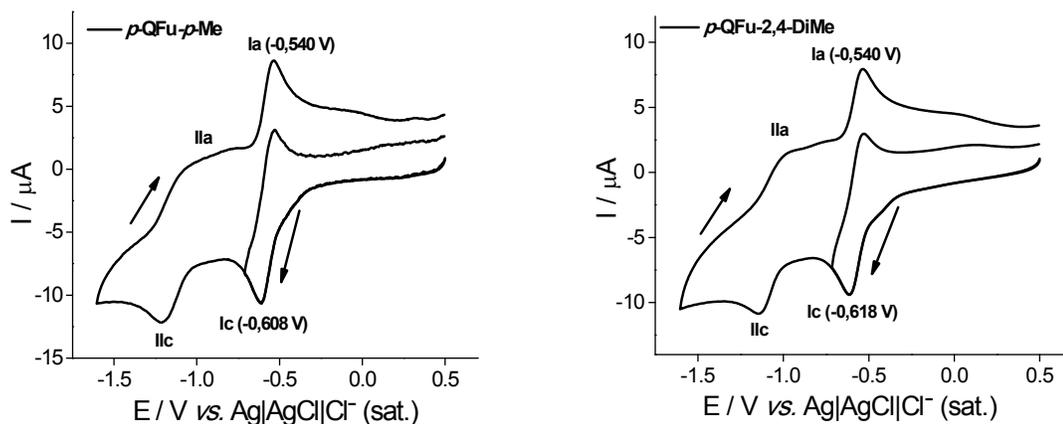
As *para*-quinonas por sua vez (Figura 22) também apresentam dois pares de picos redox bem definidos, no entanto neste caso, a segunda transferência eletrônica ocorre com maior dificuldade termodinâmica que a primeira. O segundo

processo de redução ocorre a aproximadamente 200 mV após a redução para seus isômeros *orto*-, desta forma, reações de comproporcionamento são favorecidas, o que nos leva a observar que a corrente de pico do segundo processo de redução é maior do que o apresentado para as *orto*-quinonas similares (Figura 22).

Figura 22 - Voltamogramas cíclicos para *nor*- β -LP, *nor*- α -LP ($c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$) e seus respectivos derivados ($c = 0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) em DMF/TBAP ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.



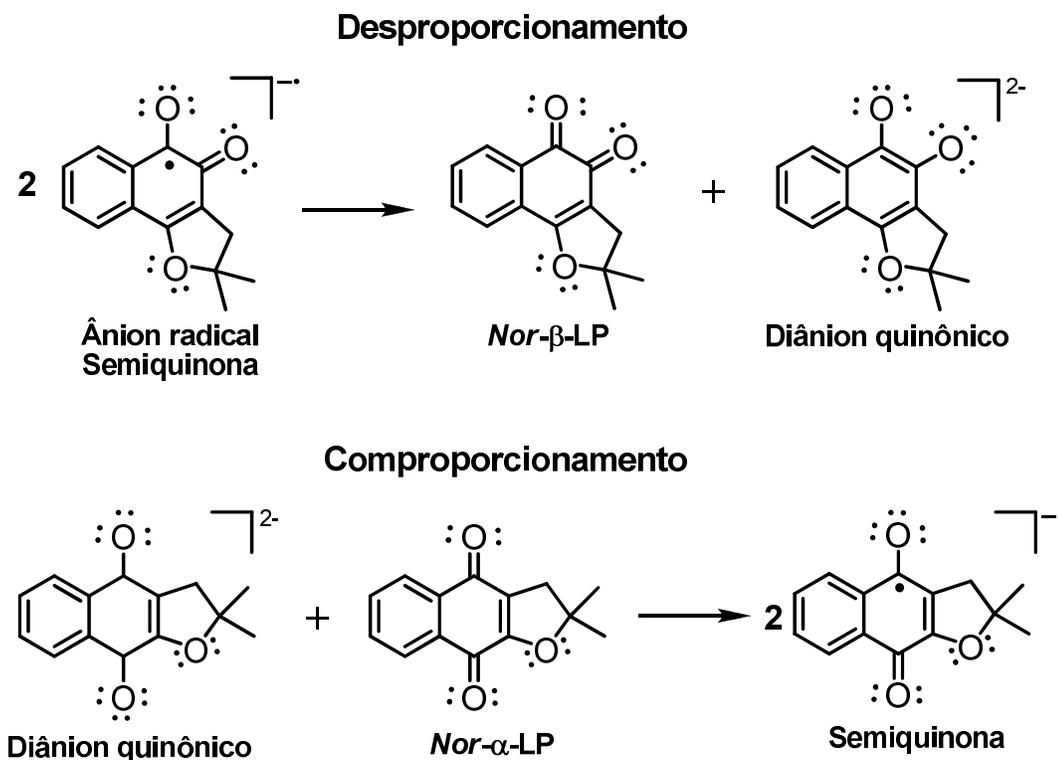




Fonte: Autora, 2013.

O mecanismo eletroquímico mais provável para a *nor*-β-lapachona e seus derivados, e já descrito por De Souza (2011), seria de desproporcionamento (Figura 23), onde o ânion radical semiquinona ($Q^{\bullet-}$), desproporciona, levando à formação da quinona de partida (Q) e do diânion quinônico (Q^{2-}) eletroinativo na redução (Figura 23). Em reações de comproporcionamento como é o caso de *nor*-α-lapachona e seus derivados, o diânion eletrogerado (Q^{2-}) reage com a quinona de partida (Q) para formar duas moléculas do intermediário ânion radical semiquinona ($Q^{\bullet-}$) (Figura 23).

Figura23 - Racionalização mecanística para o processo de desproporcionamento do ânion radical semiquinona para nor- β -LP e comproporcionamento do diânion quinônico para a nor- α -LP.

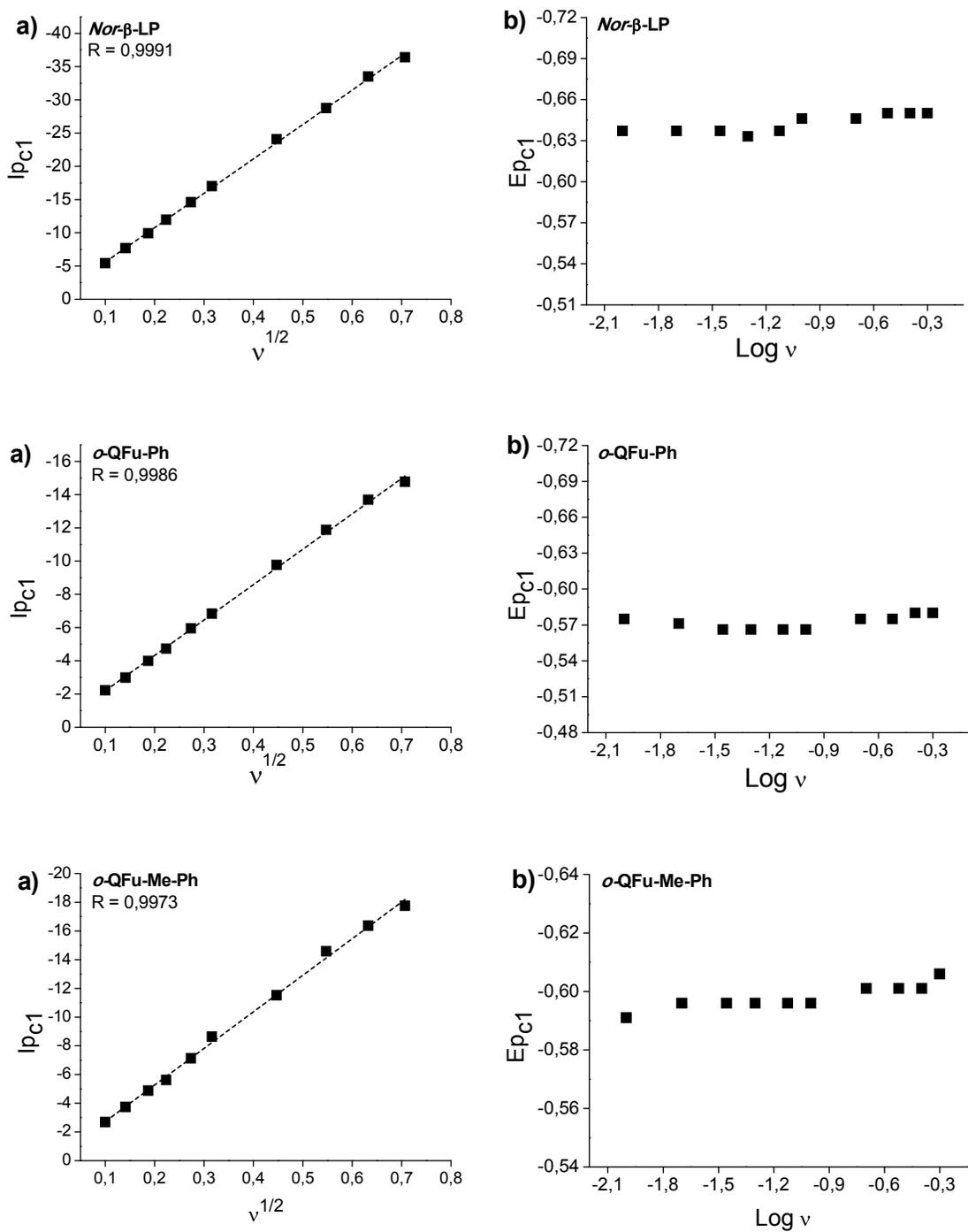


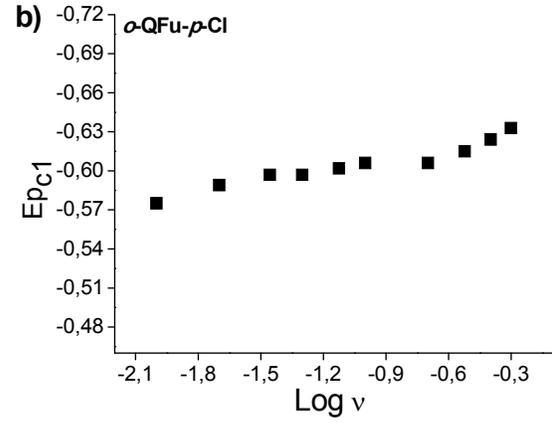
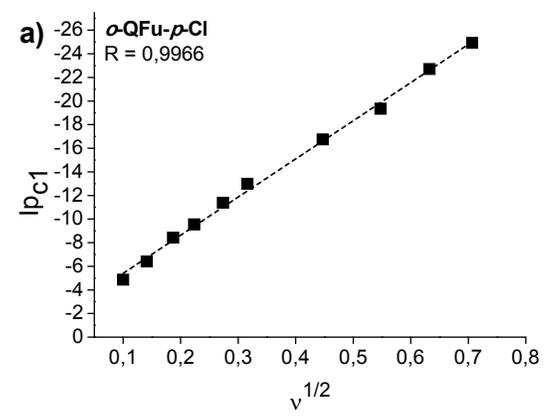
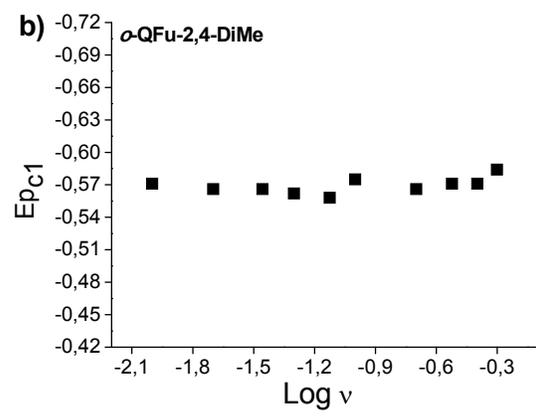
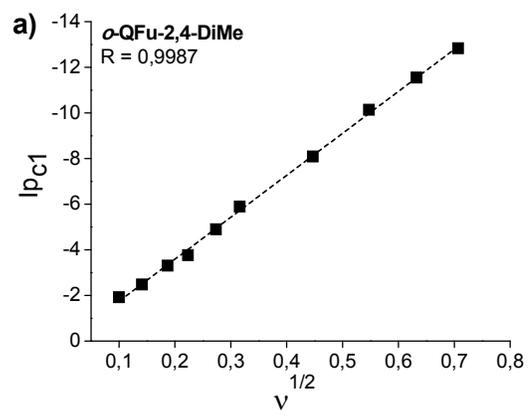
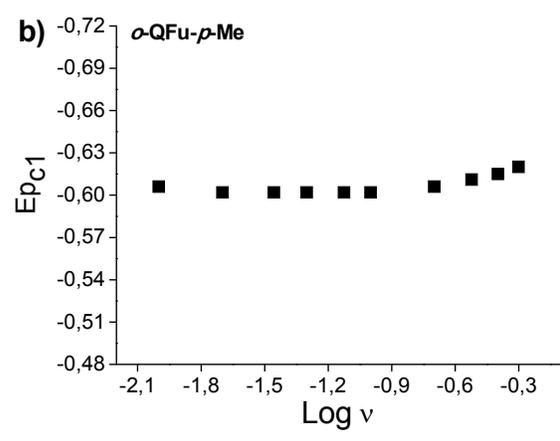
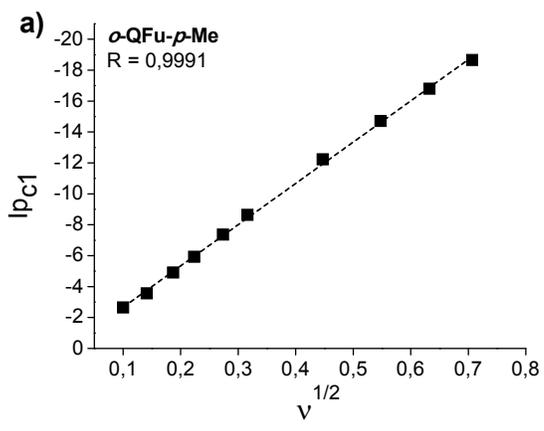
Fonte: Autora, 2013.

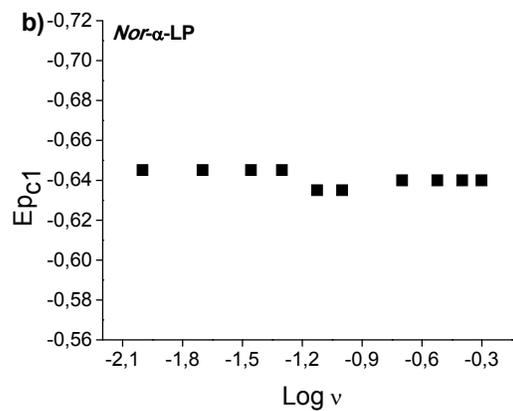
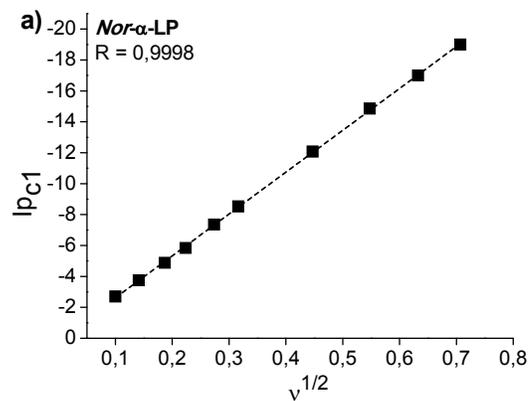
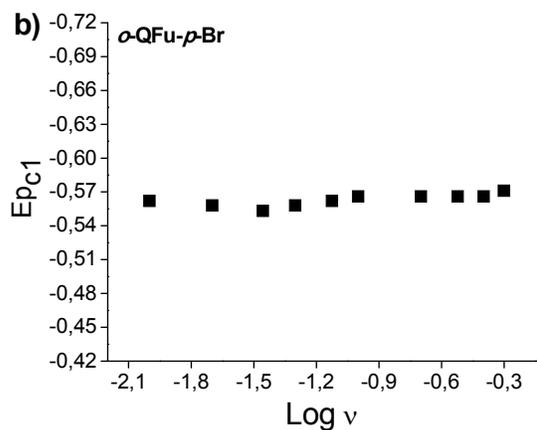
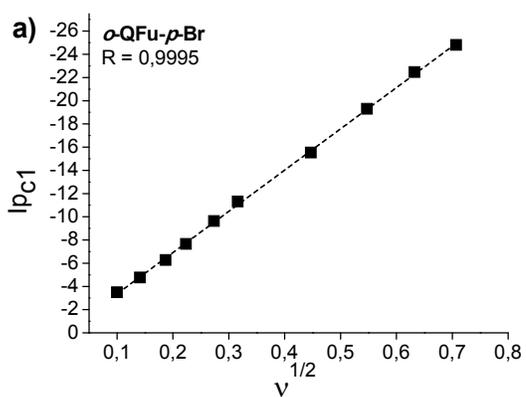
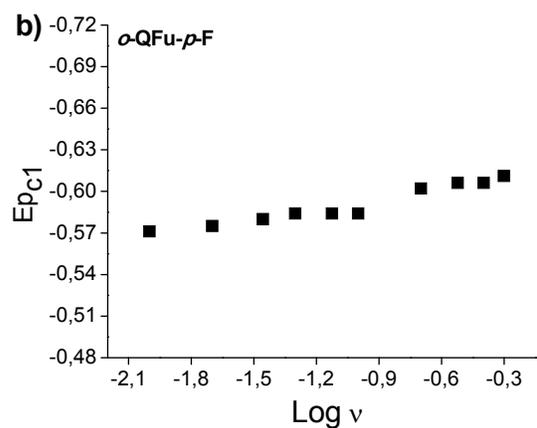
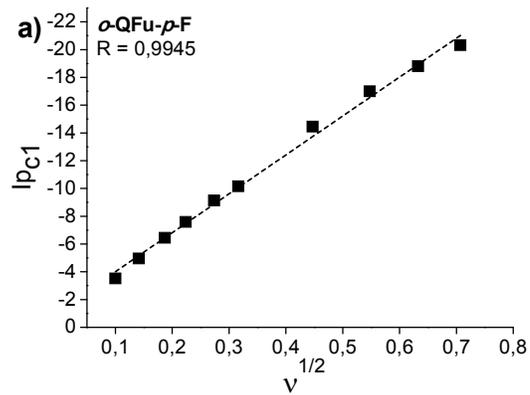
Os valores de intensidade de corrente obtidos a partir do estudo voltamétrico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura (I_{p1c} vs. $v^{1/2}$) para a primeira onda de redução, demonstraram que o transporte de massa através da solução até a superfície eletródica, é de natureza difusional. A análise do potencial de redução de primeira onda em função do log da velocidade de varredura (E_{p1c} vs. $\log v$), juntamente com a presença do pico reverso indica que a primeira etapa de redução é de natureza quase-reversível, conforme testes diagnósticos definidos em literatura específica (SOUTHAMPTON ELECTROCHEMISTRY GROUP; DE SOUZA, 2011).

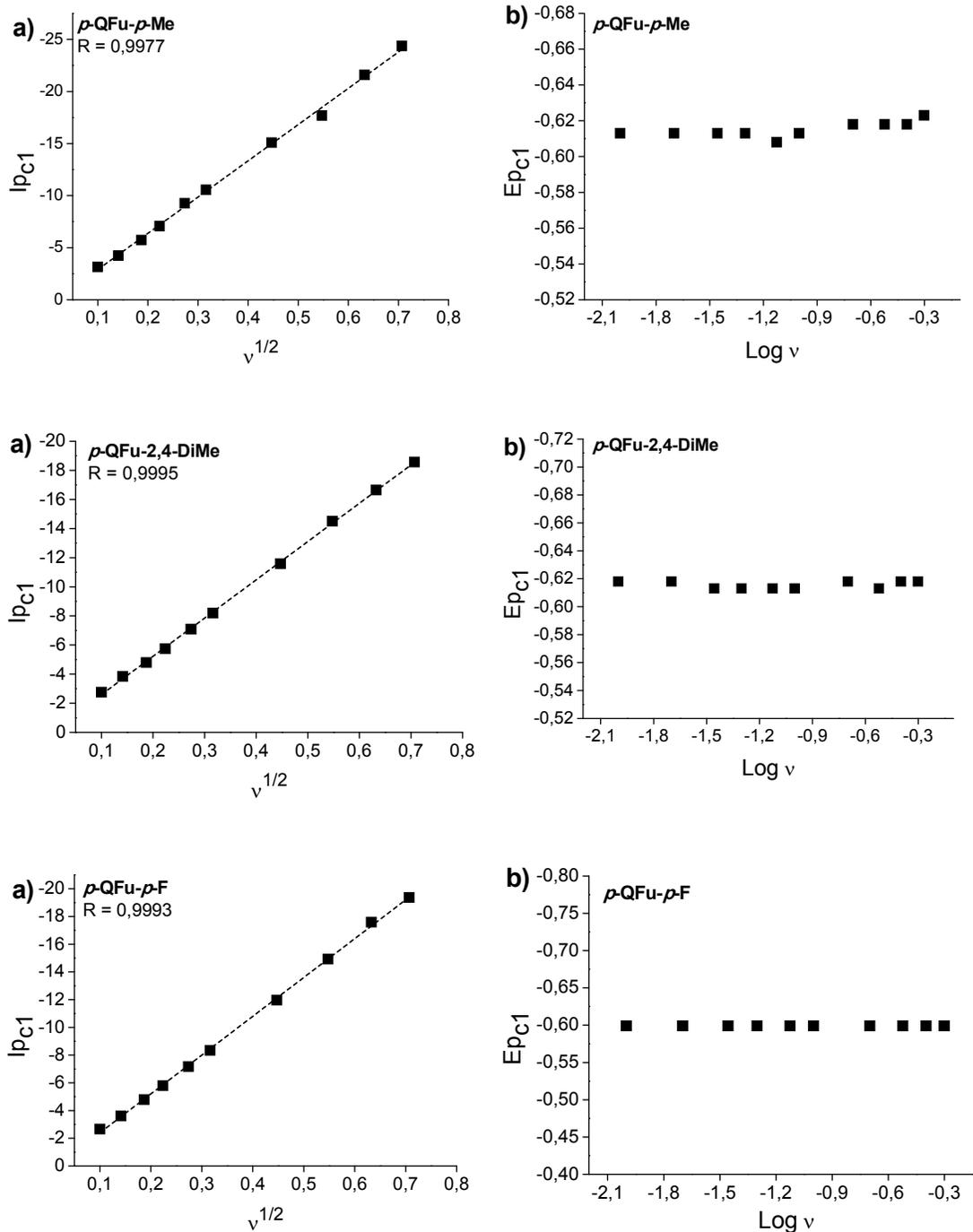
Em seguida encontram-se os gráficos de intensidade de corrente em função da raiz quadrada da velocidade de varredura (I_{p1c} vs. $v^{1/2}$) e da análise do potencial de redução de primeira onda em função do log da velocidade de varredura (E_{p1c} vs. $\log v$), para cada quinona estudada (Figura24).

Figura24 - a) Análise da corrente de pico (i_{pc1}), para a primeira onda de redução para *nor*- β -lapachona, *nor*- α -lapachona e seus respectivos derivados em função de $v^{1/2}$. b) Gráfico de potencial de pico de primeira onda de redução em função do $\log v$ (DMF/TBAP 0,1 mol L⁻¹) para as diferentes quinonas.









Fonte: Autora, 2013.

O potencial redox e consequentemente a reatividade de quinonas, estão relacionados à sua estrutura química e os grupos substituintes tem grande influência em suas propriedades redox comparado às quinonas de origem. Em geral, grupos

eletrodoadores aumentam a densidade eletrônica e deslocam o potencial de pico catódico para potenciais mais negativos. Em contrapartida, substituintes eletroatraentes diminuem a densidade eletrônica no sistema quinônico, resultando em um deslocamento no potencial de pico para valores mais positivos (SARAPUU et al., 2010). Este último comportamento foi observado para as quinonas derivadas de *nor*- β -lapachona e *nor*- α -lapachona, cujos parâmetros eletroquímicos mais relevantes estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros eletroquímicos para *nor*- β -lapachona, *nor*- α -lapachona e seus derivados. Eletrodo de Carbono Vítreo, E vs. Ag|AgCl|Cl⁻ (sat.), $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

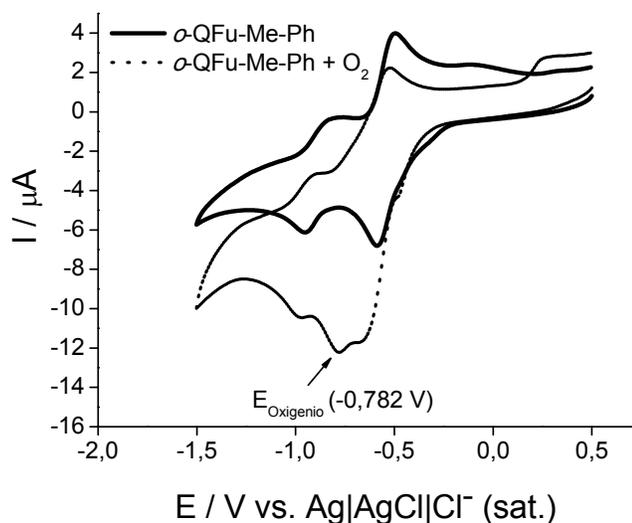
Composto	$-E_{\text{plc}}$ (V)	$-E_{\text{pla}}$ (V)	ΔE_1 (mV)	$-E_{\text{pllc}}$ (V)	$-E_{\text{plla}}$ (V)	ΔE_2 (mV)
<i>Nor</i> - β -LP	0,633	0,540	93	1,018	0,811	207
<i>o</i> -QFu-Ph	0,569	0,482	87	0,936	0,778	158
<i>o</i> -QFu- <i>p</i> -Me	0,605	0,513	92	1,004	0,796	208
<i>o</i> -QFu-Me-Ph	0,596	0,504	92	1,016	0,826	190
<i>o</i> -QFu-2,4-DiMe	0,562	0,466	96	0,907	0,736	171
<i>o</i> -QFu- <i>p</i> -Cl	0,605	0,483	122	0,955	0,769	186
<i>o</i> -QFu- <i>p</i> -F	0,590	0,492	98	0,929	0,764	165
<i>o</i> -QFu- <i>p</i> -Br	0,559	0,467	92	0,913	0,781	132
<i>Nor</i> - α -LP	0,635	0,562	73	1,177	1,002	175
<i>p</i> -QFu- <i>p</i> -Me	0,608	0,540	68	1,204	1,018	186
<i>p</i> -QFu-2,4-DiMe	0,618	0,540	78	1,141	0,974	167
<i>p</i> -QFu- <i>p</i> -F	0,589	0,525	64	1,179	0,979	200

Fonte: Autora, 2013.

Os valores obtidos para as diferenças entre os potenciais de pico anódico e catódico, potencial de pico catódico e potencial a meia altura de onda, dos pares redox I_c/I_a e II_c/II_a para as quinonas excederam o valor teórico para uma transferência de um elétron reversível, sugerindo a presença de reação química acoplada ao processo eletroquímico, como dimerização, protonação ou desproporcionamento no caso das *orto*-quinonas e comproporcionamento em relação às *para*-quinonas.

As quinonas *nor*- β -lapachona, *nor*- α -lapachona, bem como seus derivados arilados foram ainda avaliadas quanto à sua reatividade frente ao oxigênio. Este estudo foi investigado por voltametria cíclica em solvente não aquoso, meio aprótico, devido à estabilidade dos ânions radicais gerados no processo de redução de quinonas, constituindo assim, o melhor modelo para o estudo do ambiente da membrana celular, onde ocorre o processo de peroxidação lipídica (SONG; BUETNNER, 2010; SAWYER; VALENTINE, 1981; VASUDEVAN; WENDT, 1995). Na Figura 25, está representado o perfil eletroquímico para as duas ondas de redução da quinona *o*-QFu-Me-Ph na ausência e presença de oxigênio. O potencial de pico catódico do oxigênio é -0,811 V em DMF/TBAP, no entanto, quando na presença da quinona, este potencial é deslocado para valores menos negativos ($E = -0,782$ V), como pode ser observado na Figura 25.

Figura25 - Voltamogramas Cíclicos para *o*-QFu-Me-Ph (0,5 mmol L⁻¹) na ausência e presença de oxigênio, em DMF/TBAP (0,1 mol L⁻¹), eletrodo de carbono vítreo.



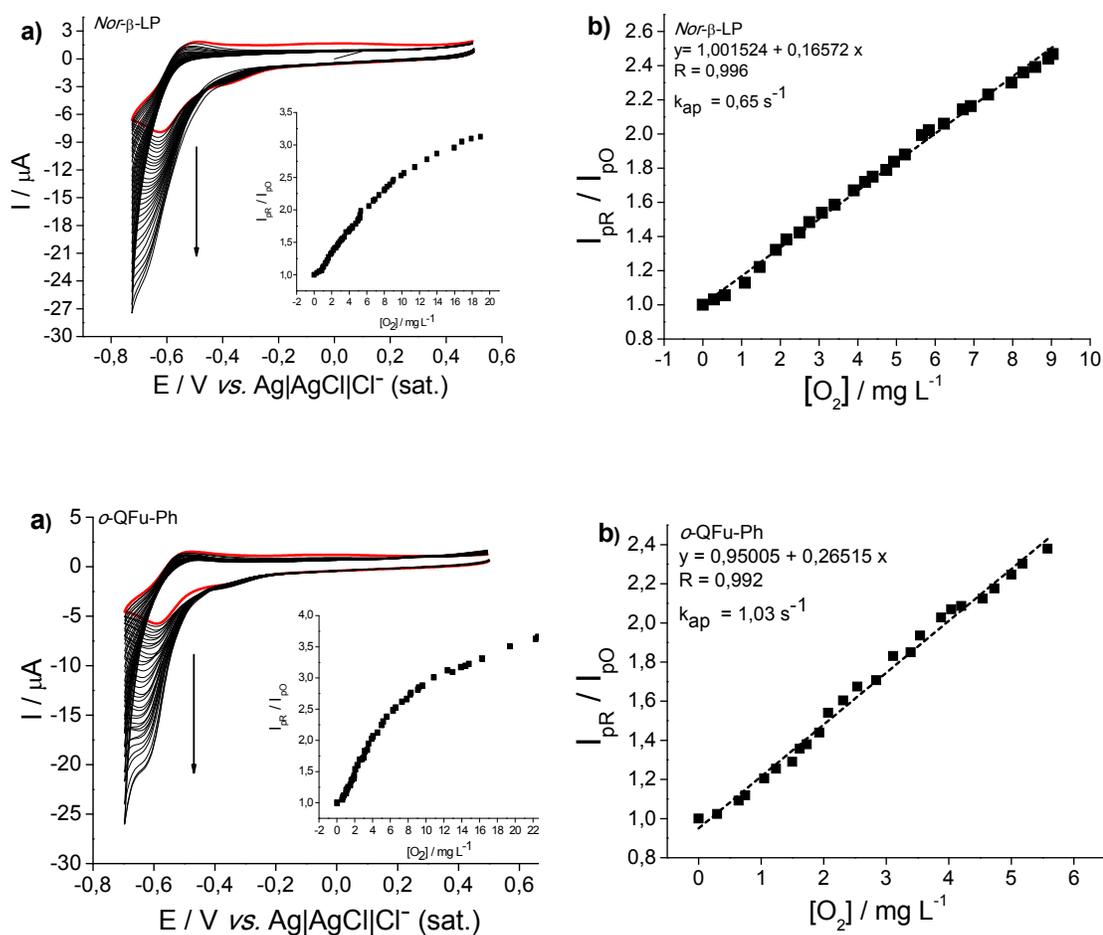
Fonte: Autora, 2013.

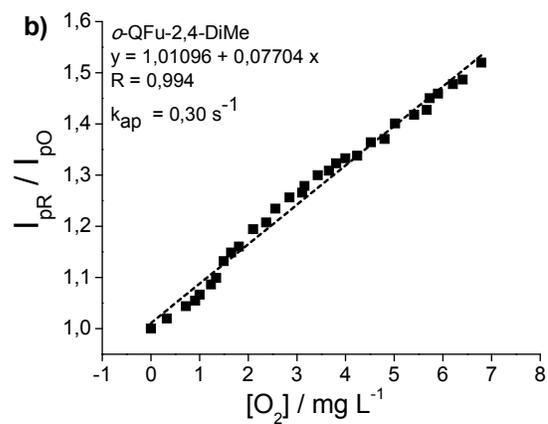
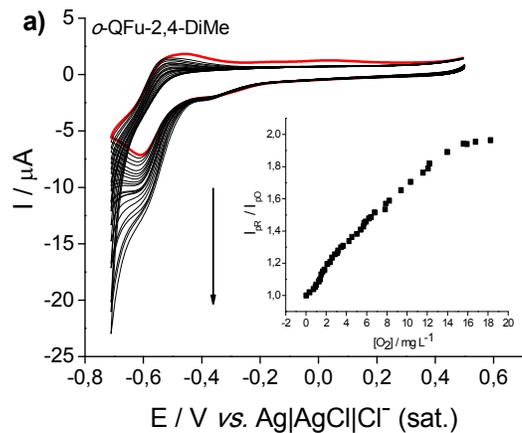
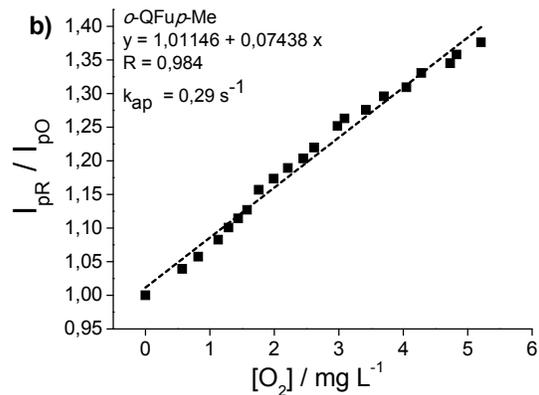
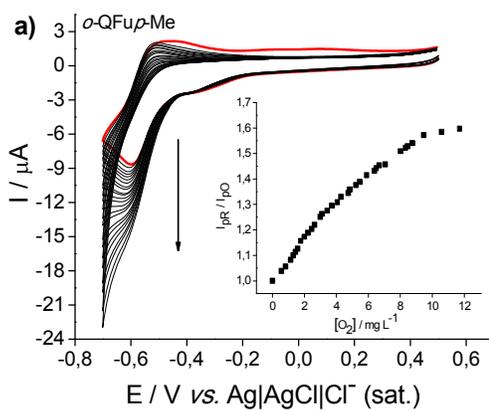
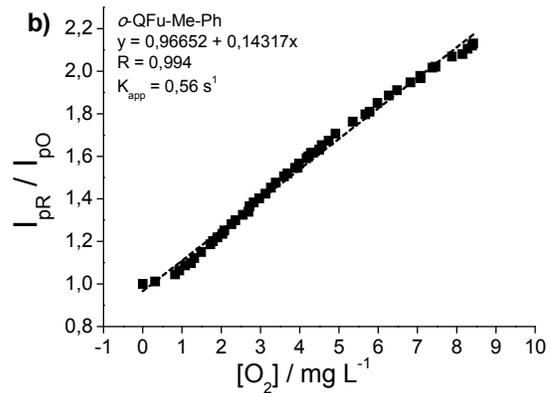
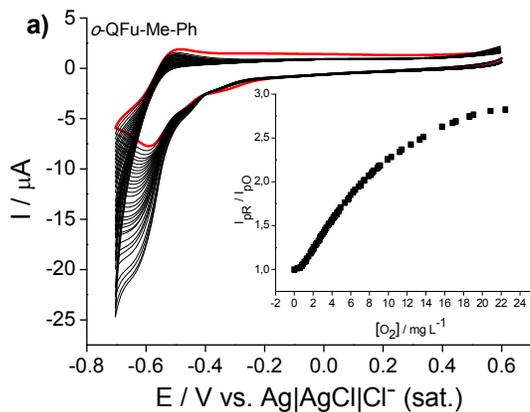
Na Figura 26, pode-se observar que o perfil eletroquímico para a primeira onda de redução, em ausência de oxigênio é pronunciadamente alterado quando da adição de oxigênio à cela eletroquímica. Na presença de oxigênio, a corrente de pico Ic aumenta em proporção direta à adição de oxigênio. O processo torna-se

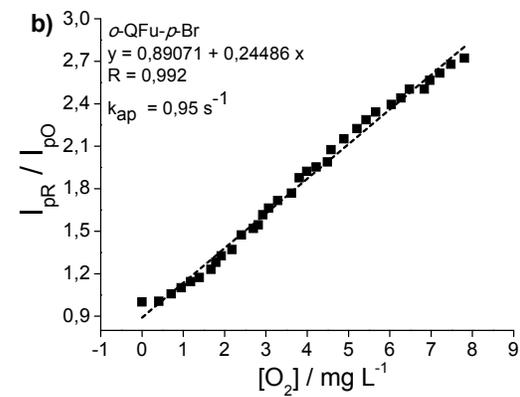
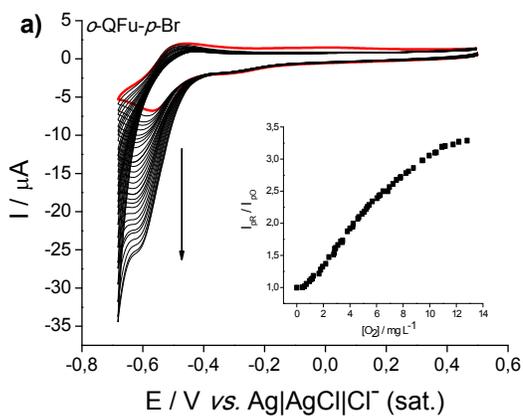
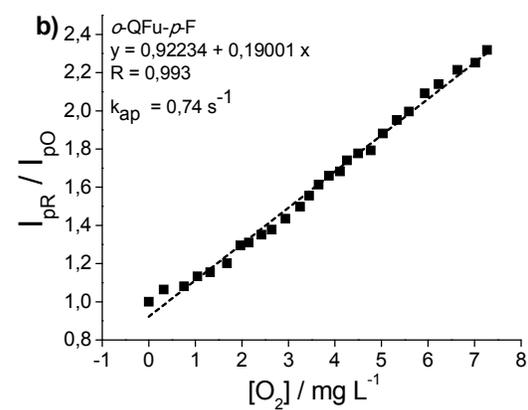
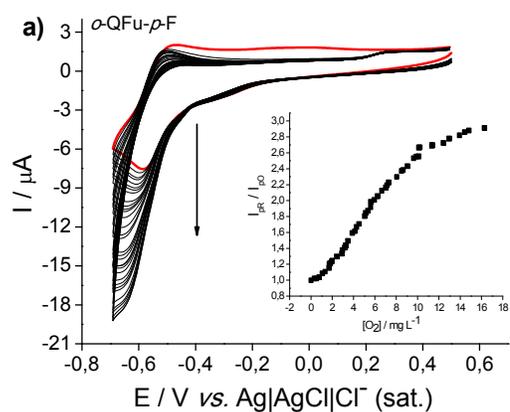
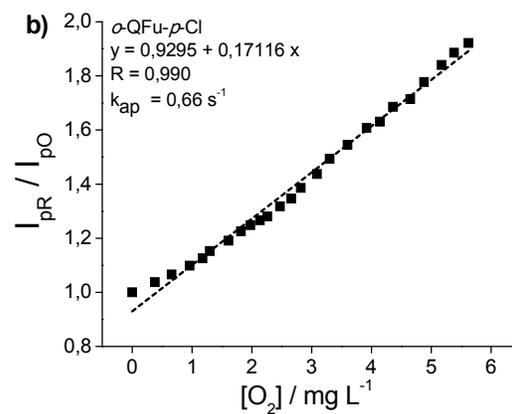
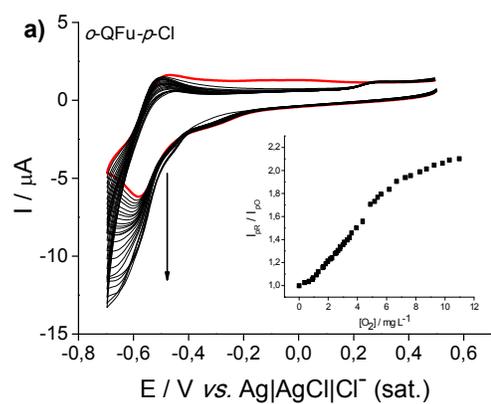
irreversível e acompanhado de deslocamento no potencial de pico para potenciais mais negativos, indica um processo catalítico.

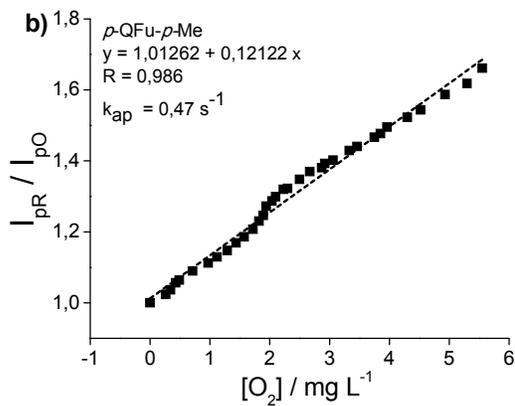
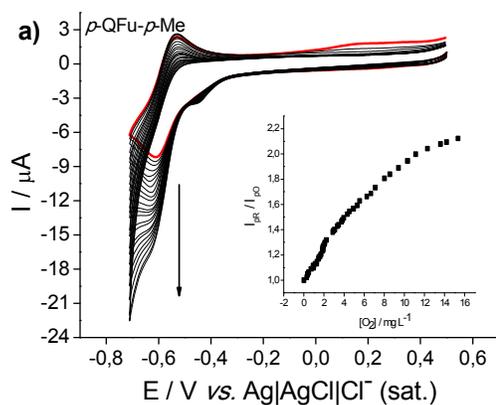
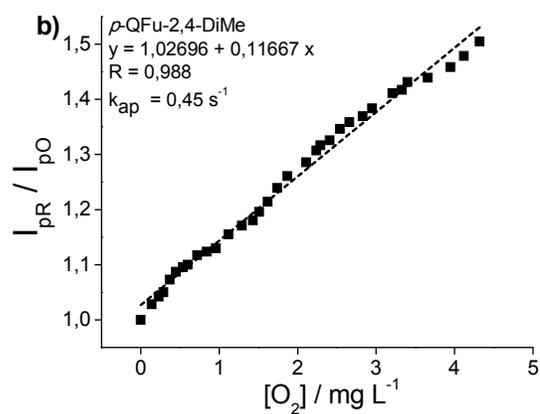
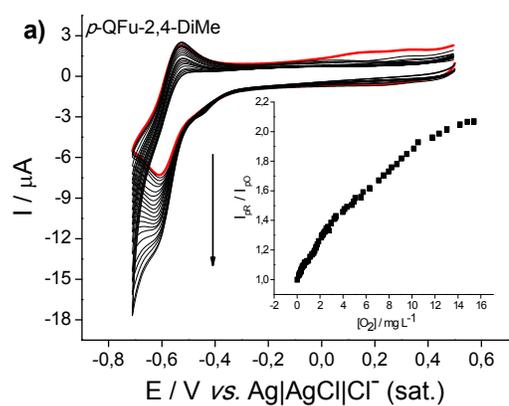
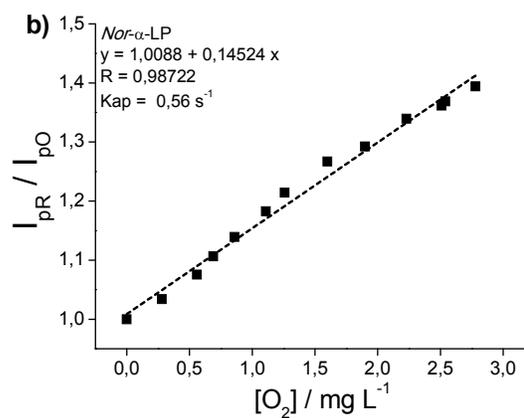
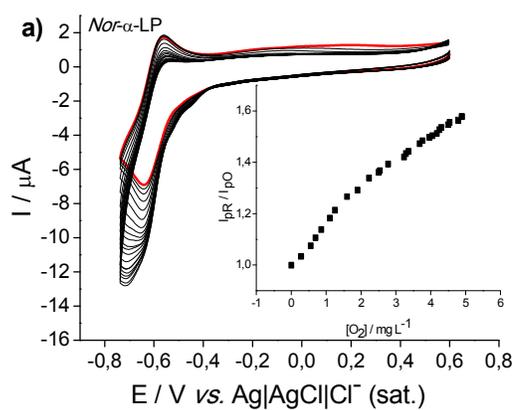
A partir dos valores de corrente obtidos em diferentes concentrações de oxigênio, considerando que a solubilidade máxima de oxigênio em DMF a 25° C é 1,85 mmol L⁻¹, o gráfico de I_{pR} / I_{pO} vs. $[O_2]$, (Figura 26b), permitiu determinar a constante de associação aparente entre o radical semiquinona (Q^{•-}), eletrogerado na redução da quinonas com oxigênio.

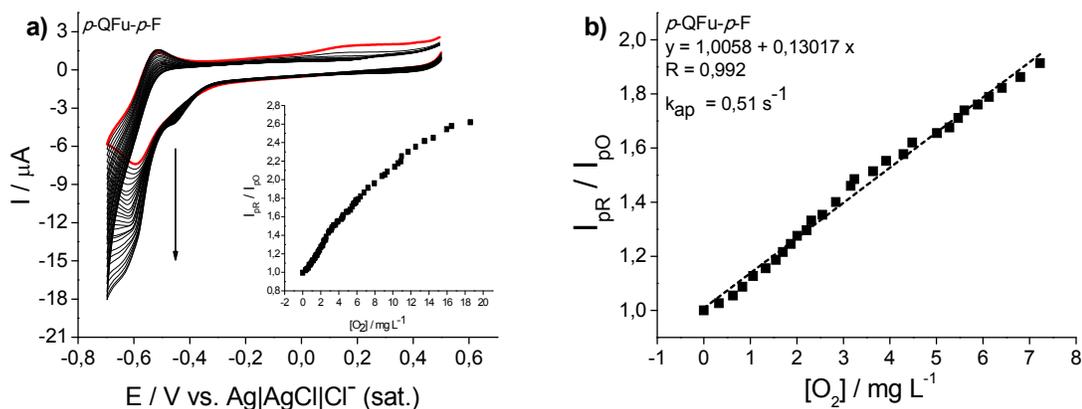
Figura 26 - a) Voltamogramas Cíclicos para *nor*-β-lapachona, *nor*-α-lapachona e *orto*- e *para*-derivados em DMF/TBAP (0,1 mol L⁻¹), eletrodo de carbono vítreo, em presença de diferentes concentrações de oxigênio; $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$. Insert: Curva de saturação para I_{pR} / I_{pO} em função da concentração de oxigênio. b) Porção linear de I_{pR} / I_{pO} em função da concentração de oxigênio para cálculo da constante aparente de reatividade.





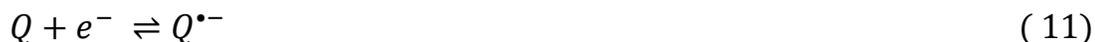






Fonte: Autora, 2013.

De acordo com os resultados obtidos por método eletroquímico, com o aumento de intensidade da primeira onda de redução (I_c) e diminuição da onda anódica correspondente (I_a) fica evidenciado que os ânions radicais formados a partir da *nor*- β -lapachona, da *nor*- α -lapachona e de seus derivados, interagem com oxigênio em mecanismo eletroquímico-químico (EC') catalítico regenerando o grupo quinona, de acordo com as equações abaixo:



Diante destes resultados, evidenciou-se a capacidade de geração do ânion radical superóxido (SONG; BUETTNER, 2010; SAWYER; VELENTINE, 1981; VASUDEVAN; WENDT, 1995). As constantes de associação entre os ânions radicais e o oxigênio foram obtidas e a ordem de reatividade observada foia seguinte

o-QFu-Ph > *o*-QFu-*p*-Br > *o*-QFu-*p*-F > *o*-QFu-*p*-Cl > *nor*- β -LP > *o*-QFu-Me-Ph e *nor*- β -LP > *p*-QFu-*p*-F > *p*-QFu-*p*-Me > *p*-QFu-2,4-DiMe > *o*-QFu-2,4-DiMe > *p*-QFu-*p*-Me.

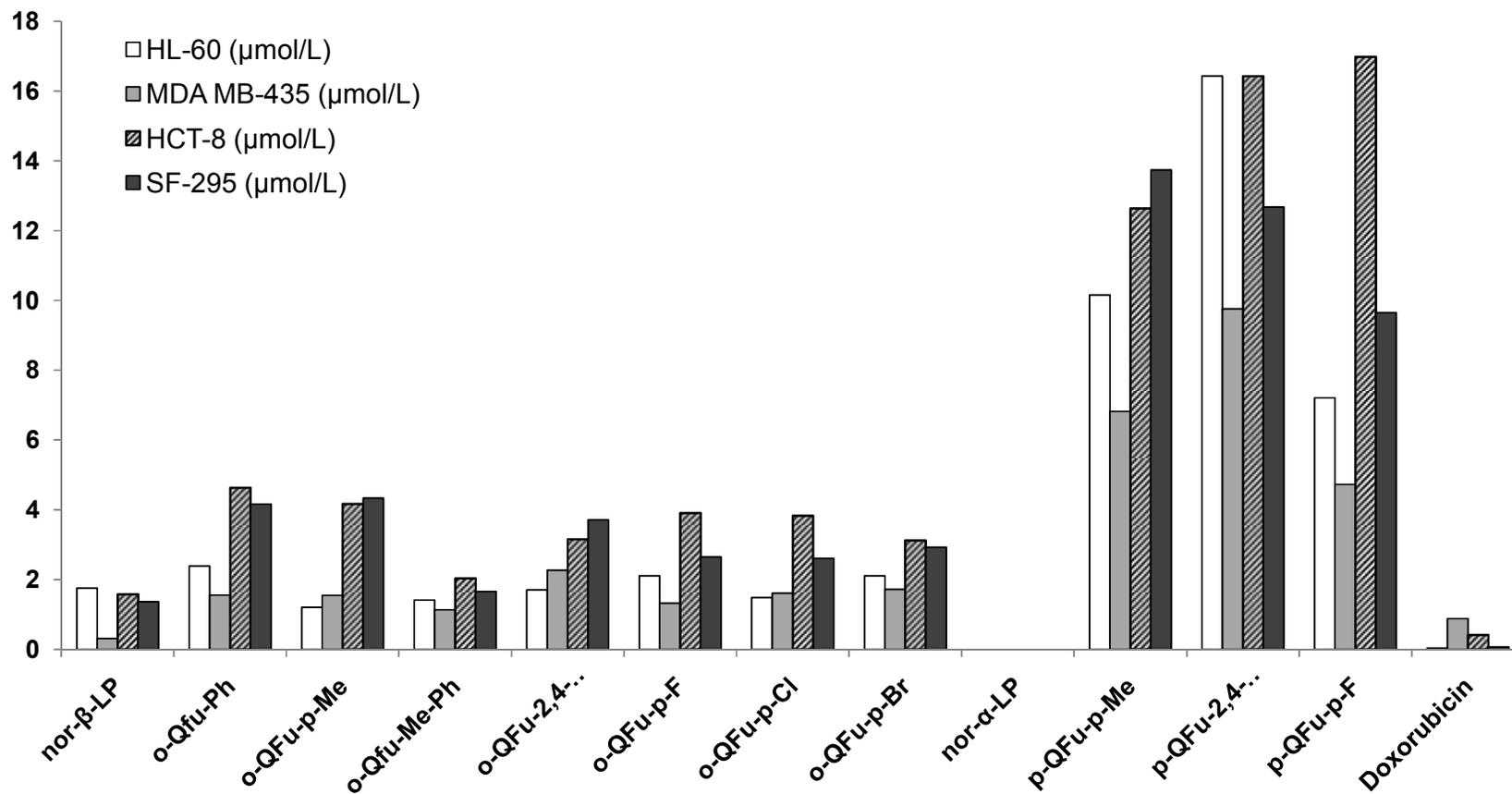
4.1.2 Atividade Citotóxica e Estudos em Presença de Oxigênio

As naftodihidrofuranoquinonas foram ainda objeto de avaliação antitumoral frente a diferentes linhagens de células cancerosas: MDA-MB435 (melanoma), HCT-8 (carcinoma de cólon), SF-295 (glioblastoma), HL-60 (leucemia) e testadas pelo

método do MTT in vitro. A atividade citotóxica de *nor*- β -LP já é bem descrita na literatura (ARAÚJO et al., 2012), no entanto, a atividade citotóxica de seus derivados e dos derivados de *nor*- α -LP apresentados neste trabalho ainda não foram descritos.

Alguns derivados foram altamente ativos em todas as linhagens de células de câncer avaliadas, ou em células específicas (Figura 27), em acordo com os protocolos do Instituto Nacional de Câncer (NCI), onde os compostos que exibiram valores de CI_{50} abaixo de $4,0\mu\text{g mL}^{-1}$ foram considerados ativos (HALL et al., 1999). A análise da Figura 27 permite comprovar que ambos 1,2-naftoquinonas e 1,4-naftoquinonas provaram ser ativos contra várias linhagens de células com ênfase nos *-orto* derivados, os quais foram mais ativos que os *-para* derivados. Estudos para avaliar o mecanismo de ação destes compostos estão em progresso, visto que ERO foram reconhecidos como moléculas fundamentais que podem modificar seletivamente importantes endobiótios e com isso regular sinalizadores celulares, inclusive apoptose (HILLARD et al., 2008).

Figura27 - Atividade citotóxica expressa em $\mu\text{mol L}^{-1}$ para as quinonas aqui estudadas em várias linhagens de células cancerígenas.



Fonte: Autora, 2013.

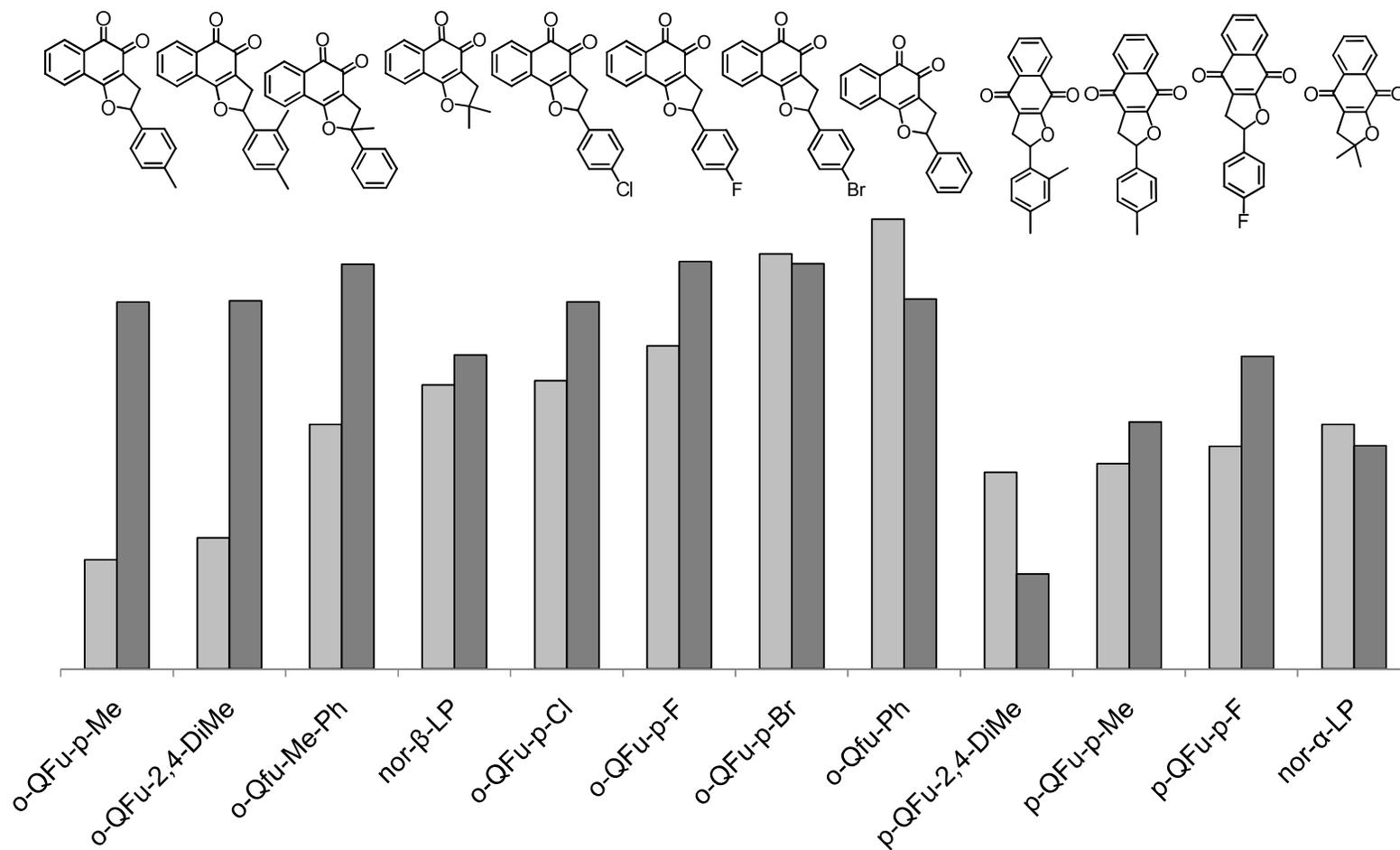
A toxicologia de quinonas é modulada pela presença de grupos substituintes, onde as propriedades oxidantes são acentuadas por grupos eletroatraentes, enquanto que a facilidade de oxidação da hidroquinona ou catecol correspondente é dificultada. Já a presença de grupos eletrodoadores diminui o poder oxidante e facilita a oxidação da *para*-hidroquinona ou do catecol (HILLARD et al., 2008, *apud* DE SOUZA, 2011). Este comportamento pode ser melhor visualizado fazendo análise do gráfico da Figura 28, que permite uma comparação entre a reatividade frente a oxigênio (cinza claro) e a produção de ERO por células HL-60 em contato com as respectivas quinonas (cinza escuro), resultados estes, obtidos pela técnica de citometria de fluxo.

A *nor*- β -LP (padrão) apresentou uma reatividade frente ao oxigênio de $0,65 \text{ s}^{-1}$. A substituição dos grupos metila por um hidrogênio e um anel benzênico, levou a um aumento na reatividade da quinona em torno de 60%. Esse aumento na reatividade frente ao oxigênio para esta quinona é explicado por que grupos fenila impedidos de contribuir via ressonância na estabilização de qualquer estrutura, atuam como eletroatraentes por efeito indutivo, dessa forma, o grupo passa a remover elétrons quando da substituição dos dois grupos metila da estrutura básica por um hidrogênio e um grupo fenila. Entretanto, quando adicionamos a este anel aromático grupos metila como é o caso das quinonas *o*-QFu-*p*-Me e *o*-QFu-2,4-DiMe, observa-se uma drástica diminuição da reatividade frente ao oxigênio, isso porque grupos metila aumentam a densidade eletrônica por efeito indutivo do ânion-radical eletrogerado da quinona, o que aumenta sua basicidade, aumentando sua estabilidade e conseqüentemente diminuindo sua reatividade frente ao oxigênio. No entanto, quando ao invés da adição da metila no substituinte benzênico, temos a adição de uma metila diretamente ao anel dihidrofurânico esta inserção provoca um aumento em torno de 100% na reatividade de *o*-QFu-Me-Ph com relação a *o*-QFu-*p*-Me e *o*-QFu-2,4-DiMe, isso porque esse grupo metila contribui para o aumento da densidade eletrônica enquanto o grupo fenila retira densidade eletrônica, o que leva a uma diminuição da reatividade dessa quinona em comparação com *o*-QFu-Ph. Tomando ainda como exemplo a *o*-QFu-Ph, e adicionando halogênios ao anel aromático, observa-se que a quinona bromada apresenta a segunda maior reatividade de todas as quinonas, acompanhada de *o*-QFu-*p*-F e *o*-QFu-*p*-Cl em terceiro e quarto lugares respectivamente. Esse aumento de reatividade deve-se ao

fato de que os halogênios são eletroatraentes por efeito indutivo, em razão das diferentes eletronegatividades; por outro lado, o par de elétrons de cada halogênio opera no sentido oposto por doação para o anel, levando a uma diminuição da estabilidade do ânion radical eletrogerado. Há uma queda na reatividade em relação ao anel não substituído (*o*-QFu-Ph) para as quinonas bromada e fluorada respectivamente, com efeito intermediário do cloro.

As *para*-quinonas *p*-QFu-*p*-Me e *p*-QFu-2,4-DiMe, por sua vez, apresentaram maior reatividade frente ao oxigênio que os respectivos isômeros *orto*-, isso porque a deslocalização da nuvem eletrônica proveniente da posição 2 (Figura 28) provoca um aumento da estabilidade da estrutura canônica em que oxigênio em 1 tem carga positiva, permite uma diminuição da estabilidade do ânion radical eletrogerado e conseqüentemente aumenta sua reatividade com relação aos isômeros *orto*-. Em contrapartida, a *p*-QFu-*p*-F apresentou menor reatividade do que sua *orto*-isômera. Não temos os dados para a quinona com anel não substituído, mas o efeito para a *p*-QFu-*p*-F segue efeito similar ao encontrado antes para as quinonas *o*-QFu-*p*-Me e *o*-QFu-2,4-DiMe.

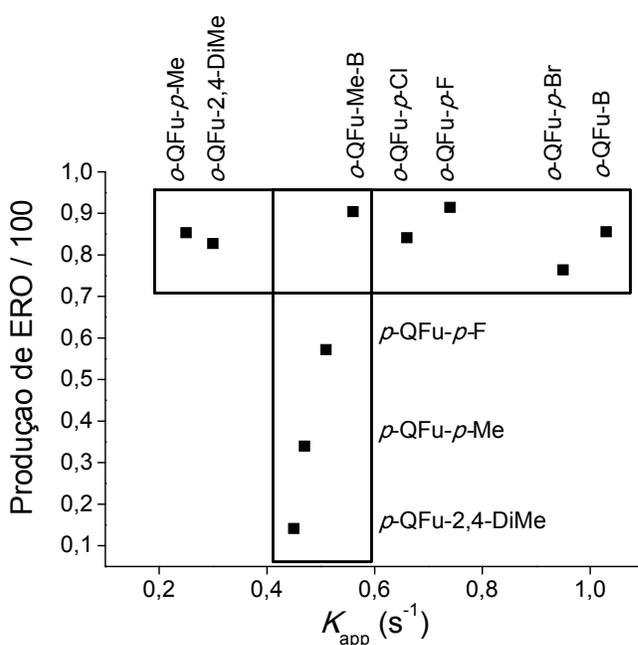
Figura28 -Gráfico de comparação entre reatividade frente a oxigênio (cinza claro) e Células produzindo ERO (cinza escuro).



Fonte: Autora, 2013.

Ainda foi possível traçar um gráfico de reatividade frente ao oxigênio *versus* produção de ERO *in vitro*. É possível observar dois comportamentos distintos. O primeiro mostra uma relação linear com relação às *para*-quinonas e *o*-QFu-Me-Ph, onde o aumento da reatividade frente ao oxigênio é proporcional ao aumento na produção de ERO. No entanto, este mesmo comportamento não está claro para as *orto*-quinonas, o que nos leva a avaliar se esta variação na produção de ERO é significativa. Para este fim, foi utilizado o teste t de *student* considerando 95% de probabilidade, onde foi observado que não há diferenças significativas para a produção de ERO entre as diferentes *orto*-quinonas, ou seja, os valores diferem mas ambas são estatisticamente iguais e não revelam erros sistemáticos.

Figura29 - Gráfico de reatividade frente a oxigênio versus produção de ERO.

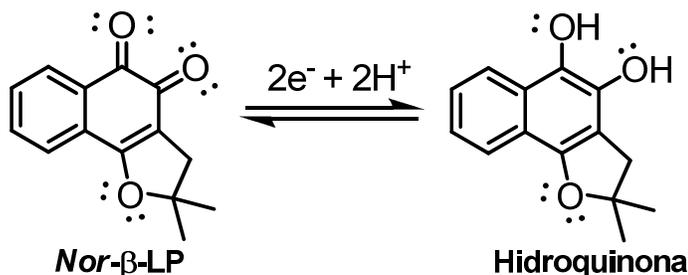


Fonte: Autora, 2013.

4.1.3 Estudo em meio prótico de *nor-α*-Lapachona e *nor-β*-Lapachona e seus derivados por voltametria cíclica

Em meio aquoso, já está bem estabelecido que quinonas sofrem redução bieletrônica, formando hidroquinonas, como representado para a *nor-β*-Lapachona no processo representado na Figura 30.

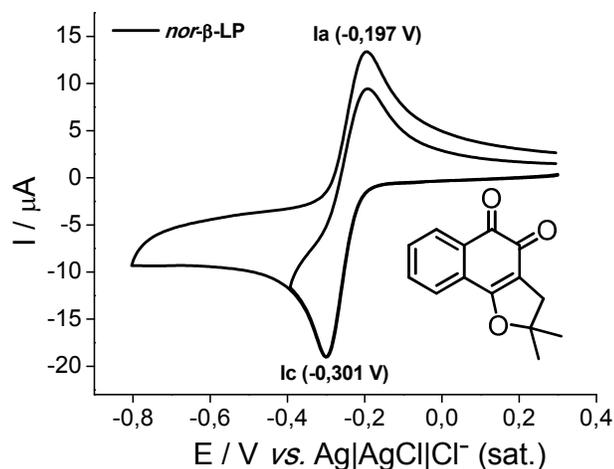
Figura 30 - Racionalização mecanística para a formação de hidroquinonas utilizando como exemplo *nor-β*-LP.



Fonte: Autora, 2013.

Os estudos eletroquímicos para *nor-β*-lapachona e seus derivados por voltametria cíclica em meio prótico foram realizados em tampão fosfato, pH 7,4. Devido à dificuldade de solubilização dos compostos em meio aquoso, preferiu-se trabalhar em concentração relativamente baixa dos mesmos, utilizando etanol como co-solvente para garantir a completa solubilização das quinonas, com exceção da *nor-β*-lapachona que não apresentou as mesmas dificuldades de solubilização, sendo possível o estudo em concentração 10x maior que para seus derivados. O perfil voltamétrico para a *nor-β*-lapachona em meio aquoso-etanólico é representado na Figura 31. Um par redox I_c/I_a é observado, característico de processo quase-reversível ($\Delta E = 104$ mV), envolvendo o consumo de $2e^-/2H^+$ referente à formação da hidroquinona (DE ABREU et al., 2005).

Figura31 -Voltamograma cíclico da *nor*- β -lapachona ($c = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$) em meio aquoso etanólico (20%), tampão fosfatopH7,4. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autora, 2013.

Na Figura32 estão representados os estudos por voltametria cíclica em meio aquoso-etanólico relacionados aos derivados da *nor*- β -lapachona. Todos os compostos mostraram uma onda de redução bem definida, os quais correspondem à transferência de dois elétrons e dois prótons, levando à formação das hidroquinonas correspondentes. A primeira onda de redução e sua correspondente onda anódica caracterizam o processo como quase reversível, onde a diferença entre os potenciais de pico catódico e anódico variou 45-74 mV.

A quinona *o*-QFu-Me-Ph (Figura 32b) mostrou-se bem estável, no entanto, é possível observar no voltamograma cíclico para *o*-QFu-Ph (Figura 32a), ombros catódicos e anódicos não característicos para quinonas em meio prótico. A presença ou aumento da corrente de pico para esses sinais é mais evidente nas quinonas que apresentam o anel aromático substituído por metilas como é o caso de *o*-QFu-*p*-Me e *o*-QFu-2,4-DiMe.

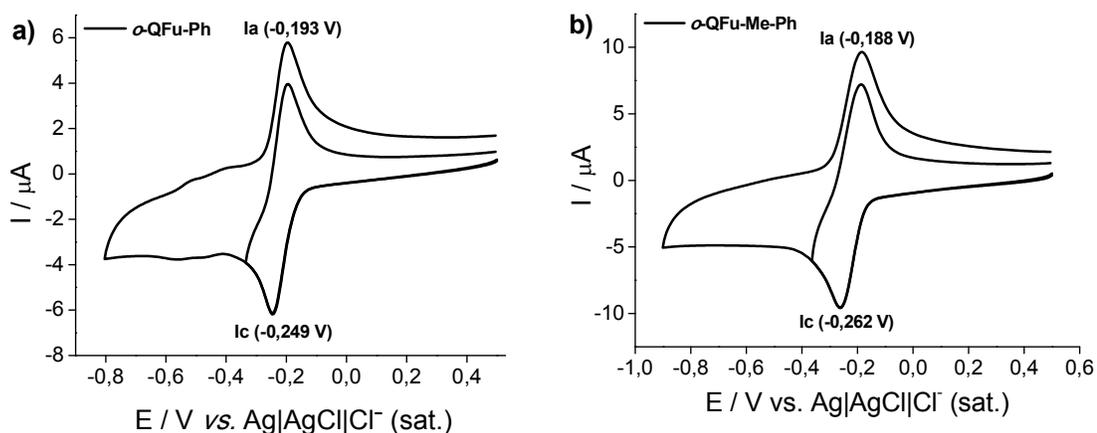
A quinona *o*-QFu-2,4-DiMe, apresentou duas ondas catódicas em -0,746 e 1,058 V, além de um ombro anódico em -0,673 V (Figura 32d); *o*-QFu-*p*-Me, por sua vez, apresentou uma onda catódica em -0,750 V e uma onda discreta em IIIc (-1,070 V). Estas ondas adicionais aumentam de intensidade em função do tempo,

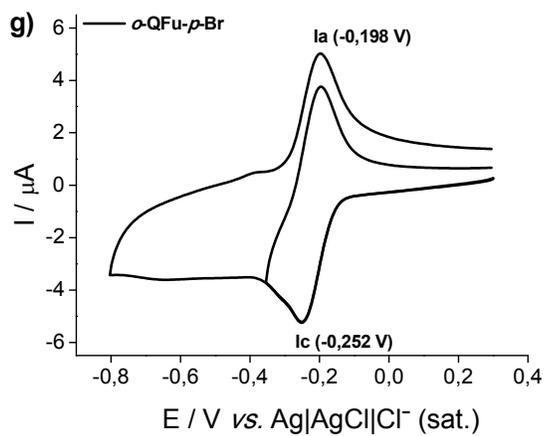
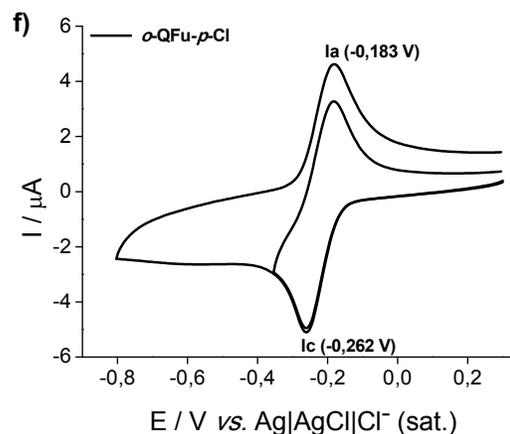
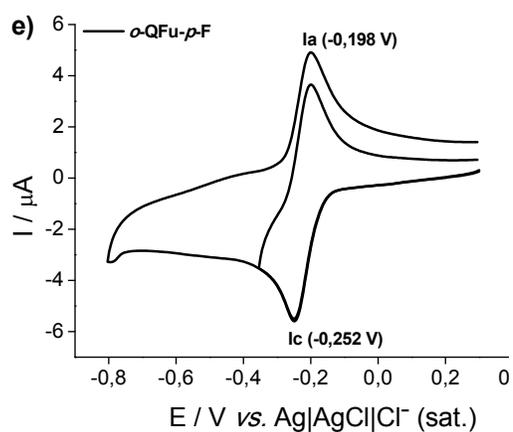
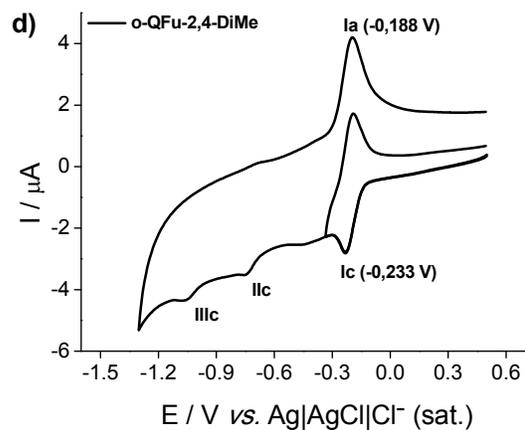
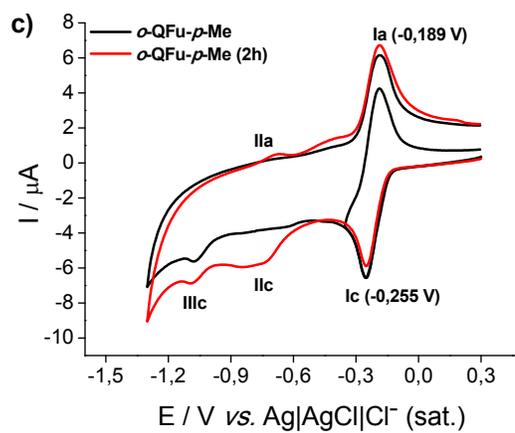
seguidos pelo aparecimento de dois ombros anódicos em -0,686 V e -0,423 V, como pode ser observado na Figura32c (vermelho).

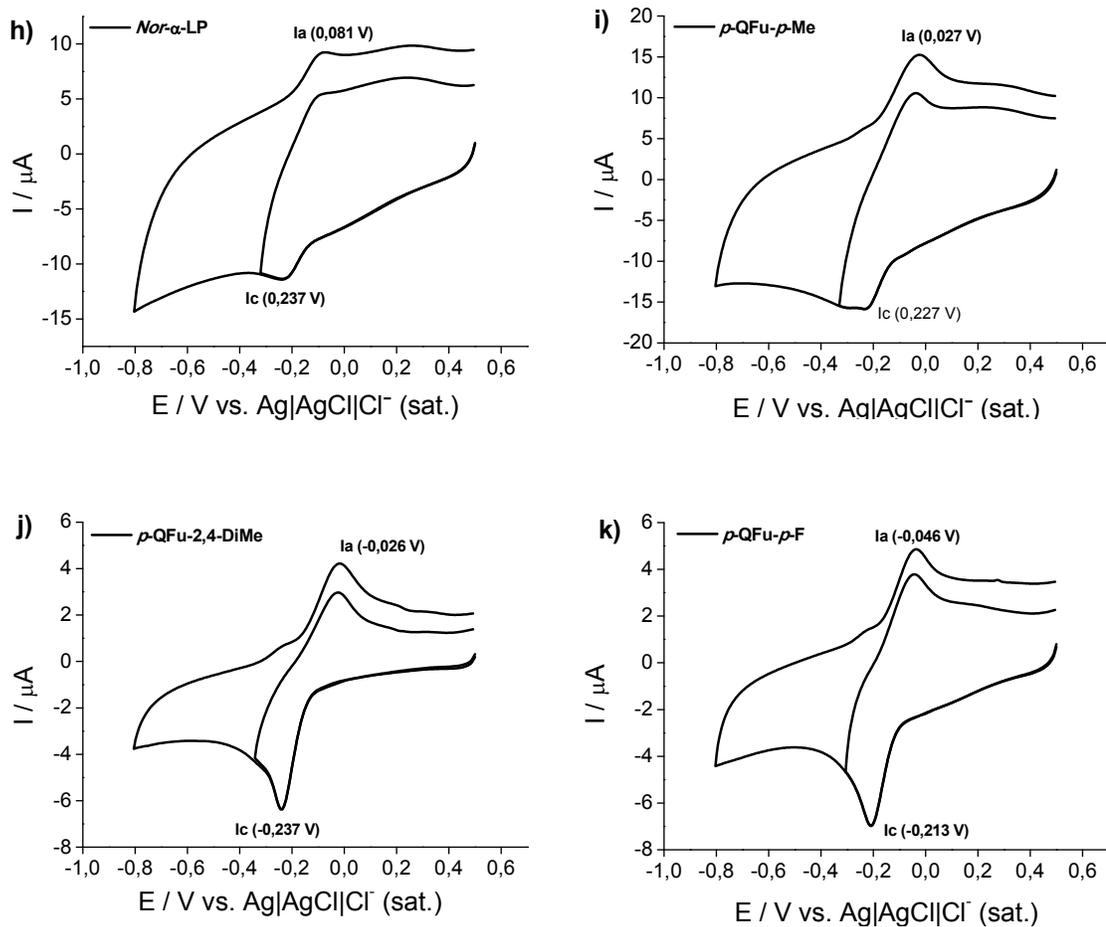
Os derivados halogenados por sua vez apresentaram uma única onda catódica seguida por sua respectiva onda anódica. O derivado clorado (Figura 32f) apresentou um ligeiro deslocamento das correntes de pico catódico (para potencial mais negativo) e anódico (para potencial mais positivo), mostrando uma diferença de potencial de 79 mV, enquanto que para os derivados fluorado e bromado, esta diferença foi de 54 mV (Figura32e-g).

As *para*-quinonas não foram solúveis no meio utilizado no estudo eletroquímico das *orto*-quinonas mesmo aumentando até 50% a quantidade de etanol no meio, dessa forma, essas quinonas foram trabalhadas em tampão acetato pH 4,5 em 40% de etanol (Figura 32h-k).As *para*-quinonas também mostraram um par redox e a diferença entre os potenciais de pico catódico e anódico variou de 156-209 V.

Figura32 - Voltamogramas Cíclicos dos derivados dihidrofurânicos da *nor*- β -lapachona(a-g)em meio aquoso etanólico (20%), tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹), pH7,4, e dos derivados da *nor*- α -lapachona (h-k) em meio aquoso etanólico (40%), tampão acetato pH 4,5 (0,1 mol L⁻¹). Todas as quinonas foram trabalhadas na concentração de 0,1 mmol L⁻¹.Eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.







Fonte: Autora, 2013.

Em virtude do aparecimento de ondas adicionais nos voltamogramas cíclicos de *o*-QFu-Ph, *o*-QFu-*p*-Me e *o*-QFu-2,4-DiMe, estudos de espectroscopia no UV-vis foram realizados nas mesmas condições experimentais do estudo eletroquímico na ausência de luz (dados não mostrados). Foi observado diminuição nas absorvâncias relativas às *orto*-quinonas estudadas, 10 minutos após o início do experimento, que foi realizado até 180 minutos, tempo este suficiente para a realização dos estudos eletroquímicos. Os espectros no UV-vis revelaram, no entanto, que todas as *orto*-quinonas foram mais estáveis que as *para*-quinonas, as quais além da observação da diminuição na absorvância de algumas bandas, houve também aumento de outras bandas, refletindo sua instabilidade.

Com o intuito de aumentar a solubilidade e estabilidade de *nor*- β -lapachona e seus derivados, as mesmas foram avaliadas na presença de β -ciclodextrina em um estudo eletroquímico de solubilidade de fase, como descrito no tópico a seguir.

4.1.4 Comportamento eletroquímico de *nor*- α -lapachona e *nor*- β -lapachona e derivados em presença de β -ciclodextrina

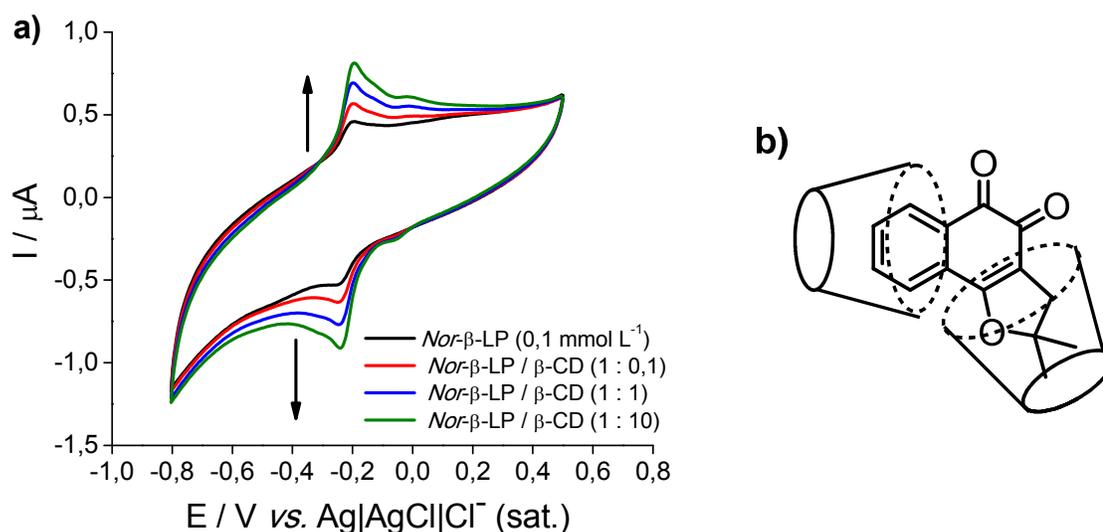
Na literatura, está bem relatada, a formação de complexos de inclusão entre quinonas e ciclodextrinas, assim como são propostos modelos para estas interações utilizando desde técnicas espectroscópicas e eletroquímicas até modelagem molecular (CAVALCANTI et al., 2011). Desta forma, neste trabalho, avaliamos a interação de β -CD com *nor*- β -lapachona e seus derivados, uma vez que a baixa solubilidade dos derivados em meio aquoso pode ser um fator limitante na administração sistemática e aplicação clínica.

As análises da *nor*- β -lapachona e seus derivados com β -CD foram realizadas por voltametria cíclica em tampão fosfato (pH 7,4). A adição de β -CD às quinonas provocou mudanças em seus perfis voltamétricos, como descrito a seguir. A Figura 32 mostra a interação de *nor*- β -lapachona com β -CD, através do aumento gradativo das intensidades de correntes de pico de oxidação e redução em função da concentração de β -CD. Este aumento se deve à inclusão da *nor*- β -lapachona na cavidade hidrofóbica da β -CD, por um mecanismo que não impede que o grupo eletroativo sofra processos redox.

NASONGKLA et al. (2003) inicialmente e DE ABREU et al., (2007) em estudos posteriores mostraram que a complexação de β -lapachona com β -CD ocorre através do anel pirano. De Abreu et al. (2007), observaram um decréscimo na corrente de oxidação da hidroquinona devido à formação de ligação hidrogênio entre a hidroquinona gerada e a hidroxila C-2 da β -CD. No entanto, no presente estudo, assim como em trabalhos anteriores do grupo (DE SOUZA, 2011), observa-se um aumento gradativo das correntes de redução e oxidação da *nor*- β -lapachona em função da concentração de β -CD. Assim, mesmo a inclusão ocorrendo a partir do anel dihidrofurânico da *nor*- β -lapachona (Figura 33), a conformação apresentada pelo complexo formado, não permite que as hidroxilas externas da β -CD interajam com a

hidroquinona, logo, as correntes de pico aumentam à medida que o complexo *nor*- β -lapachona- β -CD é formado.

Figura33 - a) Voltamogramas cíclicos da *nor*- β -lapachona ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) em diferentes concentrações de β -CD, (●) 0, (●) 0,01, (●) 0,1 e (●) 1 mmol L^{-1} , respectivamente), eletrodo de carbono vítreo, tampão fosfato pH 7,0, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. b) Estrutura proposta para o complexo formado por *nor*- β -lapachona: β -CD, podendo ocorrer pelo anel aromático e/ou pelo anel dihidrofurano.



Fonte: Autora, 2013.

A Figura 34 mostra o comportamento eletroquímico em eletrodo de carbono vítreo, em função da concentração de β -CD para as quinonas *o*-QFu-Ph, *o*-QFu-Me-Ph, *o*-QFu-*p*-Me e *o*-QFu-2,4-DiMe. Na Figura 34a estão representados os voltamogramas cíclicos para *o*-QFu-Ph que apresentou uma onda catódica em $-0,21 \text{ V}$, seguida por sua respectiva onda anódica em $-0,14 \text{ V}$. A adição de β -CD na concentração de $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ (Figura 34a, vermelho) provocou um aumento em ambas as correntes de pico. As correntes de pico catódica e anódica continuaram a aumentar após a adição da segunda massa de β -CD à cela eletroquímica, no entanto, após a adição da terceira massa de β -CD as correntes de pico de I_c e I_a diminuem, enquanto o potencial de pico catódico é mantido. Este resultado sugere que o excesso de β -CD no meio está impedindo a quinona de sofrer processo redox em maior extensão.

O comportamento eletroquímico de *o*-QFu-Me-Ph, parcialmente solúvel, mostrou duas ondas catódicas, uma em -0,082 V e outra em -0,276V (Figura 34b). Esse comportamento não é esperado para quinonas, no entanto, sugere-se a presença de alguma impureza, ou mesmo o seu isômero, capaz de reduzir em potencial próximo ao dessa quinona. Observou-se, ainda, que ao adicionar β -CD em quantidades sucessivas, ocorreu um aumento na intensidade da corrente de pico catódica e anódica devido ao aumento da solubilidade do substrato.

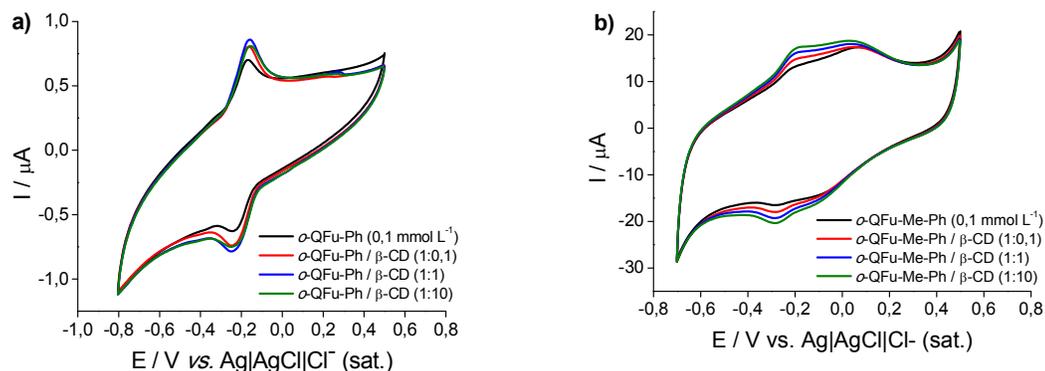
O comportamento eletroquímico de *o*-QFu-*p*-Me no estudo eletroquímico de solubilidade de fase em tampão fosfato pH 7,4 (Figura 34c), diferiu do comportamento eletroquímico no meio aquoso etanólico apresentado na Figura 32c, onde foi possível observar uma única onda catódica em -0,23 V com sua respectiva onda anódica em -0,16 V (Figura 34c, preto). A adição de β -CD na concentração de 0,01 mmol L⁻¹ (Figura 34c, vermelho) provocou um aumento em ambas correntes de pico catódica e anódica de *o*-QFu-*p*-Me, que continuaram a aumentar com a adição da segunda massa de β -CD (0,1 mmol L⁻¹), mas em menor proporção. Em contrapartida, a terceira adição de β -CD, em concentração 10 vezes maior que *o*-QFu-*p*-Me, provocou um discreto aumento na corrente de pico. Foi possível observar ainda, que houve um deslocamento no potencial de pico anódico para valores mais positivos, implicando que a inclusão na cavidade de ciclodextrinas facilita o processo de oxidação para esta quinona.

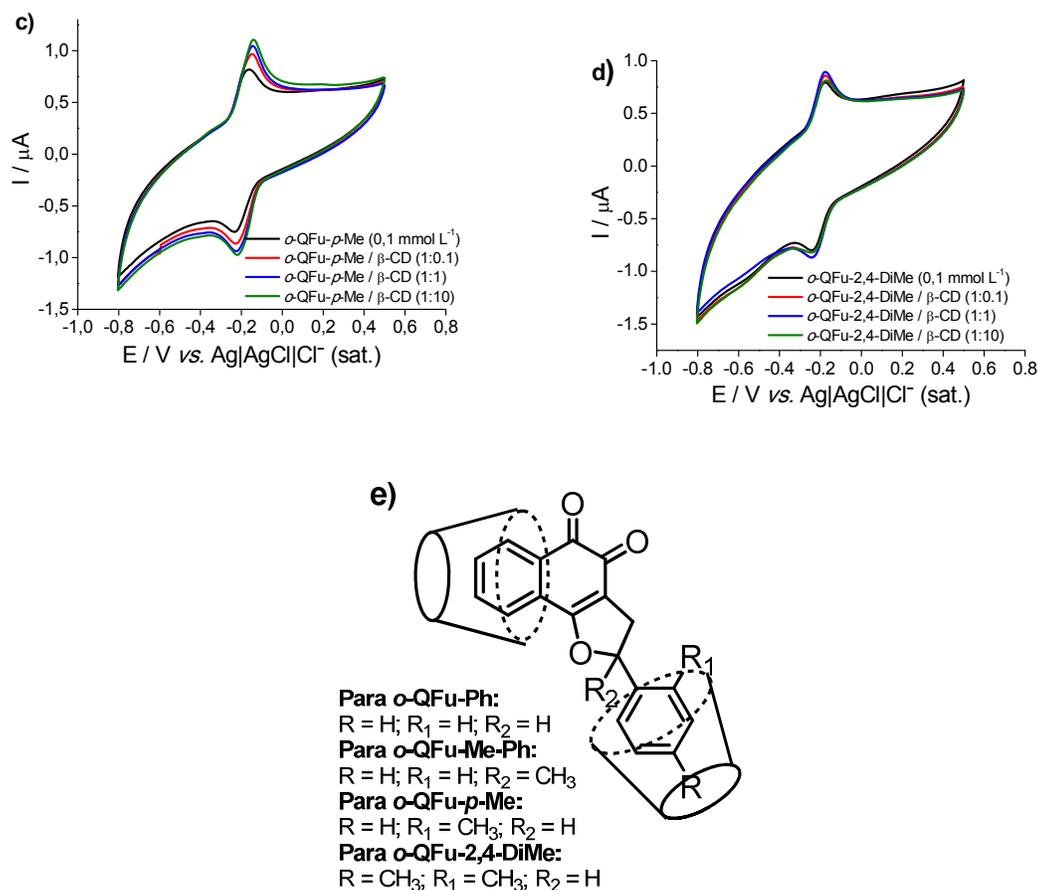
A Figura 34d, mostra o comportamento eletroquímico para *o*-QFu-2,4-DiMe frente a adição de diferentes concentrações de β -CD. *o*-QFu-2,4-DiMe apresentou uma única onda catódica acompanhada de sua respectiva onda anódica. A adição de β -CD na concentração de 0,01 mmol L⁻¹ provocou um discreto aumento nas correntes de pico de *o*-QFu-2,4-DiMe, enquanto que a adição da segunda massa de β -CD, não alterou a última corrente de pico observada. Todavia, a última massa de β -CD adicionada provocou uma diminuição nas correntes de pico chegando a ficar a mesma altura que a quinona sozinha. Esta pequena influência nas correntes de pico provocada pela β -CD em *o*-QFu-2,4-DiMe pode ser explicada pelo impedimento causado pela metila localizada na posição *orto*- ao grupo fenil da quinona dihidrofurânica, impedindo uma maior interação com a cavidade hidrofóbica do oligossacarídeo (Figura 34d).

O comportamento eletroquímico observado no estudo de solubilidade de fase com as quinonas *o*-QFu-Ph, *o*-QFu-*p*-Me e *o*-QFu-2,4-DiMeem presença de β -CD e descrito acima, juntamente com o não aparecimento das demais ondas de redução observadas nos estudos em meio aquoso-etanólico, indica que β -CD com sua cavidade hidrofóbica atua estabilizando o carbocátion formado e impedindo que as quinonas sofram ciclização.

Com base nos resultados acima apresentados, foi proposto um modelo para o complexo formado entre *o*-QFu-Ph, *o*-QFu-Me-Ph, *o*-QFu-*p*-Me e *o*-QFu-2,4-DiMe com β -CD, que pode ocorrer a partir do anel aromático e/ou a partir do anel de cinco membros substituído. Vale ressaltar que esse modelo é muito simples e está expressando uma ideia da autora da tese. Experimentos mais acurados, ainda serão realizados para confirmar como procede essa inclusão e qual sua estequiometria.

Figura 34 - Voltamogramas cíclicos dos derivados da *nor*- β -LP. a) *o*-QFu-Ph; b) *o*-QFu-Me-Ph; c) *o*-QFu-*p*-Me; d) *o*-QFu-2,4-DiMe, ambos $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em diferentes concentrações de β -CD, (\bullet) 0, ($\color{red}\bullet$) 0,01, ($\color{blue}\bullet$) 0,1 e ($\color{green}\bullet$) 1 mmol L^{-1} , respectivamente), eletrodo de carbono vítreo, tampão fosfato pH 7,0, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$. e) Estrutura representativa para o complexo entre as quinonas e β -CD.



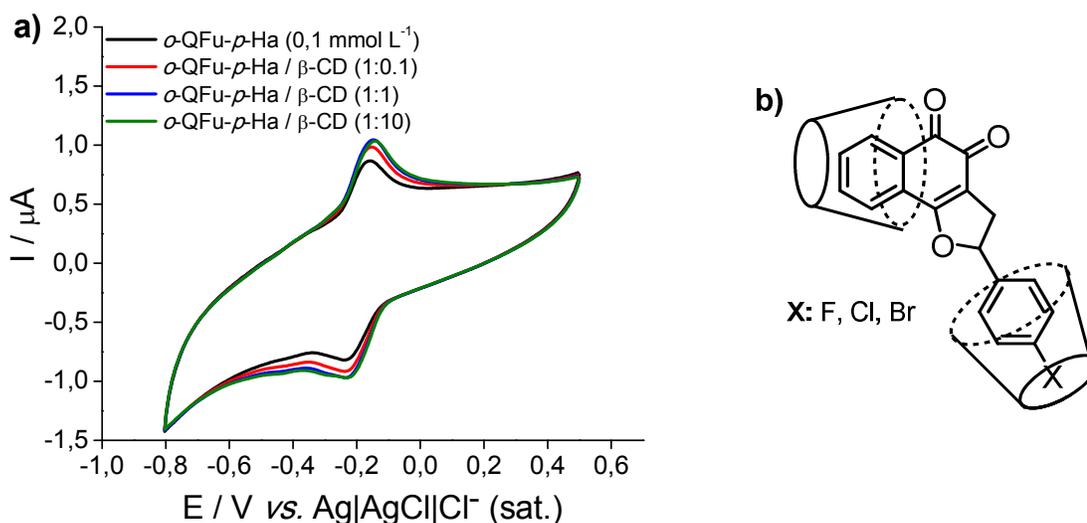


Fonte: Autora, 2013.

As quinonas *o*-QFu-*p*-F, *o*-QFu-*p*-Cl e *o*-QFu-*p*-Br diferem em suas estruturas, apenas no halogênio substituído no grupo benzilae desta forma, no estudo eletroquímico de solubilidade de fase,todas quinonas halogenadasapresentaram uma onda catódica em -0,23 V e sua respectiva onda anódica em -0,16 V (Fig 35a). Quando das adições crescentes deβ-CD, todas as quinonas mantiveram o mesmo comportamento com pequenas variações nas correntes de pico, sendo um aumento pronunciado observado quando uma massa de β-CD, em concentração 10x menor que a concentração das quinonas (0,1 mmol L⁻¹), apresentado em vermelho, foi adicionada à cela eletroquímica. As adições seguintes de β-CD (0,1 e 1,0 mmol L⁻¹) à cela eletroquímica contendo as quinonas halogenadas, praticamente não alteraram a corrente de pico obtida com a adição da primeira massa do oligossacarídeo. Na Figura 35b, está representado um modelo de

interação entre as quinonas halogeno substituídas e β -CD com base nos resultados apresentados.

Figura35 -a) Voltamogramas cíclicos representativo das quinonas halogenadas ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) em diferentes concentrações de β -CD, (\bullet) 0, ($\color{red}\bullet$) 0,01, ($\color{blue}\bullet$) 0,1 e ($\color{green}\bullet$) 1 mmol L^{-1} , respectivamente), eletrodo de carbono vítreo, tampão fosfato pH 7,0, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.b) Estrutura representativa da interação dasquinonashalgeno-substituídas com β -CD.



Fonte: Autora, 2013.

Os voltamogramas cíclicos das *para*-quinonas parcialmente solúveis, apresentaram o mesmo comportamento eletroquímico observado para as *orto*-quinonas, com a presença de um par de picos redox. No entanto, a adição de quantidades crescentes de β -CD à solução contendo o substrato, não provocou qualquer alteração nos potenciais ou correntes de pico.

A *nor*- β -LP foi de todas as quinonas, a mais influenciada pela presença de ciclodextrina no meio. Se assumirmos que em todas as quinonas, temos sempre um dos encapsulamentos ocorrendo pela porção naftoquinona, então o encapsulamento do substituinte ligado à posição 2 das quinonas é o que está determinando o aumento da solubilidade das quinonas no meio. Isso pode ser explicado pela distância entre o oligossacarídeo e o anel dihidrofurânico, visto que nas demais quinonas, a ciclodextrina interage com o substituinte e na *nor*- β -LP interage

diretamente com o anel dihidrofurânico. Infelizmente não foi possível determinar com certeza como se dá a inclusão das moléculas estudadas na cavidade da β -CD. Estudos adicionais estão sendo planejados.

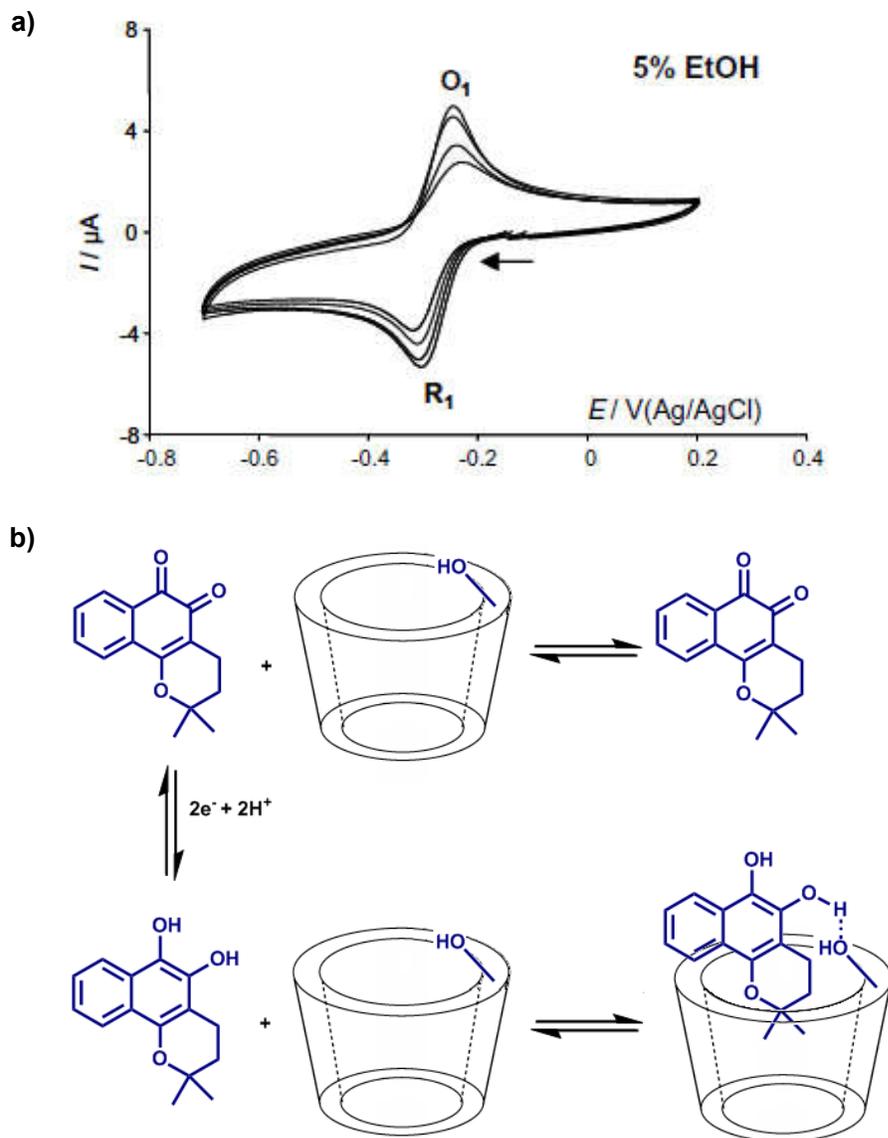
4.1.5 Espectroeletróquímica da interação entre a β -lapachona e a SAM- β CD-SH usando a técnica de PM IRRAS.

A β -lapachona é uma das naftoquinonas mais estudadas devido às suas atividades biológicas e propriedades estruturais. Esta naftoquinona apresenta efeitos citotóxicos significativos pela indução de apoptose em células cancerosas humanas, particularmente no pulmão, próstata, pâncreas, mama e ovários. No entanto, apesar da gama de atividades biológicas, seu uso terapêutico é limitado a certo ponto, devido à sua baixa solubilidade em água ($0,16 \text{ mmol L}^{-1}$) (ELINGOLD et al., 2009; FERREIRA et al., 2010; CAVALCANTI et al., 2011).

Vários trabalhos já mostraram a formação de complexos de inclusão de β -lapachona com ciclodextrinas (DE ABREU et al., 2007), em especial com a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β CD) a qual promoveu biodisponibilidade deste agente antitumoral (NASONGKLA et al., 2003; CAVALCANTI et al., 2011). Atualmente, a β -lapachona se encontra em testes clínicos de fase II para o tratamento do câncer de pâncreas em uma formulação com hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β CD) (ELINGOLD et al., 2009; FERREIRA et al., 2010; CAVALCANTI et al., 2011).

De Abreu et al. (2007) estudaram a interação de β -lapachona (β -LP) com β -CD utilizando as técnicas de espectroscopia no ultravioleta visível e eletroquímica, chegando a determinar a constante de formação para o complexo. Utilizando a técnica de voltametria cíclica (VC), eles demonstraram que a reversibilidade do pico de redução da β -LP é diminuída (Figura 36a) quando a mesma está encapsulada na cavidade do oligossacarídeo. Este comportamento foi atribuído à formação de ligações de hidrogênio entre a hidroquinona eletrogerada na cavidade com as hidroxilas secundárias do oligossacarídeo, ou seja, com as hidroxilas da cavidade maior do oligossacarídeo (Figura 36b).

Figura36 - a) Voltamogramas Cíclicos de β -lapachona ($c = 0,12 \text{ mmol L}^{-1}$) em 5% de EtOH com adições crescentes de β CD = 0; 0,5; 4,9 e 12 mmol L^{-1} . b) Esquema de redução da β -lapachona na presença de β CD.



Fonte: a) Extraído e b) adaptado de DE ABREU et al., 2007.

A ligação hidrogênio entre a hidroquinona eletrogerada com as hidroxilas secundárias da β -CD, não pôde ser comprovada por DE ABREU et al. (2007) na época da realização do trabalho por falta de uma técnica adequada. No entanto, uma das formas de comprovar esta interação é com o uso de monocamada auto-organizada (SAM) de β -ciclodextrina (a qual teve suas hidroxilas primárias substituídas por grupos SH) sobre um substrato metálico. Nesta SAM, a cavidade maior, que detém as hidroxilas secundárias (Figura 36a), fica desimpedida para a

entrada da quinona, excluindo a dúvida que a interação poderia ocorrer também com as hidroxilas primárias ou mesmo com a lateral do oligossacarídeo, visto que as moléculas de β CD-SH provavelmente estão distribuídas lado-a-lado no substrato metálico.

A técnica que hoje permite observar a interação acima discutida é PM-IRRAS, que tem sido utilizada para estudos nas interfaces água-ar e sólido-líquido em medidas eletroquímicas, sendo apropriada para a aquisição qualitativa de informações sobre a natureza, estrutura molecular, orientação e organização de filmes depositados sobre superfícies metálicas, tendo em vista as características vibracionais das monocamadas (RSH, $R(SH)_2$ e RS_2H) (MENDELSON et al., 2010; VIÉ et al., 2010; MAHO et al., 2011).

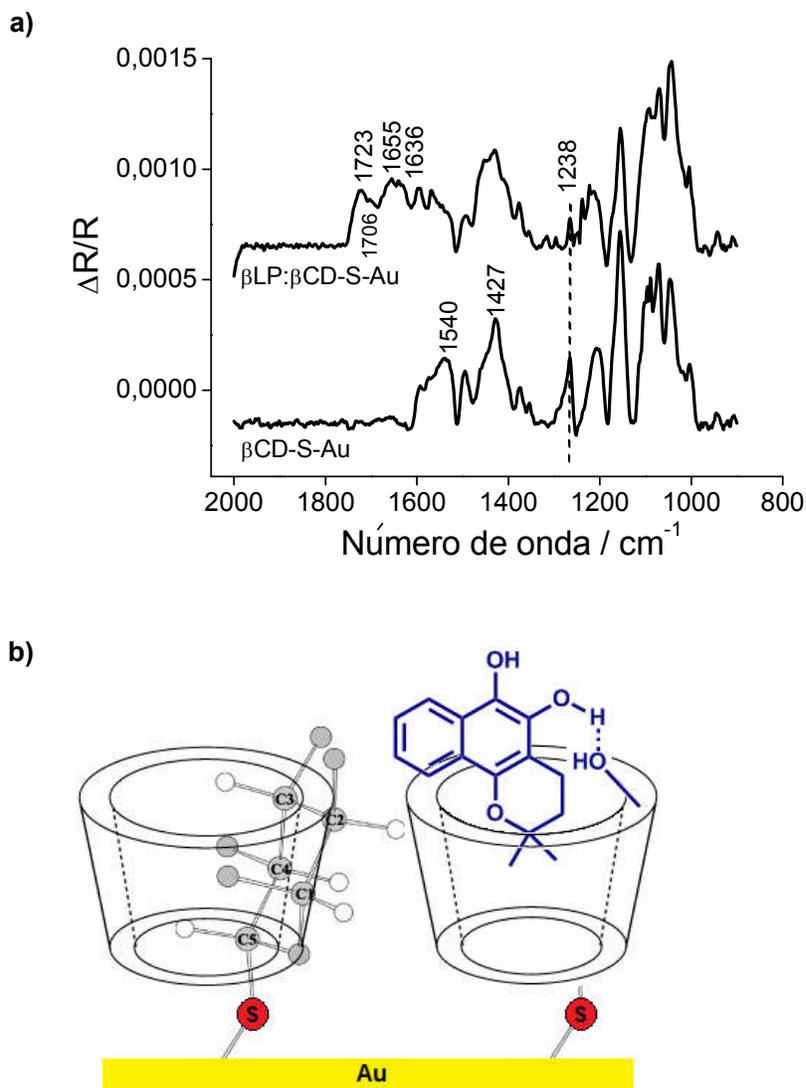
Na Figura 37a está representado o espectro de infravermelho da SAM de β CD-S-Au e da β -LP em SAM de β CD-S-Au (Figura 38b). O espectro da monocamada de ciclodextrina tiolada (β CD-S-Au) apresenta bandas em 1046, 1071 e 1093 cm^{-1} , atribuídas às vibrações de estiramento C–O–C; as bandas 1156, 1218, 1238, cm^{-1} são atribuídas à estiramento C–O; enquanto 1374, 1427, 1496, 1540, 1576 e 1592 cm^{-1} são atribuídos à deformação C–H.

Por comparação do espectro de β CD-S-Au com o espectro de β -LP: β CD-S-Au (Figura 37a), as alterações observadas foram: o aumento de intensidade da banda em 1238 cm^{-1} referente à ν = C–O; o aparecimento da banda em 1453 cm^{-1} , desaparecimento da banda em 1540 cm^{-1} bem como a definição das bandas 1567 cm^{-1} ambas atribuídas δ = C–H. Além dessas alterações, observa-se a banda em 1596 cm^{-1} que é referente à deformação axial C=C do anel da quinona.

A literatura relata (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005, p. 94) que quinonas que tem ambos os grupos carbonila no mesmo anel, como é o caso da β -LP, absorvem na região de 1690-1655 cm^{-1} . No entanto, neste espectro foram observadas bandas em 1655 e 1636 cm^{-1} . Antes de sofrer eletrorredução, a β -LP precisa se aproximar da cavidade de β -CD como relatado por DE ABREU et al. (2007) que por sua vez está ancorada na superfície do eletrodo; desta forma, a medida que a hidroquinona é formada, e se forma ligação hidrogênio com as

hidroxilas secundárias da β -CD, este fenômeno poderia provocar uma diminuição na frequência de absorção das carbonilas. E ainda, no espectro, foi observado bandas em 1723 e 1706 cm^{-1} relacionado a estiramentos assimétrico e simétrico respectivamente de C=O.

Figura37 -a) Espectro de PM IRRAS da β -LP em SAM- β CD-SH. b) Esquema representativo do encapsulamento de β -LP em SAM de β CD-SH.

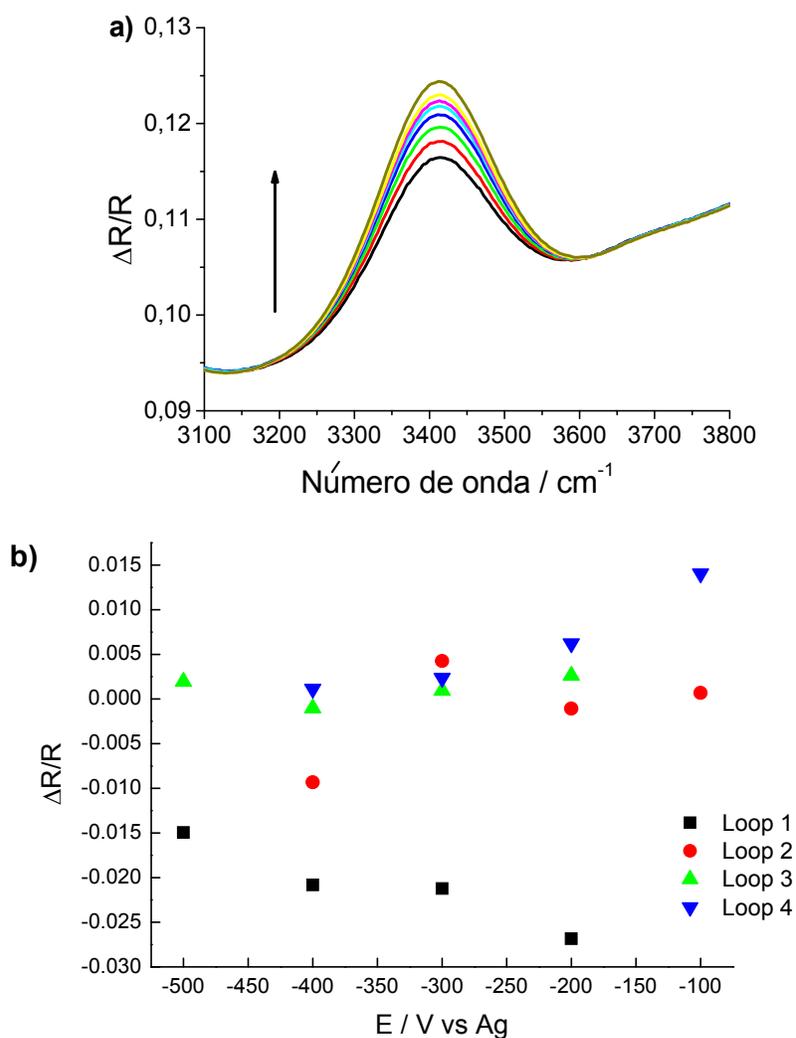


Fonte: Autora, 2013.

Depois de demonstrada a formação deste complexo por mais esta técnica, estudos espectroeletróquímicos (PMIRRAS + voltametria cíclica) foram realizados com o complexo em SAM- β CD-SH, em varredura na faixa de -0,10 a -0,50 V, com o intuito de comprovar a ligação hidrogênio sugerida por DE ABREU et al. (2007).

Após redução, a banda em 1723 cm^{-1} diminuiu com a varredura de potencial e conseqüentemente, uma banda em 3500 cm^{-1} aumentou, proporcionalmente (deformação OH). Entretanto, no primeiro *loop* (processo de oxidação), o efeito reverso não é observado, ou seja, a banda da ligação C=O não é regenerada, permanecendo constante a partir da 3ª varredura (Figura38). Já a banda de deformação OH permanece inalterada. Este comportamento comprova que a hidroquinona gerada é realmente estabilizada pela ciclodextrina.

Figura38 -a) Espectroeletróquímica do processo de oxidação da β -LP reduzida em SAM-CD-HS observado por PMIRRAS em tampão fosfato pH 7.4 + 5% EtOH. b) $\Delta R/R$ em função do potencial.



Também foram recolhidos espectros para o substrato metálico sem modificação, o qual foi imerso na solução da quinona, e como era de se esperar, não foi observada nenhuma banda referente aos grupos funcionais da quinona quando da aquisição do espectro, isto porque só é possível analisar grupos funcionais de moléculas que estejam ancoradas no substrato metálico. No caso da β -lapachona, é possível observá-la, pois esta interage com a β -CD. Isto é mais uma prova de que a ciclodextrina estava ancorada no substrato metálico via ligação covalente entre o enxofre e o ouro, e que a β -LP sofreu redução dentro da cavidade da β -CD.

4.1.6 Estudo da interação das quinonas (α -lapachona, β -lapachona e *nor*- β -lapachona) com o biossensor de DNA utilizando EQCM

Dentre a variedade de métodos e técnicas utilizadas para estudar danos causados ao DNA por substâncias tóxicas e poluentes ambientais, a microbalança de cristal de quartzo permite observar a interação de uma substância com o DNA através do aumento da massa depositada na superfície de um cristal de quartzo (SADIK; ALUOCH; ZHOU, 2009; NOWICKA et al., 2010). No presente trabalho, foi preparada uma monocamada auto-organizada (SAM) através da imobilização covalente do DNA dupla fita (dsDNA) sobre uma superfície de ouro através do método de montagem camada-por-camada em metodologia adaptada de Zhao et al. (1999).

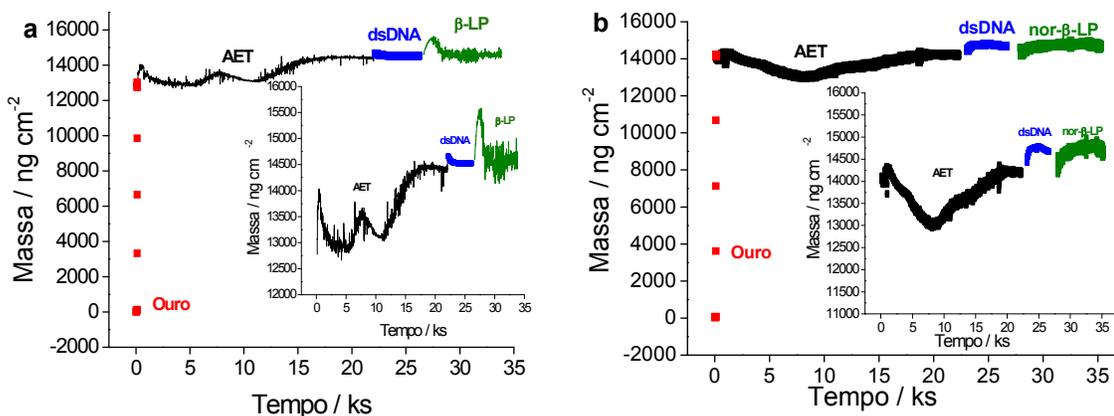
Na Figura 39, estão representados os massogramas (massa aparente) para as camadas depositadas sobre um cristal de quartzo recoberto com ouro e caracterizado por EQCM. Apesar do uso do mesmo substrato e do mesmo tiol na formação da SAM, é possível observar que o perfil do massograma para as três SAMs de AET é diferente. Vários são os motivos para este comportamento, como é o caso de *pinholes* (vales, defeitos) na camada de ouro depositado no cristal ou mesmo bolhas sobre a superfície do ouro, visto que como a cela da microbalança não é transparente, não se pode verificar a presença das mesmas na superfície do cristal. No entanto, resultados positivos foram obtidos, como é o caso da Figura 39a (preto) onde a SAM mostrou o melhor resultado, apresentando $9,04 \times 10^{15}$ moléculas de AET depositadas por cm^2 da superfície do ouro. A segunda melhor SAM de AET apresentou $3,05 \times 10^{15}$ moléculas de AET adsorvidas por cm^2 (Figura 39b), seguido

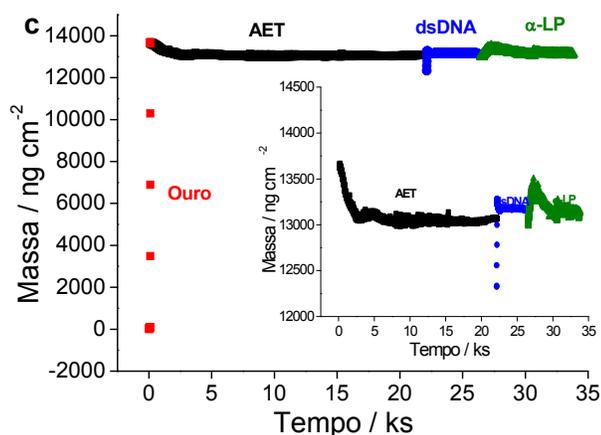
por $4,83 \times 10^{14}$ moléculas de AET por cm^2 depositadas na SAM, representada na Figura 39c.

A quantidade de moléculas de DNA ligadas à SAM de AET, também foi quantificada após a formação da SAM AET/dsDNA. A SAM que apresentou a melhor deposição de dsDNA foi a representada na Figura 39b (Tabela 2) com 0,25 moléculas de DNA por cm^2 admitindo que a massa molar para este DNA é de $6,6 \times 10^7 \text{ g mol}^{-1}$; seguida por 0,12 moléculas por cm^2 (Figura 39a, Tabela 2) e por último 0,09 moléculas de DNA por cm^2 (Figura 39c, Tabela 2). O motivo para a SAM de AET (Figura 39a) com melhor recobrimento do tiol não ter apresentado a melhor deposição de DNA, pode estar relacionada a um processo de lixiviação ou hidrólise do intermediário usado para favorecer a ligação fosforamida.

Já é sabido que *nor*- β -lapachona (*nor*- β -LP), β -lapachona (β -LP) e α -lapachona (α -LP) não interagem diretamente com DNA (DE SOUZA, 2011; DE MOURA, 2008). Este comportamento também foi observado quando as quinonas foram postas em contato com a SAM AET/dsDNA, onde o massograma manteve-se no mesmo patamar que o DNA (Figura 39a-c).

Figura 39 - Massogramas da formação de SAM AET/dsDNA e interação com as quinonas, a) β -LP; b) *nor*- β -LP; c) α -LP. Cristal de quartzo com cobertura de ouro em vermelho; 2-aminoetanotiol (AET) em preto; AET/dsDNA em azul e AET/dsDNA/quinona em verde. Inserção: massogramas ampliados para AET, dsDNA e quinonas.





Fonte: Autora, 2013.

Tabela 2 - Moléculas depositadas por cm²

Substância	AET	dsDNA	Interação
β -LP	$9,04 \times 10^{15}$	0,12	Não detectável
<i>Nor</i> - β -LP	$3,05 \times 10^{15}$	0,25	Não detectável
α -LP	$4,83 \times 10^{14}$	0,09	Não detectável

Fonte: Autora, 2013.

4.2 Mangiferina

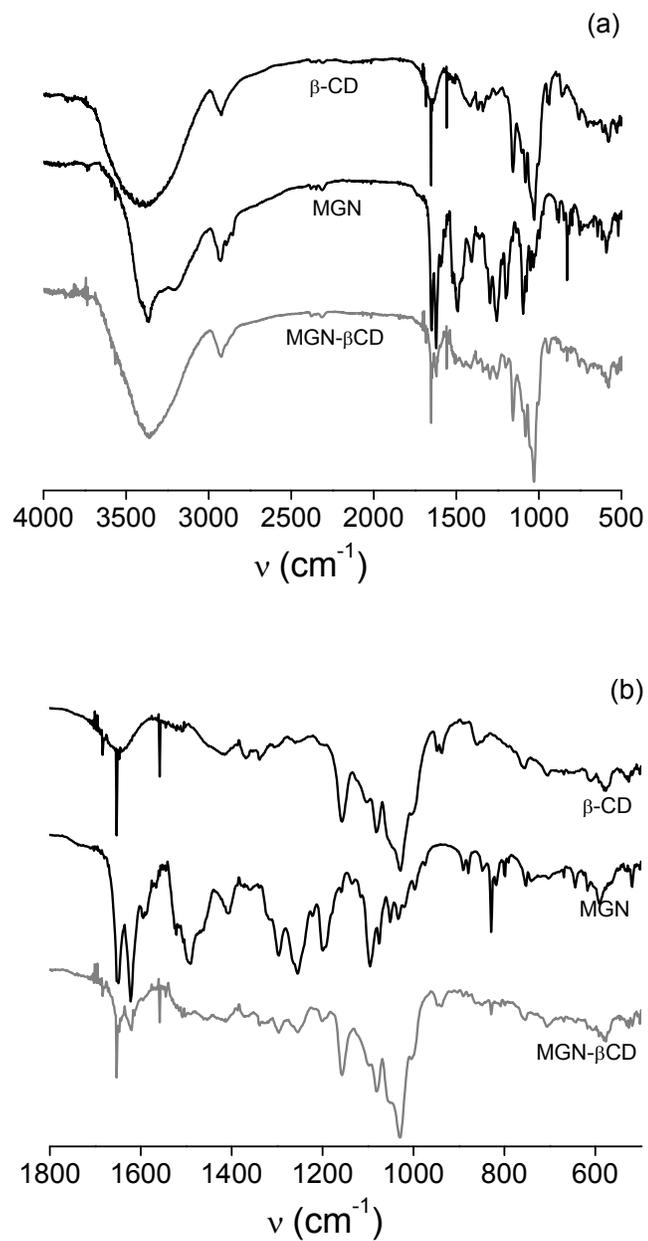
FERREIRA (2008) mostrou por meio de técnicas espectroscópicas e eletroquímicas que a interação de MGN com β -CD leva à formação de um complexo de inclusão estável, aumentando com isso a solubilidade no meio aquoso da xantona. FERREIRA et al. (2010), demonstrou ainda a constante de formação do complexo MGN: β -CD através do método de Benesi-Hildebrand ($K_F = 1.6 \pm 0.7 \times 10^5 \text{ Lmol}^{-1}$) e por voltametria cíclica ($K_F = 1.3 \pm 0.3 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}$). O que ainda não havia sido determinado, é como ocorre essa interação. Desta forma, as técnicas de FT-IR, DSC, ^1H RMN e PM IRRAS foram usadas neste trabalho, para determinar em solução aquosa (^1H RMN), na fase sólida (FT-IR e DSC) e sobre a superfície do eletrodo usando SAMs (PM IRRAS), como a inclusão deste composto fenólico na cavidade hidrofóbica de β -CD se procede.

4.2.1 Caracterização do complexo de inclusão MGN: β -CD por FTIR

FT-IR (infravermelho com transformada de Fourier) é uma das técnicas utilizadas para confirmar a formação de um complexo de inclusão. Os espectros de FT-IR de MGN, β -CD e do complexo de inclusão MGN: β -CD estão apresentados na Figura 40. O espectro de FT-IR de β -CD (Figura 40a) mostrou bandas de absorção em 3400 cm^{-1} ($\nu = \text{O-H}$), 2927 cm^{-1} ($\nu = \text{C-H}$) e bandas em 1157 , 1082 e 1028 cm^{-1} ($\nu = \text{C-H}$ e C-O), representados na Figura 40b. O espectro de FT-IR de MGN (Figura 40a) consiste de bandas de absorção em 3373 cm^{-1} ($\nu = \text{O-H}$) e 2933 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}} = \text{C-H}$). E na Figura 40b, observa-se para a MGN, a presença de um grupo carbonila conjugado a anel aromático em 1651 cm^{-1} , e bandas características de núcleo aromático (1622 , 1492 (C=C) e 1407 cm^{-1}). A ocorrência das bandas em 1255 e 1093 cm^{-1} no espectro, são atribuídas às vibrações de estiramento C-O e C-O-C , respectivamente (ABU-YOUSEF et al., 2011).

Por comparação do espectro do complexo com o espectro de β -CD e MGN (Figura 40), as maiores alterações observadas ocorreram na região 1800 a 500 cm^{-1} (Figura 40b). Algumas bandas de MGN desapareceram completamente (1492 , 1407 e 1093 cm^{-1}) ou tiveram suas intensidades alteradas (1651 , 1622 , 1296 , 1255 , 1199 e 829 cm^{-1}). No complexo, bandas em 1651 , 1622 e 829 cm^{-1} foram observadas. Estes dados mostram que MGN interage com β -CD e estão em concordância com os resultados publicados por FERREIRA et al. (2010).

Figura40 - a) Espectros FT-IR na região de 4000-500 cm^{-1} para β -CD, MGN e complexo de inclusão MGN: β CD obtido pelo método de coevaporação. b) Espectros de FT-IR na região de 1800-500 cm^{-1} para β -CD, MGN e complexo de inclusão MGN: β -CD obtido pelo método de coevaporação.



Fonte: Autora, 2013.

4.2.2 Caracterização do complexo de inclusão MGN: β -CD por DSC (Calorimetria de Varredura Diferencial)

A calorimetria de varredura diferencial pode ser usada para o reconhecimento de complexos de inclusão. Quando moléculas hóspedes são incluídas na cavidade de ciclodextrinas, seus pontos de fusão, ebulição ou sublimação, geralmente são deslocados ou mesmo desaparecem (LIU; ZHU, 2007). Os termogramas de MGN, β -CD e do complexo MGN: β -CD estão mostrados na Figura 41.

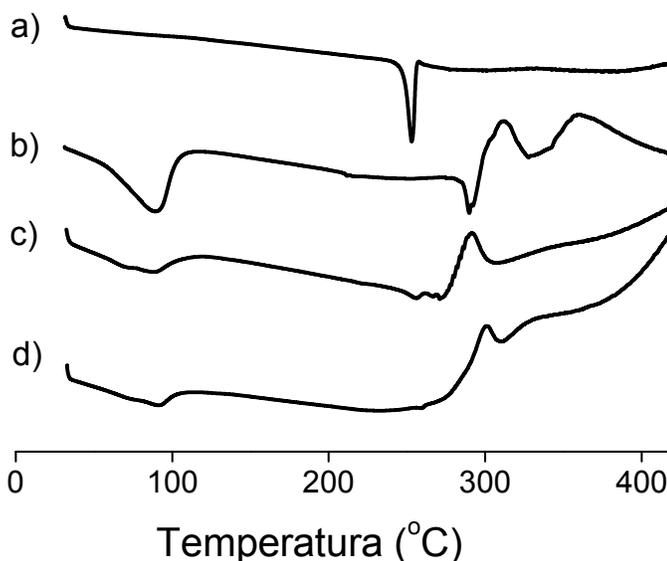
A curva DSC de MGN (Figura 41) exibiu um pico endotérmico fino em 252,6 °C, correspondente ao ponto de fusão da xantona, o que está de acordo com Neelakandan e Kyu (2009) que reportaram a temperatura de fusão de MGN em cerca de 260 °C, também usando a técnica de DSC. Após a fusão de MGN, a curva de DSC indica uma estabilidade térmica até 400 °C. No caso da β -CD (Figura 41b), um sinal largo endotérmico foi observado em torno 88,8 °C, correspondente a uma perda de água por evaporação ($t < 100$ °C). Também foi observado um sinal endotérmico fino próximo a 295 °C, que corresponde ao ponto de fusão da β -CD, seguido por efeitos endo-exotérmicos que estão relacionados com a degradação térmica do oligossacarídeo a 335 °C. Estes resultados concordam com dados da literatura (GIORDANO; NOVAK; MOYANO, 2001).

A curva DSC da mistura física (1:1) de MGN e β -CD (Figura 41c) foi uma sobreposição de componentes individuais de MGN e β -CD. O sinal endotérmico correspondente à fusão de MGN sofreu deslocamento de 252,6 °C para 255,2 °C, e a temperatura de fusão de β -CD foi reduzida de 335,0 °C para 271,4 °C.

A curva de DSC do complexo MGN: β -CD na razão molar 1:1 (Figura 41d) mostrou um pico endotérmico largo entre 80 °C e 100 °C correspondente a evaporação das moléculas de água absorvidas na estrutura e/ou inseridas na cavidade de β -CD. Analisando as curvas de DSC correspondentes à β -CD pura, mistura física e complexo MGN: β -CD, é possível observar que a quantidade de água presente em cada amostra é menor após a incorporação MGN na cavidade de β -CD. Para o complexo de MGN: β -CD foi observado que a fusão do pico endotérmico da MGN quase desapareceu, no entanto, um pequeno pico endotérmico ainda foi

detectado em 259,5 °C, estando deslocado de 6,9 °C do ponto de fusão da MGN pura o que confirma que a xantona foi incluída na cavidade de β -CD.

Figura 41 - Termogramas de DSC. a) MGN; b) β -CD; c) Mistura física e d) Complexo MGN: β -CD obtido pelo método de coevaporação.



Fonte: Autora, 2013.

4.2.3 Caracterização do complexo de inclusão MGN: β -CD por ^1H RMN

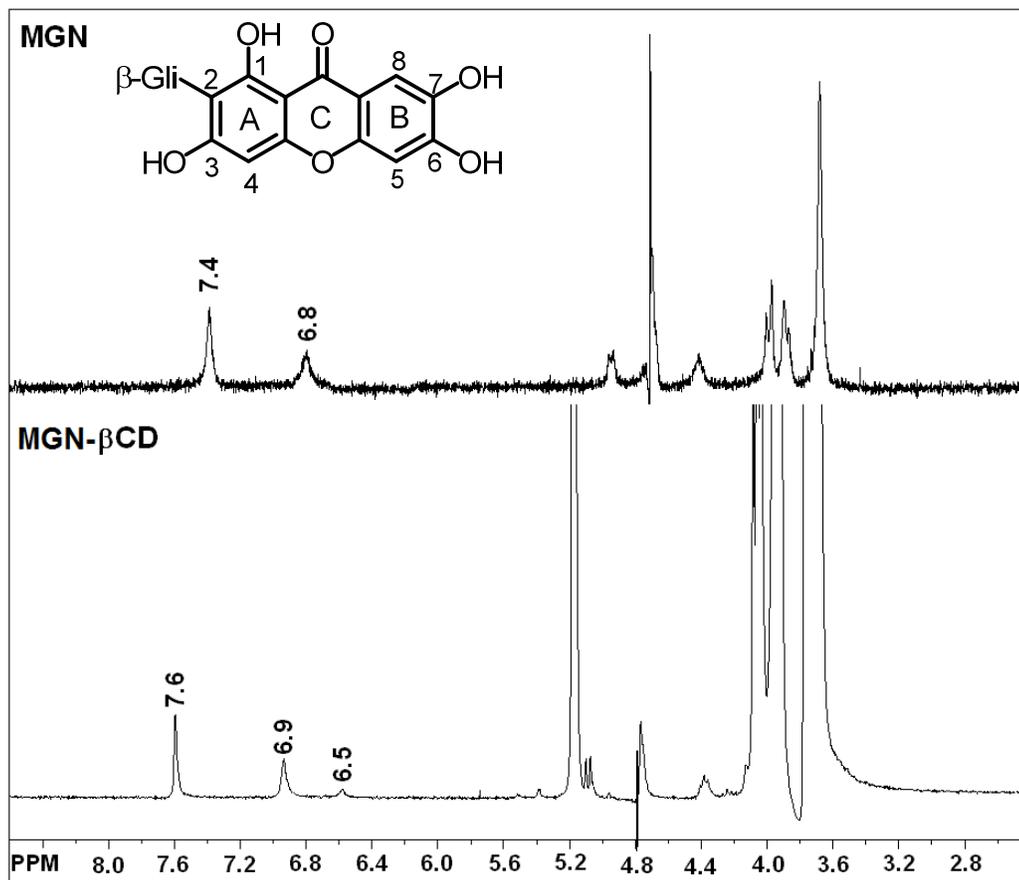
A espectroscopia de ^1H RMN é uma das técnicas mais úteis para estudar a estabilidade e estequiometria de complexos, incluindo sistemas hospedeiro-hóspede. A técnica de RMN permite a observação direta e detalhada de núcleos individuais relevantes para a estrutura e dinâmica do sistema (FERREIRA et al., 2010).

Em se tratando de complexos de inclusão com β -CD, a escolha do solvente utilizado na análise de RMN é crucial. Mangiferina apresenta baixa solubilidade em meio aquoso, por outro lado, é bem solúvel em DMSO. No entanto, DMSO forma um complexo de inclusão com β -CD (AREE; CHAICHIT, 2002), o que pode levar à expulsão de MGN da cavidade da β -CD. Por este motivo, FERREIRA et al. (2010) utilizaram D_2O para a análise do complexo por RMN.

Devido à complexidade dos sinais relacionados com a porção glicosídica, na região de 5,0-1,0 ppm, não foi possível analisar os deslocamentos químicos, sendo

possível analisar apenas a região a partir de 6 ppm. A Figura 42 mostra a comparação entre MGN e o complexo de inclusão MGN: β -CD. É possível observar que os sinais referentes aos H-5 e H-8 da MGN deslocaram de 7,4 para 7,6 ppm e 6,8 para 6,9 ppm, respectivamente, quando MGN se encontra complexada com β -CD, indicando que os sinais de hidrogênio aromáticos são influenciados pela presença de β -CD no meio. Isto indica que a complexação ocorre pelo anel B da xantona (Figura 42). Outro dado importante presente nos resultados, é o aparecimento de um sinal no espectro do complexo MGN: β -CD em 6,5 ppm referente ao H-4 (Figura 42). Isto ressalta o aumento da solubilidade da xantona, quando em presença de β -CD.

Figura 42 - Espectro de RMN ^1H para MGN livre e complexo MGN: β -CD (1:1) ambos em D_2O .



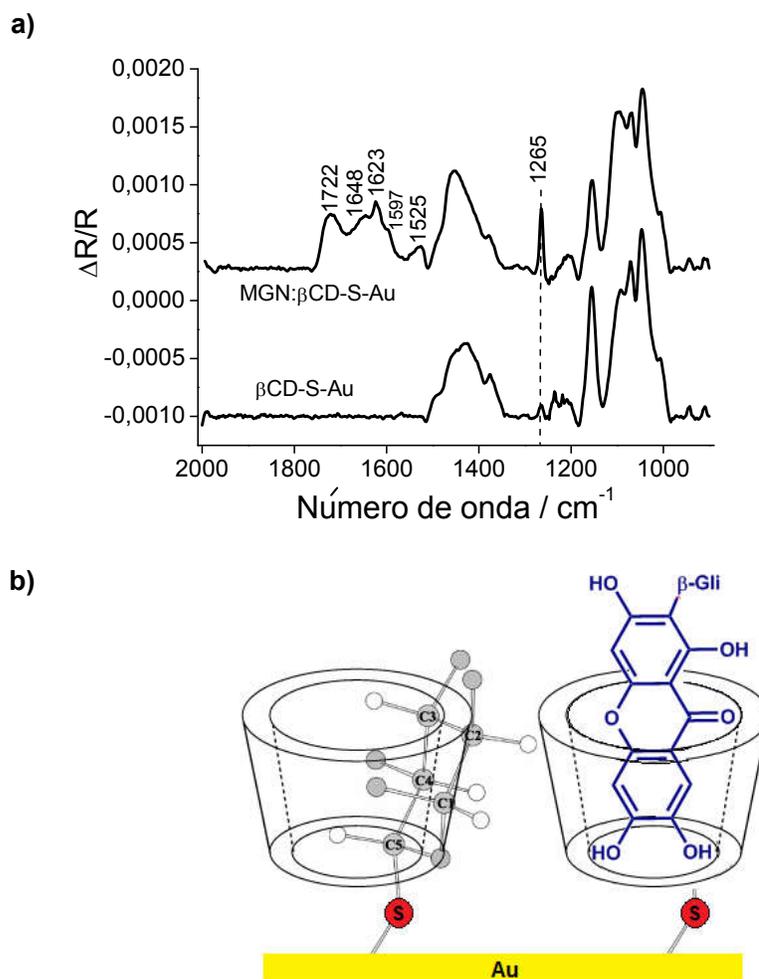
Fonte: FERREIRA et al. (2010), reprodução autorizada.

4.2.4 Espectroeletróquímica da interação entre a MGN e a SAM- β CD-HS usando PM IRRAS

A técnica de PMIRRAS foi utilizada para confirmar a presença do complexo de inclusão formado através da interação de MGN com ciclodextrina ancorada covalentemente a uma superfície de ouro. A Figura 43 mostra os espectros da superfície de ouro registrados antes e após a inclusão de mangiferina na SAM. O espectro da monocamada de ciclodextrina tiolada (β CD-S-Au) apresenta bandas em 1046, 1071 e 1093 cm^{-1} atribuídas às vibrações de estiramento C–O–C; as bandas 1156, 1218, 1237, 1265 cm^{-1} são atribuídas à ν =C–O; enquanto 1374 e 1428 cm^{-1} são atribuídos à δ =C–H.

Por comparação do espectro de β CD-S-Au com o espectro de MGN: β CD-S-Au (Figura 42), as maiores alterações observadas foram o aumento de intensidade da banda em 1265 cm^{-1} referente à ν =C–O, o aparecimento da banda em 1535 cm^{-1} referente à ν =C–O e as bandas em 1525 e 1597 cm^{-1} que correspondem a ν =C=C. A banda em 1623 cm^{-1} e outra de baixa intensidade em 1648 cm^{-1} correspondem a um grupo carbonila conjugado a um anel aromático em ligação hidrogênio intramolecular com a hidroxila no carbono 1 da MGN. Esta é uma ligação hidrogênio assistida por ressonância (CORRÊA, 2009). Além disso, também é observada outra banda em 1722 cm^{-1} referente à ν =C=O, isto então sugere, que quando da inclusão de MGN na cavidade de β CD-S-Au na interface aquosa, a ligação hidrogênio intramolecular da carbonila com a hidroxila no carbono 1 foi desfeita, provocando um aumento das frequências de absorção do grupo carbonila e duplas ligações.

Figura43 - a) Espectro de PM IRRAS de β -CD-SH e MGN: β CD-SH. b) Esquema representativo do encapsulamento de MGN em SAM de β CD-SH.



Fonte: Autora, 2013.

4.2.5 Avaliação da atividade antioxidante de MGN livre e complexada com β -CD

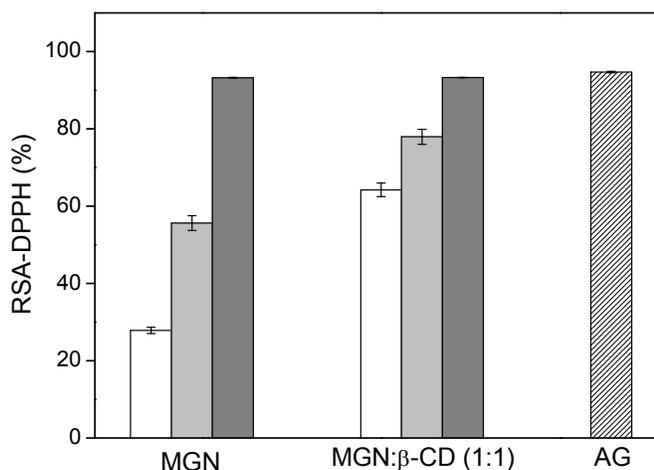
4.2.5.1 Atividade sequestradora do radical DPPH

FERREIRA (2008) mostrou a habilidade de β -CD em aumentar a atividade antioxidante de MGN principalmente em baixas concentrações do composto fenólico, devido ao aumento da solubilidade da xantona. Como apresentado na Figura44, a porcentagem da atividade sequestradora do radical DPPH[•] (RSA-DPPH[•] %) das amostras, comparado com o controle ácido gálico (AG). Nota-se que o complexo MGN: β -CD(1:1) mostrou uma atividade antioxidante maior quando comparado com sua forma livre, para as concentrações de MGN de 50 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$

¹. Como esperado, o AG foi mais efetivo. A maior concentração de MGN ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$) mostra um RSA-DPPH* (%) semelhante ao obtido para o AG ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$). A esta concentração, MGN está em excesso no meio consumindo todo o DPPH*.

Para o complexo MGN: β -CD (1:1) na concentração de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, o valor de RSA-DPPH (%) é aproximadamente 65%, enquanto que para sua forma livre, é de aproximadamente 28%. No caso do complexo a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, o valor de RSA-DPPH* (%) aumentou para 78%. O mesmo ensaio foi realizado com β -CD sozinha e nenhuma atividade antioxidante significativa frente ao DPPH* foi observada, em concordância com o descrito por LU et al. (2009).

Figura44 - a) Porcentagem de RSA-DPPH para MGN, complexo MGN: β -CD (1:1) e ácido gálico (AG). Tempo de reação com DPPH: 30 min. Para colunas de MGN, branco: $50 \mu\text{mol L}^{-1}$; cinza claro: $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ e cinza escuro: $500 \mu\text{mol L}^{-1}$. Ácido gálico: $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. DPPH: $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ só metanol. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.



Fonte: FERREIRA, 2012 (reprodução autorizada).

A atividade antioxidante de MGN é aumentada após complexação com β -CD, sendo este efeito mais pronunciado para a menor concentração de MGN ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$). Resultados como este, já foram observados por vários autores que observaram o aumento na capacidade antioxidante de polifenóis complexados com ciclodextrinas (ALVAREZ-PARRILLA et al., 2005). No entanto, o método utilizado para chegar a esta conclusão, foi o ensaio do DPPH* em 100% de metanol (2,7 mL DPPH* em metanol + 0,3 mL amostra). Alguns autores, por exemplo, Lucas-Abellán

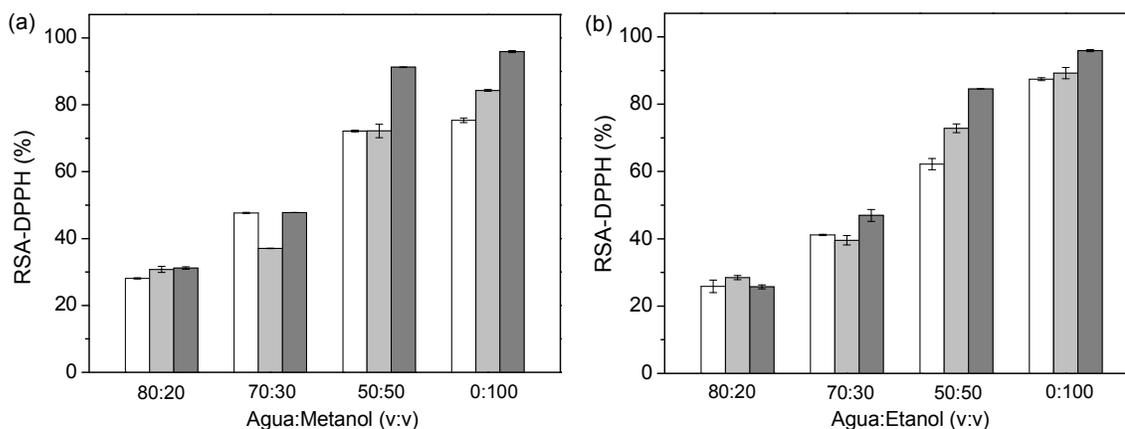
et al. (2011), criticam o uso de grandes quantidades de solvente orgânico quando se usa o ensaio do DPPH* para avaliar a atividade antioxidante de substâncias complexadas com ciclodextrina. Isto porque em solventes mais polares, o complexo pode ser desfeito em virtude da competição entre o solvente e a substância em análise pela cavidade da β -CD. Desta forma, no presente trabalho, a atividade antioxidante do complexo supracitado foi avaliada pelo método do DPPH* em meios com menor proporção de solvente orgânico descrito no tópico 4.2.5.2.

4.2.5.2 Estudo do efeito do solvente

O estudo do efeito do solvente para avaliar a atividade antioxidante de MGN, do complexo MGN: β -CD e do padrão AG foi executado, usando metanol-água e etanol-água em diferentes proporções como pode ser observado na Figura 45. As concentrações usadas foram $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ para MGN e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ para DPPH*.

Pode-se observar que não é possível usar uma porcentagem de solvente orgânico abaixo de 50%, porque DPPH* precipita no meio, devido à sua insolubilidade em água, como já descrito por LI et al. (2009).

Figura 45 - RSA-DPPH (%) das amostras como função do tipo e quantidade de solvente: a) metanol e b) etanol. Tempo de reação com DPPH: 30 min. Para colunas, branco: MGN $100 \mu\text{mol L}^{-1}$; cinza claro: complexo MGN: β -CD (1:1) e cinza escuro: ácido de gálico $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. DPPH: $50 \mu\text{mol L}^{-1}$. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.



Fonte: Autora, 2013.

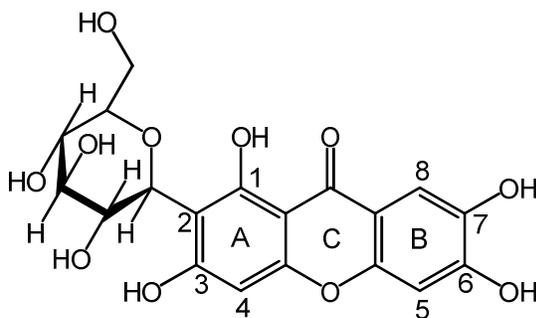
Apesar da crítica feita por Lucas-Abbellán et al. (2011), em nosso trabalho, foi observado que a atividade antioxidante do complexo MGN: β -CD aumenta com o aumento da quantidade de metanol e etanol, alcançando um máximo quando somente solvente orgânico é usado, sendo este aumento mais pronunciado para etanol.

Em virtude do exposto acima (seções 4.2.5.1e 4.2.5.2), surge um questionamento. Segundo Daret al. (2005) os grupos hidroxila nas posições 6 e 7 são os principais responsáveis pela atividade antioxidante de MGN, e se a complexação ocorre pelo anel B da MGN (seção 4.2.3), essas hidroxilas ficam protegidas dentro da cavidade da β -CD, então, como pode, a atividade antioxidante do complexo MGN: β -CD aumentar mesmo sendo avaliado em um meio tão hidrofóbico quanto o ensaio do DPPH? Para responder a esse questionamento, deve-se lembrar de que, quando em solução aquosa, o complexo de inclusão encontra-se em equilíbrio, podendo ser escrito como na equação 13:



e o DPPH é um radical volumoso, e não consegue se aproximar o suficiente para interagir com as hidroxilas 6 e 7 (Figura 46) quando MGN está na cavidade de β -CD. Desta forma, para reagir com DPPH, a MGN pode sair da cavidade da ciclodextrina (mantendo certa proximidade), sofrer o processo de oxidação e então a forma oxidada busca estabilidade na cavidade de β -CD.

Figura 46 - Estrutura numerada de Mangiferina.

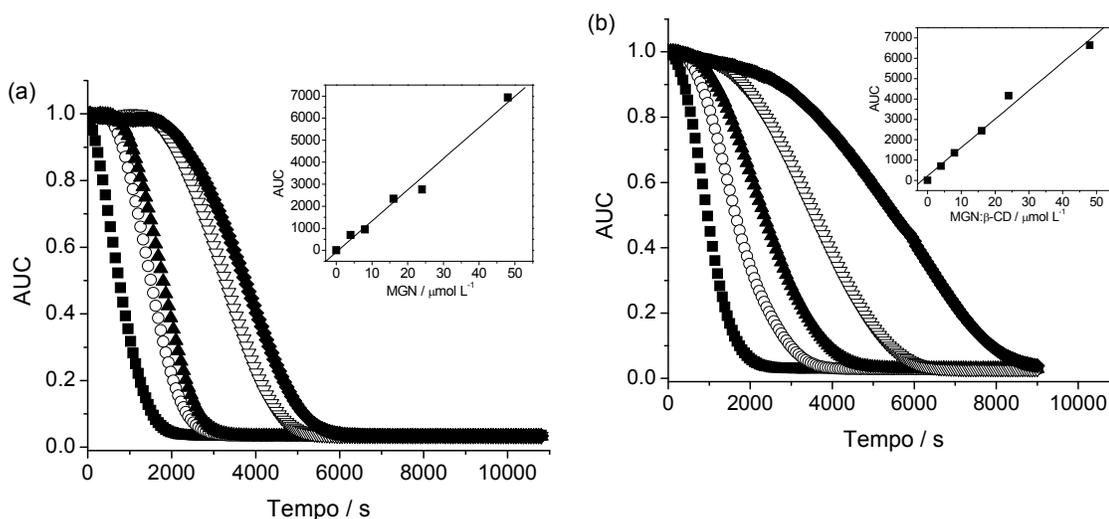


Para propósito de confirmação, outro método foi usado para quantificar a atividade antioxidante, por exemplo, ORAC (FOLCH-CANO et al., 2010).

4.2.5.3 Ensaio ORAC-fluoresceína (ORAC-FL)

Uma vez que a atividade antioxidante de MGN já está bem estabelecida, o propósito agora é demonstrar o efeito de sua inclusão na cavidade de β -CD, usando o ensaio ORAC-FL. A Figura 47 exibe os resultados em termos das áreas respectivas sobre a curva. Os perfis cinéticos obtidos para MGN livre (Figura 47a) foi menor que aqueles obtidos para o complexo MGN: β -CD (Figura 47b). Os valores de ORAC foram obtidos traçando o gráfico da área sobre a curva ($AUC_{líquida}$) versus a concentração de MGN livre ou complexada com β -CD (Figs. 47a e 47b, *insert*). O valor de ORAC foi calculado como indicado na seção 3.4.3, e os resultados mostraram que MGN livre tem um valor de ORAC de 2,3, isto é, 2,3 vezes melhor que o padrão trolox, enquanto o complexo MGN: β -CD mostra um valor de ORAC quinze vezes maior.

Figura 47 - a) curvas de ORAC-FL na presença de MGN na faixa de concentração 0-50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Insert: AUC vs. MGN concentração; b) curvas de ORAC-FL na presença do complexo MGN: β -CD na faixa de concentração gama 0-50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Insert: AUC vs. complexo MGN: β -CD.



Fonte: Autora, 2013.

Os resultados dos gráficos de ORAC-FL estão relacionados ao tempo no qual a sonda, neste caso, fluoresceína (FL), é protegida contra oxidação produzida por radicais peroxila, na presença de quantidades crescentes da molécula antioxidante. Para o complexo MGN: β -CD foi observada uma maior proteção, o que confirmamais uma vez que a atividade antioxidante de MGN é influenciada pela presença β -CD. LUCAS-ABELLÁN et al. (2011) e FOLCH-CANO et al. (2010) encontraramresultados semelhantes usando o ensaio ORAC, onde compostos fenólicos foram complexados em CDs. De acordo com LUCAS-ABELLÁN et al. (2011) ORAC é o melhor método para quantificar a atividade antioxidante de compostos fenólicos quando complexados em CDs, pois além de ser um método sensível, FL e AAPH não interferem na complexaçãode substratos com CDs.

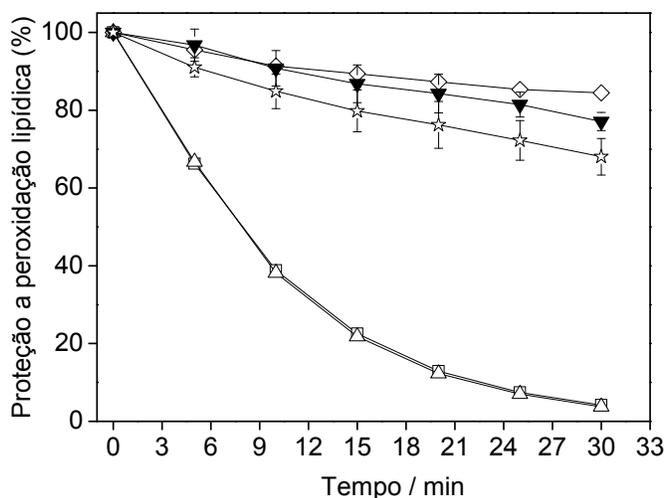
Apesar de o método ORAC ser adequado para medir a atividade antioxidante do complexo MGN: β -CD, ele não mostra a capacidade para inibir oxidação e peroxidação lipídica (NIKI, 2010). Assim, seguiremos avaliando o comportamento de MGN e do complexo MGN: β -CD pelo método de peroxidação lipídica.

4.2.5.4 Medidas de peroxidação lipídica

O efeito protetor de antioxidantes contra peroxidação de lipídios tem sidoextensivamente estudado (NIKI, 2010). A capacidade de sequestro de radicais livres por antioxidantes não está necessariamente correlacionada com a capacidade de inibição da peroxidação lipídica. Portanto, é essencial avaliar o efeito protetor de antioxidantes contra peroxidação lipídica.

A proteção da peroxidação lipídica foi avaliada usando um modelo de peroxidação lipídica em membrana mediado pelo radical peroxil (lipossomasunilamelares de lecitina desoja) como descrito na seção3.4.4. A Figura48apresentaum gráfico de proteção a peroxidação lipídica (%) em função do tempo (tempo total de 30 min) dos sistemas: tampão fosfato (controle negativo), β -CD (controle negativo), Trolox (controle positivo), complexo MGN: β -CD (1:1) e MGN. Lipossoma com C11-BODIPY^{581/591} e AAPH (gerador de radical peroxil) foramadicionados em todos os casos.

Figura48 - Proteção contra a peroxidação lipídica (%). (-★-) MGN ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$); (-▼-) complexo MGN: β -CD ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) e controle positivo (-◇-) Trolox ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$). (-□-) Tampão fosfato e (-△-) β -CD usados como controles negativos.



Fonte: Autora, 2013.

A peroxidação lipídica lipossomal induzida por AAPH foi observada na ausência de antioxidantes (controles negativos, Figura 48). A habilidade antioxidante do trolox é bem conhecida e inibe a peroxidação lipídica. Ensaios de peroxidação lipídica mostraram que MGN e o complexo MGN: β -CD apresentam efeitos protetores na membrana tanto quanto trolox, este resultado é diferente de outros reportados na literatura que mostram que a complexação entre o substrato e CDs podem diminuir habilidade antioxidante, como observado para carotenóides por POLYAKOV et al. (2004). O efeito protetor aqui evidenciado é relevante, visto que a inclusão de MGN na cavidade de β -CD favoreceu a proteção da membrana.

4.3 Biossensores de DNA – comportamento eletroquímico e eletroforese

Danos estruturais ao DNA são resultado de suas interações com agentes físicos ou químicos do ambiente ou são produzidos como um produto do metabolismo. Os principais tipos de danos ao DNA são representados pela quebra da cadeia de fosfato, liberação de bases por hidrólise de ligações *N*-glicosídicas e diferentes rompimentos de nucleobases como resultado de reações de oxidação, alquilação, dentre outras (HLAVATA et al., 2012).

É de importância fundamental averiguar o potencial de moléculas que se ligam ao DNA, de causarem danos à biomolécula (DE ABREU et al., 2008). Apesar de as quebras na fita de DNA serem basicamente identificadas por técnicas eletroforéticas (HLAVATA et al., 2012), biossensores eletroquímicos de DNA (cujo elemento de reconhecimento biológico é o DNA, imobilizado sobre um transdutor eletroquímico - eletrodo), constituem ferramentas valiosas para detectar o modo de interação entre pequenas moléculas como fármacos e espécies carcinogênicas com o ácido nucléico imobilizado sobre superfície eletródica, além de auxiliar na elucidação dos mecanismos biológicos de ação de fármacos ou candidatos a fármacos (BRETT; CHIORCEA, 2003; DE ABREU et al., 2008; DOGAN-TOPAL et al., 2009; DE SOUZA, 2011).

Em meio ácido (pH 4,5), a oxidação eletroquímica do DNA em eletrodo de carbono vítreo através da técnica de voltametria de pulso diferencial, apresenta dois picos de oxidação referentes às bases púricas (guanina e adenina), sendo as bases pirimídicas (timina e citosina) eletroinativas nestas condições (BRETT et al., 1999; DE MOURA, 2008; DE SOUZA, 2011)

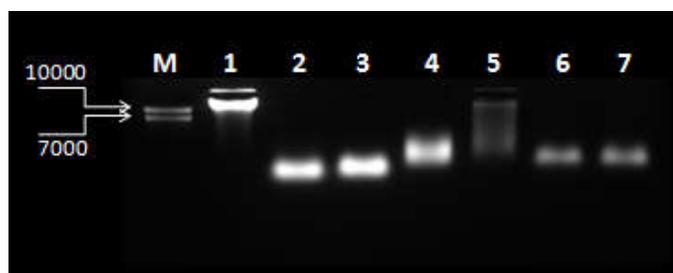
O *dsDNA* e *ssDNA*, apresentam comportamento eletroquímico distintos. O *dsDNA* apresenta uma estrutura rígida devido às ligações hidrogênio formadas entre suas bases; por este motivo, apresenta grande dificuldade de transferência de elétrons de sua parte interna para a superfície do eletrodo. Conseqüentemente, os picos de oxidação destas bases apresentam baixas intensidade de corrente ou quase nulas. Quando porventura, ocorre interação de substâncias com o *dsDNA*, as bases são expostas à superfície do eletrodo e, tornam-se passíveis de oxidação, apresentando desta forma, maiores intensidades de corrente. O *ssDNA*, por outro lado, se encontra em uma forma flexível, desta forma, suas bases estão mais suscetíveis a processos de oxidação e, portanto, apresenta correntes de pico de alta intensidade em relação ao *dsDNA*. Quando uma substância interage com essas bases expostas, é observado uma menor intensidade de corrente (LA-SCALEA, SERRANO; GUTZ, 1998; DICULESCU, PAQUIM; BRETT, 2005; DE MOURA, 2008; DE SOUZA, 2011)

O método ácido-base utilizado no preparo do *ssDNA* para uso em biossensores de *ssDNA* (dissolvendo *dsDNA* em HCl 1,0 mol L⁻¹ com subsequente

aquecimento seguido por neutralização com NaOH 1,0 mol L⁻¹ -seção 3.7.2), utilizado por nosso grupo de pesquisa, pode ser criticado por ser considerado um método agressivo. Isto porque, pode levar à formação de não apenas ssDNA, mas também de uma mistura de ácidos apurínicos, nucleobases e outros produtos de hidrólise. Em parte, isto é verdade, no entanto, o método utilizado para o preparo de ssDNA, já foi muito mais agressivo. BRETT, SERRANO e PIEDADE(1999, p. 101), reportaram o preparo de ssDNA, tratando a amostra de dsDNA com ácido perclórico 60% e após a dissolução, NaOH 9,0 mol L⁻¹ era imediatamente adicionado para neutralizar a solução, seguido por diluição em tampão acetato pH 4,5.

A fim de esclarecer a dúvida em relação aos produtos formados, e se o ssDNA utilizado em nosso grupo, nos leva a dados confiáveis, experimentos de eletroforese foram realizados em condições similares aos usados para a análise eletroquímica. Desta forma, corridas eletroforéticas (Figura49) foram feitas com dsDNA (1), ssDNA (2), e dsDNA que passou por vários tratamentos (tratamento térmico a diferentes temperaturas (3 e 4) e tratamentos ácido-base sem e com aquecimento a 95°C (5, 6 e 7)) no intuito de produzir ssDNA.

Figura49 - Gel de agarose para eletroforese de DNA. Pista M: marcador de DNA 1kb; Pista 1 dsDNA de timo de bezerro (Sigma, D1501); Pista 2: ssDNA de timo de bezerro (Sigma, D8899); Pista 3: dsDNA após tratamento térmico por 60 min; Pista 4: dsDNA após tratamento térmico por 30 min; Pista 5: dsDNA após tratamento ácido-base sem aquecimento; Pista 6: dsDNA após tratamento ácido-base com tratamento térmico por 60 min; Pista 7: dsDNA após tratamento ácido-base com tratamento térmico por 30 min. As amostras foram corridas, usando gel de agarose a 1%, a 70 V por 40 min.

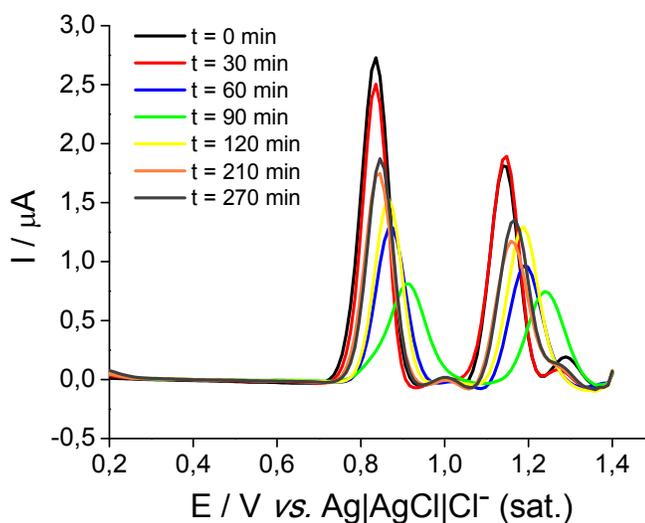


Fonte: Autora, 2013.

Pela eletroforese observa-se que pelo tratamento térmico a diferentes temperaturas (pistas 3 e 4), é possível obter ssDNA em tamanho que corresponde ao ssDNA de timo de bezerro (Sigma, D8899 – pista 2). No entanto, este ssDNA não apresenta um comportamento eletroquímico adequado (Figura50), visto que com o

passar do tempo (até 90 min após o tratamento térmico), ocorre diminuição e deslocamento do potencial de pico anódico correspondente às bases guanina e adenina, sugerindo um re-anelamento das simples fitas. Em seguida, ocorrem aumento do potencial de pico e deslocamento em sentido catódico. Este comportamento pode levar a uma análise de interação substância/DNA falso-positiva.

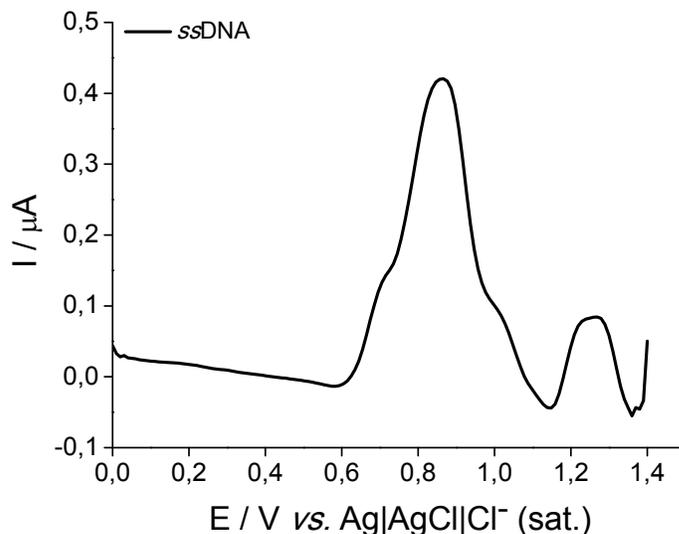
Figura50 - Voltametria de Pulso Diferencial de 0,3 mg mL⁻¹ de DNA, em tampão acetato pH = 4.5, após tratamento térmico (60 min) em função de tempo, em um eletrodo de carbono vítreo. Amplitude de pulso 50 mV; largura de pulso 70 ms; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autora, 2013.

Além dos resultados supracitados, o uso de ssDNA comercialmente disponível (Figura 51), apesar de produzir um sinal analiticamente viável (guanina em 0,86 V e adenina 1,25 V) é impraticável pelo preço extremamente elevado da substância química, onde 5,0 mg chega a custar R\$ 500,00.

Figura51 - Voltametria de Pulso Diferencial de ssDNA (timo de bezerro) em tampão acetato pH = 4.5. Eletrodo de carbono vítreo. Amplitude de pulso 50 mV; largura de pulso 70 ms; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autora, 2013.

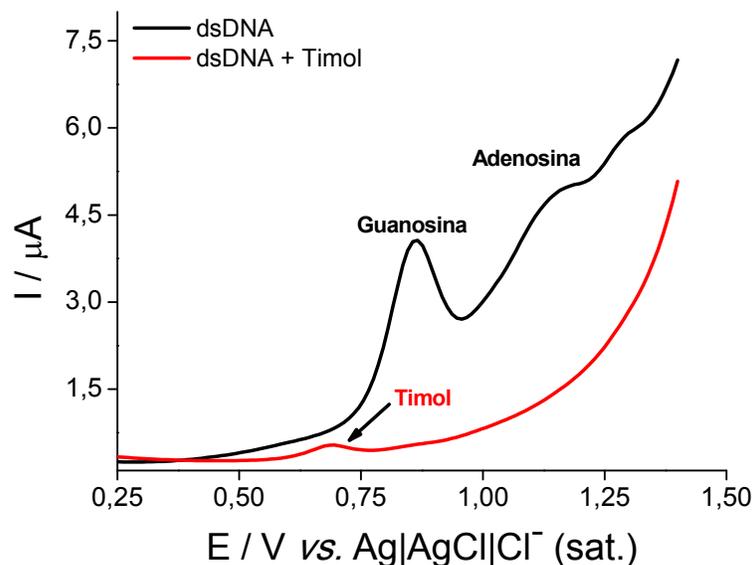
A comparação dos resultados (Figura49, 50 e 51), nos permitiu escolher a melhor técnica de produção de ssDNA para uso no estudo eletroquímico (tratamento ácido-base + tratamento térmico durante 60 minutos, como descrito na seção 3.7.3) e mostrar que embora possamos ter como produto de reação ácido apurínico, nucleobases e outros produtos de hidrólise, há sim ssDNA e o tratamento ácido-base com aquecimento é útil, simples, barato e completamente reproduzível, como observado pela altura de correntes de pico anódico, em mais de cem experimentos, executados por nosso grupo, em triplicata. Isto nos permite decidir sobre a presença ou ausência de interação, relacionando a diminuição das alturas da corrente de pico relacionadas à oxidação das bases guanina e adenina.

4.4 Estudo da interação de Timol com biossensor de DNA utilizando VPD, EQCM e SECM

Timol é uma substância de interesse biológico, utilizado na indústria, mas que além da atividade antioxidante, apresenta efeitos genotóxico e clastogênico dependentes da concentração (ÜNDEGER et al., 2009), e neste trabalho, o biossensor eletroquímico de DNA foi utilizado para observar a interação deste fenol com DNA. Na Figura 52, estão representados os voltamogramas de pulso diferencial do biossensor de *dsDNA*, na região anódica e quando em presença de timol. É possível observar que o *dsDNA* apresenta picos de oxidação, acentuado principalmente para guanina. Apesar da rigidez da dupla fita de DNA, e ser esperado a não observação destes picos de oxidação para o *dsDNA*, este comportamento, pode estar relacionado a modificações na conformação ou reorientação da dupla fita durante imobilização na superfície do eletrodo ou mesmo degradação (LA-SCALEA, SERRANO; GUTZ, 1998; DICULESCU, PAQUIM; BRETT, 2005).

O timol sofre processo de oxidação ($E_{p_a} = + 0,69 \text{ V}$) em potencial anterior às bases do DNA, e é um fenol conhecido em nosso grupo de pesquisa (FERREIRA, 2009), por sua capacidade em passivar a superfície eletródica em virtude de sua polimerização. Era esperado que os picos de oxidação das bases do *dsDNA* aumentassem de intensidade quando em presença de timol (Figura 52), no entanto, desapareceram, implicando que a passivação da superfície do eletrodo provocada pela polimerização do timol, encobriu a possível interação deste fenol com a dupla fita.

Figura 52-a) Voltamogramas de pulso diferencial de *dsDNA*; *dsDNA* + timol ($1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹). Tampão acetato pH = 4,5. Amplitude de pulso 50 mV; largura de pulso 70 ms; $v = 10$ mv s⁻¹.

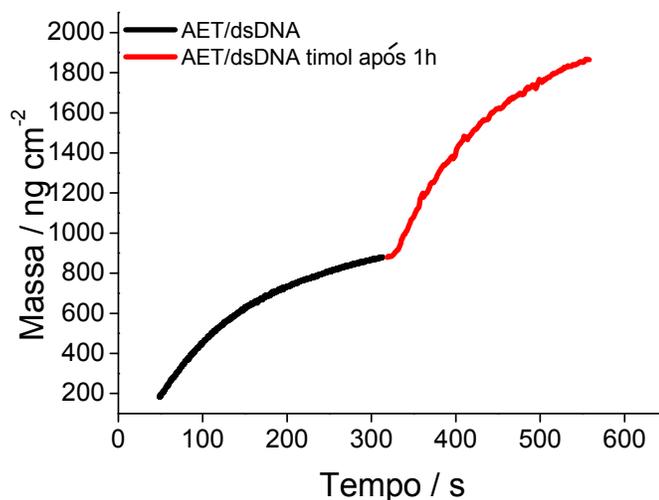


Fonte: Autora, 2013.

A fim de eliminar o efeito da passivação do biossensor de *dsDNA* pelo timol, a interação de timol com DNA foi avaliada através das técnicas de microbalança a cristal de quartzo (QCM sem aplicação de potencial) e microscopia eletroquímica de varredura (SECM).

O gráfico de variação da massa em função do tempo para uma monocamada auto-organizada de *dsDNA* está representado na Figura 53. Após a formação da SAM de aminoetanotiol (AET), a mesma foi posta em contato com uma solução de *dsDNA*, sendo possível observar um aumento da massa em função do tempo de contato (curva em preto) chegando a um patamar quase constante onde $0,33$ moléculas de DNA por cm^2 foram depositadas no cristal. A curva em vermelho, por sua vez, mostra o aumento da massa em função do tempo quando da interação de timol com a SAM de AET/*dsDNA* após 1h de contato. Após a adição de timol, $3,95 \times 10^{15}$ moléculas de timol por cm^2 interagiram com o DNA previamente depositado no cristal. Estes dados indicam que timol interage com a dupla fita do DNA e conseqüentemente aumenta a massa depositada no cristal de quartzo.

Figura53 - Gráfico de massa em função do tempo da interação de timol com dsDNA, utilizando EQCM.



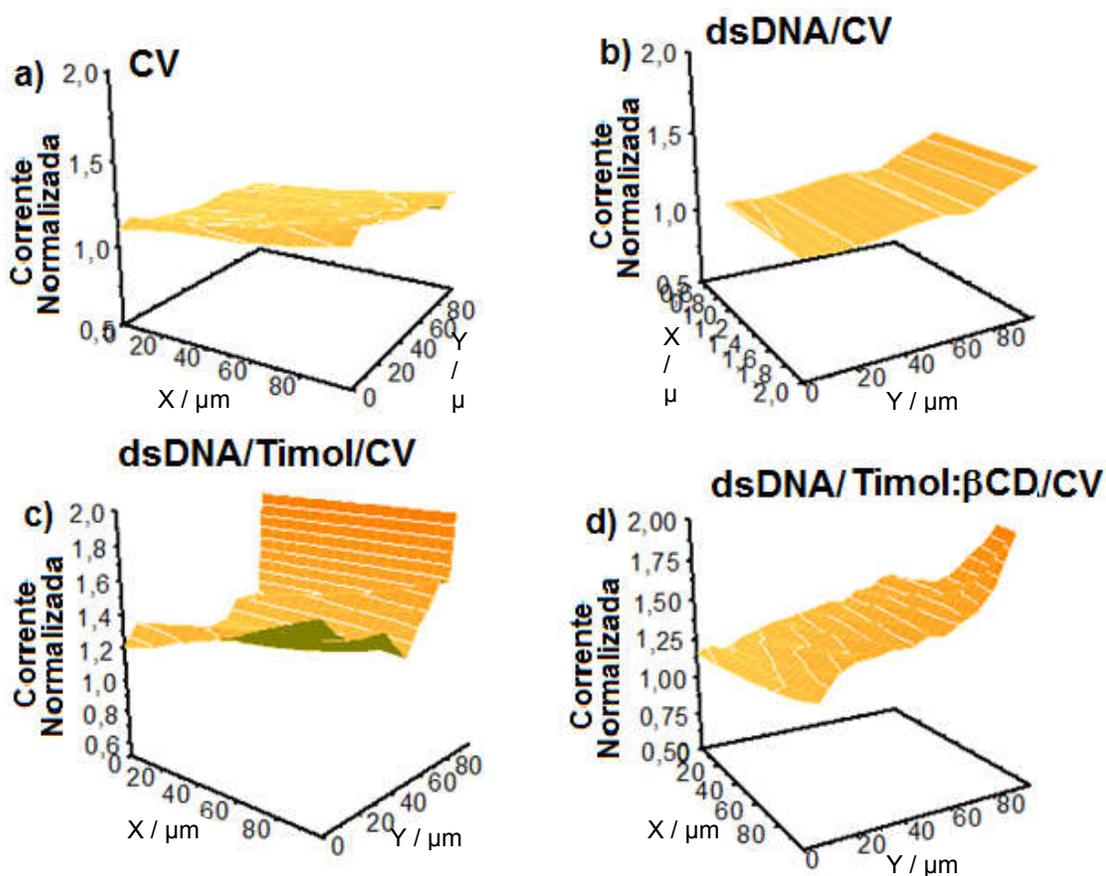
Fonte: Autora, 2013.

A microscopia eletroquímica de varredura (SECM) tem sido extensivamente usada nos últimos anos, pois permite usar a ponta do ultramicroeletrodo para obter imagens de diferentes superfícies do substrato imerso em uma solução eletrolítica, com uma resolução micrométrica. No presente estudo, SECM também foi utilizada para observar a interação eletroquímica entre uma camada de dsDNA e timol, sendo possível obter imagens da superfície deste biossensor antes e após a interação com timol.

Na Figura54 está representada a superfície de um eletrodo de carbono vítreo sem modificação (Figura54a) e modificado com dsDNA na ausência (Figura54b) e presença de timol (Figura54c) e do complexo timol:β-CD (Figura54d). É possível observar que o carbono vítreo (CV) e dsDNA/CV apresentam uma atividade eletroquímica homogênea, sendo que o CV mostra-se um típico substrato com comportamento condutor, com valores de corrente de 1,25 vezes a corrente de estado estacionário. Quando dsDNA está presente na superfície do CV a corrente normalizada diminui de 1,25 para 1,0. Este comportamento é compatível com um feedback negativo entre a ponta do ultramicroeletrodo e o substrato indicando que dsDNA parcialmente bloqueia a resposta eletroquímica do mediador redox ferrocenometanol (FcOH).

Quando timol está presente em dsDNA/CV (Figura54c), as imagens mostram que a corrente normalizada aumenta drasticamente em determinadas regiões. Este comportamento pode ser explicado pela desorganização da camada de dsDNA provocada pela interação com o timol. Em contrapartida, quando dsDNA/CV está em presença do complexo timol: β -CD (Figura54d) a condutividade mostrou-se próxima à do filme de dsDNA, indicando uma menor interação com a macromolécula de DNA. Estes resultados estão de acordo com o estudo da interação de timol com dsDNA, realizado através de voltametria de pulso diferencial e microbalança de cristal de quartzo.

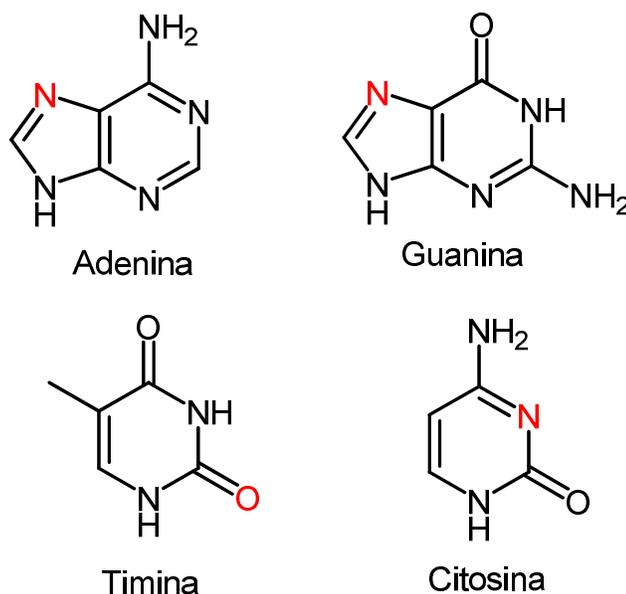
Figura54 - Imagens da corrente limite da oxidação de FcOH em: a) carbono vítreo (CV); b) dsDNA/CV; c) dsDNA/CV em presença de timol ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$); d) dsDNA/CV em presença de timol: β CD (1:1). Tampão acetato pH = 4,5.



Fonte: Autora, 2013.

NAFISlet al. (2004) determinaram que os sítios de interação do timol com a dupla fita de DNA ocorre através de ligação hidrogênio entre o grupo hidroxila do fenol, principalmente com os átomos N7 da guanina e N3 da citosina. Ligações hidrogênio também ocorrem com os átomos O2 da timina, N7 da adenina (Figura 55) e em altas concentrações de timol, também ocorre interação com esqueleto fosfato.

Figura 55 - Estrutura de adenina, guanina, timina e citosina com destaque para os átomos que se ligam através de ligações hidrogênio com o timol.



Fonte: Autora, 2013.

Apesar de termos certeza que a interação de timol com a dupla fita de DNA é efetiva (trabalho de NAFISlet al., 2004 e resultados experimentais deste trabalho anteriormente citados), as técnicas utilizadas por nosso grupo até então, não nos permitiram avaliar qual seria o sítio de interação. Desta forma, a interação de timol com DNA foi ainda avaliada utilizando biossensor de ssDNA em solução. Na Figura 56, está representado o voltamograma de pulso diferencial de ssDNA em solução (preto), caracterizado por duas ondas anódicas bem definidas de alta intensidade de corrente, referentes à oxidação das bases púricas, guanina e adenina, em potenciais de +0,90 V e +1,25 V, respectivamente. Assim, a presença de reação eletrofílica com moléculas DNA-reativas repercute em alterações nas correntes de pico e/ou potenciais de oxidação destas bases.

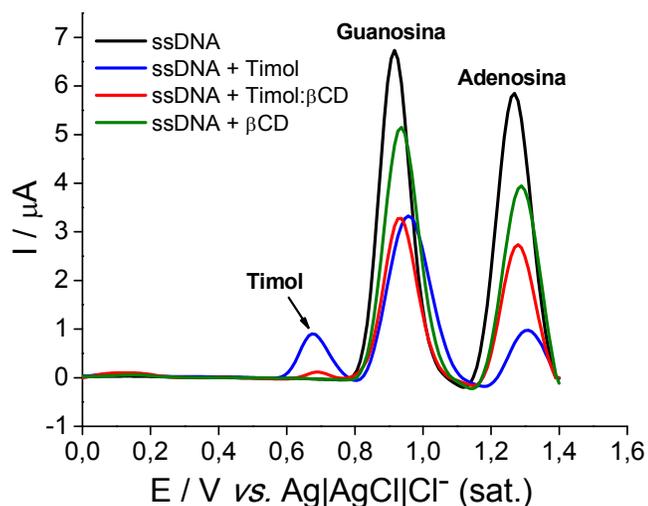
Quando em presença de ssDNA, o timol (em azul) provoca uma diminuição em torno de 50% da corrente de pico anódica da guanósina e 85% na corrente de pico da adenosina (Figura56), ambas acompanhadas por deslocamento no potencial de pico para potenciais mais positivos. Este resultado sugere que um dos principais sítios de ataque do timol à simples fita de DNA é a adenosina.

É bem reportado na literatura, que ciclodextrinas possuem uma habilidade especial para complexar diversas substâncias, o que lhes permite aumentar a solubilidade, melhorar a estabilidade e também diminuir a toxicidade (DEL VALLE et al., 2004; CARRIER; MILLER; AHMED, 2007). Tendo em vista este último efeito, resolvemos avaliar a interação de β -ciclodextrina (β -CD) e do complexo timol: β CD com ssDNA.

Na Figura56, está representado em vermelho o voltamograma de pulso diferencial do complexo timol: β -CD frente ao ssDNA. É possível observar, que a interação de timol encapsulado com as bases púricas é menor, não havendo deslocamento nos potenciais de pico, e diminuindo principalmente a interação de timol com a adenosina em 30%. MULINACCI et al. (1996), propuseram um modelo de inclusão que foi confirmado por modelagem molecular e ^1H RMN-NOE. Eles mostraram que no complexo formado, a hidroxila fenólica, seu principal grupo funcional, está próxima às hidroxilas secundárias do oligossacarídeo, formando então ligação hidrogênio. Isto nos leva a concluir que quando encapsulado, o timol fica parcialmente indisponível para interagir com os sítios ativos do DNA, o que diminui sua toxicidade.

Avaliamos também, por voltametria de pulso diferencial, a interação de β -CD com ssDNA. Na Figura56, em verde, pode-se observar que há uma diminuição de 23% da corrente de pico da guanósina e 41% da corrente de pico da adenosina. Isto pode ser devido à formação de ligação hidrogênio entre o oligossacarídeo e a simples fita de DNA. No entanto, apesar desta interação, a β -CD não deixa de proteger a fita simples do ataque de timol, como pode ser observado no voltamograma em verde.

Figura56 - a) Voltamogramas de pulso diferencial de ssDNA (preto); ssDNA + timol ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) (azul); ssDNA + timol: β -CD (vermelho) e ssDNA + β -CD (verde). Tampão acetato pH 4,5. Amplitude de pulso 50 mV; largura de pulso 70 ms; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$. Tempo de contato 1h.



Fonte: Autora, 2013.

Aydin et al.(2005) e Ündeger et al. (2009) reportaram que timol induz quebra na fita de DNA em concentrações acima de $50\text{-}100\mu\text{mol L}^{-1}$, causando efeito clastogênico ao DNA. Neste trabalho, os dados obtidos por voltametria de pulso diferencial utilizando biossensor de *ds*DNA e ssDNA em solução, juntamente com QCM e SECM mostraram que timol, mesmo em uma concentração cinco vezes menor, interage fortemente com DNA a ponto de causar quebras à dupla hélice e quando em presença de ssDNA a interação é maior com a base adenina.

5 CONCLUSÕES

Os estudos eletroquímicos das quinonas em meio prótico e aprótico, permitiram observar que a redução das mesmas ocorre através de um mecanismo de redução típico de quinonas, com reações químicas acopladas, principalmente em relação à segunda onda de redução, em meio aprótico.

A segunda onda de redução observada para as quinonas deve estar relacionada à redução da semiquinona ao diânion correspondente ou, diante da presença de reação química acoplada ao processo eletroquímico, a redução da quinona regenerada por desproporcionamento no caso das *orto*-quinonas, e comproporcionamento no caso das *para*-quinonas. Em meio prótico foram observados problemas relativos à estabilidade das quinonas *o*-QFu-*p*-Me e *o*-QFu-2,4-DiMe, as quais apresentaram mais de uma onda de redução no meio trabalhado. As *para*-quinonas por sua vez mostraram baixíssima solubilidade no meio aquoso.

Estudos eletroquímicos realizados para a *nor*- α -lapachona, *nor*- β -lapachona e derivados evidenciaram que seus produtos da redução interagem com oxigênio de acordo com um mecanismo EC, no qual se produz a quinona original e o radical peroxila. Este fato suporta a possível intermediação de ERO no mecanismo molecular de ação citotóxica em células cancerosas das quinonas estudadas. O mecanismo mencionado acima é uma consequência do potencial de redução dos compostos, os quais se encontram em uma faixa ótima para transferência de elétrons ao oxigênio, desencadeando as atividades biológicas com base no desbalanço redox. As *orto*-quinonas mostraram uma boa correlação entre a atividade citotóxica, geração de ERO e reatividade frente ao oxigênio.

O oligossacarídeo cíclico β -ciclodextrina, promoveu um aumento na solubilidade bem como na estabilidade das *orto*-quinonas aqui estudadas, o que abre um leque para o preparo destes complexos para avaliação das atividades biológicas *in vivo*. Infelizmente não foi possível comprovar o aumento de solubilidade com relação às *para*-quinonas. Estudos mais detalhados serão realizados.

A técnica de PM IRRAS, foi fundamental para comprovar a formação de monocamada auto-organizada de β -CDSH na superfície de um substrato de ouro, e

principalmente, foi decisiva na comprovação da ligação hidrogênio entre a hidroquinona da β -lapachona e as hidroxilas secundárias da β -ciclodextrina.

PM IRRAS também foi usada para comprovar a formação do complexo entre mangiferina (MGN) e β -ciclodextrina na superfície de um substrato metálico. O complexo foi também comprovado por ^1H RMN, calorimetria diferencial e no infravermelho.

A atividade antioxidante de mangiferina livre e complexada foi estudada pelos métodos de DPPH, ORAC-FL e lipoperoxidação, onde foi possível mostrar que o complexo MGN: β -CD mostrou maior atividade antioxidante do que mangiferina livre. O método ORAC-FL mostrou-se o mais sensível para esta análise, por ser realizado em meio aquoso e a sonda fluoresceína bem como AAPH não interferem na análise.

Utilizando microbalança eletroquímica de cristal de quartzo (EQCM), foi possível acompanhar a formação de monocamadas auto-organizadas de aminoetanotiol ligado a *dsDNA* e determinar a quantidade de moléculas depositadas em cada camada, como também observar a não interação das quinonas β -lapachona, *nor*- β -lapachona e α -lapachona com DNA.

A EQCM, também foi importante juntamente com SECM, corroborando com os dados obtidos por voltametria de pulso diferencial para comprovar a interação de timol com DNA.

Utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD) e eletroforese, foi demonstrado neste trabalho, que é possível produzir *ssDNA* pelo tratamento ácido-base com aquecimento, de forma simples, barata e completamente reprodutível.

PERSPECTIVAS

- Preparar complexos de inclusão entre as quinonas ora trabalhadas com ciclodextrinas e fazer sua caracterização através de FTIR, DSC, RMN, buscando verificar sua estequiometria.
- Avaliar a interação das substâncias trabalhadas com lipossomas;
- Investigar a interação das quinonas com DNA através de técnicas como EQCM, antes e após estarem encapsuladas com ciclodextrinas ou lipossomas.
- Utilizar uma substância com interação com DNA, como a doxorrubicina e avaliar seu comportamento na SAM de AET/dsDNA para efeito de comparação com as quinonas ora estudadas.

REFERÊNCIAS

- ABU-YOUSEF, I. A. et al. Simplified HPLC Method for Identification of Gingerol and Mangiferin in Herbal Extracts. **European Journal of Scientific Research**, v. 66, n° 1, p. 21-28, 2011.
- AL-GUBORY, K. H., FOWLER, P. A., GARREL, C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, p. 1634-1650, 2010.
- ALVAREZ-PARRILLA, E. et al. Complexation of Apple Antioxidants: Chlorogenic Acid, Quercetin and Rutin by β -Cyclodextrin (β -CD). **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 53, p. 121-129, 2005.
- ARAÚJO, A. J. et al. Growth inhibitory effects of 30-nitro-3-phenylamino nor-beta-lapachone against HL-60: A redox-dependent mechanism. **Toxicology in Vitro**, v. 26 p. 585-594, 2012.
- ARCHANA, P. R.; RAO, B. N.; RAO, B. S. S. In vivo radioprotective potential of thymol, a monoterpene phenol derivative of cymene. **Mutation Research**, v. 726 p. 136-145, 2011.
- AREE, T.; CHAICHIT, N. Crystal structure of β -cyclodextrin–dimethylsulfoxide inclusion complex. **Carbohydrate Research**, v. 337, pp. 2487-2494, 2002.
- ARYA; S. K. et al. Recent advances in self-assembled monolayers based biomolecular electronic devices. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 2810-2817, 2009.
- ASTRAY, G. A review on the use of cyclodextrins in foods. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1631-1640, 2009.
- AYDIN, S., BASARAN, A.A., BASARAN, N. Modulating effects of thyme and its major ingredients on oxidative DNA damage in human lymphocytes. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 53, p. 1299-1305, 2005.
- BARD, J. A.; MIRKIN, M. V. **Scanning Electrochemical Microscopy**. New York, Marcel Dekker Inc, 2001.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R.: **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**, J. Wiley, New York, 1990.
- BARNER, B. J. et al. Polarization modulation Fourier transform infrared reflectance measurements of thinfilms and monolayers at metal surfaces utilizing real-time sampling electronics. **Analytical Chemistry**, v. 63, p.55-60, 1991.
- BARRETO, J. C. et al. Characterization and Quantitation of Polyphenolic Compounds in Bark, Kernel, Leaves, and Peel of Mango (*Mangifera indica* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 5599-5610, 2008.

BERNARDO, P. H. A. et al. Synthesis and potent cytotoxic activity of 8-and 9-anilinophenanthridine-7,10-diones. **Tetrahedron Letters**, v. 52, p. 92-94, 2011.

BLATT, S.; ROSCOE, S. G.; ZAMLYNNY, V. Effect of electrode position on features of electrochemical Polarization Modulation Infrared Reflection Absorption Spectroscopy (PM IRRAS). **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 649, p.102-109, 2010.

BLAUDEZ, D.; CASTANO, S.; DESBAT, B. PM-IRRAS at liquid interfaces. In: PRADIER, C. M.; CHABAL, Y. J. **Biointerface Characterization by Advanced IR Spectroscopy**. Elsevier B.V., 2011, cap. 2, p. 27-55.

BOLLO, S.; FERREYRA, N. F.; RIVAS, G. A. Electrooxidation of DNA at Glassy Carbon Electrodes Modified with Multiwall Carbon Nanotubes Dispersed in Chitosan. **Electroanalysis**, v. 19, n. 7-8, p. 833-840, 2007.

BOTT, A. W. Characterization of Films Immobilized on an Electrode Surface Using the Electrochemical Quartz Crystal Microbalance. **Current Separations**, v. 18, n. 3, p. 79-83, 1999.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 645-666, 2007.

BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica Princípios, Métodos e Aplicações**. Livraria Almedina, Reimpressão 1996, p. 298-299.

BRETT, A. M. O.; CHIORCEA, A. M.; Effect of pH and applied potential on the adsorption of DNA on highly oriented pyrolytic graphite electrodes. Atomic force microscopy surface characterization. **Electrochemistry Communications**, v. 5, p. 178-183, 2003.

BRETT, A. M. O.; SERRANO, S. H. P.; PIEDADE, A. J. P. Chapter 3: Electrochemistry of DNA. **Comprehensive Chemical Kinetics. Applications of Kinetic Modelling**. Edited by R.G. Compton and G. Hancock. ISBN: 978-0-444-50164-6, v. 37, p. 91-119, 1999.

BRIAND, E. et al. Building of an immunosensor: How can the composition and structure of the thiol attachment layer affect the immunosensor efficiency? **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 440-448, 2006.

BUCK, R. P. et al. Piezoelectric chemical sensors. (IUPAC Technical Report). **Pure Applied Chemistry**, v. 76, n. 6, p.1139-1160, 2004.

BUFFETEAU, T.; DESBAT, B.; TURLET, J. M. Polarization Modulation FT-IR Spectroscopy of Surfaces and Ultra-thin Films: Experimental Procedure and Quantitative Analysis. **Applied Spectroscopy**, v. 45, n. 3, p.380-389, 1991.

BUYUKLEYLA, M.; RENCUZOGULLARI, E. The effects of thymol on sister chromatid exchange, chromosome aberration and micronucleus in human lymphocytes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p.943-947, 2009.

CAMPBELL-RANCE, D. S.; DOAN, T. T.; LEOPOLD, M. C. Sweep, step, pulse, and frequency-based techniques applied to protein monolayer electrochemistry at nanoparticle interfaces. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 662, p. 343-354, 2011.

CARRIER, R. L.; MILLER, L. A.; AHMED, I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. **Journal of Controlled Release**, v. 123, p.78-99, 2007.

CARRILLO, N. et al. Enzymatically synthesized polyaniline film deposition studied by simultaneous open circuit potential and electrochemical quartz crystal microbalance measurements. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 369, p. 103-110, 2012.

CARVALHO, A. C. S. et al. Gastroprotective effect of mangiferin, a xanthonoid from *Mangifera indica*, against gastric injury induced by ethanol and indomethacin in rodents. **Planta Medica**, v. 73, p. 1372-1376, 2007.

CARVALHO, R. R. et al. Effect of mangiferin on the development of periodontal disease: Involvement of lipoxin A4, anti-chemotaxic action in leukocyte rolling. **Chemico-Biological Interactions**, v. 179, p. 344-350, 2009.

CASSIÈDE, M. et al. Electrical behaviour of AT-cut quartz crystal resonators as a function of overtone number. **Sensors and Actuators A**, v. 159, p.174-183, 2010.

CASTANO, S. et al. Asymmetric lipid bilayer formation stabilized by DNA at the air/water interface. **Biochimie**, v. 91, p. 765-773, 2009.

CASTRO, J. R. M. **Estudo sobre a determinação de benzeno e amônia no ar, utilizando sensor piezoelétrico de quartzo**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, 2005, 118 p.

CAVALCANTI, B. C. **Avaliação *in vitro* do potencial citotóxico de derivados arilaminados *nor*- β -lapachônicos: estudos de mecanismo de ação**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Ceará, 2010, 171 p.

CAVALCANTI, B. et al. Preclinical genotoxicology of *nor*- β -lapachone in human cultured lymphocytes and Chinese hamster lung fibroblasts. **Chemical Research in Toxicology**, v.24, p.1560, 2011.

CAVALCANTI, I. M. F. et al. The encapsulation of β -lapachone in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex into liposomes: A physicochemical evaluation and molecular modeling approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, p. 332-340, 2011.

CHOI, S.-W. et al. Characterization of self assembled thiolated β -cyclodextrin and tolane thioacetate mixed monolayer. **Colloids Surface, A**, v. 257-258, p.31-36, 2005.

CORRÊA, R. S. **Xantonas oxigenadas bioativas: cristalização, estrutura e suas interações intra e intermoleculares**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, 2009, 182 p.

DA SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; DE SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 407-416, 2003.

DA SILVA, A. M. **Síntese de novos naftoimidazóis derivados de β -lapachona e compostos relacionados, empregando irradiação na região de microondas e reagentes suportados, e outras sínteses**. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2008, 133 p.

DAR, A.; et al. Analgesic and Antioxidant Activity of Mangiferin and Its Derivatives: the Structure Activity Relationship. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28(4), p. 596-600, 2005.

DOBRZENIECKA A. et al Application of SECM in tracing of hydrogen peroxide at multicomponentnon-noble electrocatalyst films for the oxygen reduction reaction. **Catalysis Today**, v. 202,p. 55-62, 2013.

DE ABREU, F. C.; et al., Electrochemistry of β -lapachone and its diazoderivative: Relevance to their compared antimicrobial activities. **Electrochemistry Communication**, v. 7, p. 767-772, 2005.

DE ABREU, F. C. et al. Electrochemical activation of β -lapachone in β -cyclodextrin inclusion complexes and reactivity of its reduced form towards oxygen in aqueous solutions. **Journal of Electroanalytical Chemistry**,v. 608,p. 125-132, 2007.

DE ABREU, F. C. et al. The Application of DNA-Biosensors and Differential ScanningCalorimetry to the Study of the DNA-Binding Agent Berenil.**Sensors**, v. 8, p. 1519-1538, 2008.

DEB, D. D. et al. Effect of thymol on peripheral blood mononuclear cell PBMC and acute promyelotic cancer cell line HL-60. **Chemico-Biological Interactions**,v. 193 p. 97-106, 2011.

DE FREITAS, G. C. S. **A técnica de microscopia eletroquímica de varredura aplicada à análise de materiais destinados ao armazenamento de hidrogênio**, 2007, 96 p.

DE MOURA, A. B. F. **Atividade antitumoral de nitroquinona derivada da *nor*- β -lapachona**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Alagoas, 2008, 189 p.

DE OLIVEIRA, A. C., et al. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. **Food Chemistry**, v. 115, p. 469-475, 2009.

DE SOUZA, A. A. **Estudos bioeletroquímicos de nitroquinonas derivadas da *nor*- β -lapachona**. Tese de doutorado, Universidade Federal de Alagoas, 2011, 164 p.

DE SOUZA, F. N. **Correlação entre processamento térmico, microestrutura e propriedades piezoelétricas de microfibras cerâmicas de PZT**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006, 79 p.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v. 39, p.1033-1046, 2004.

DICULESCU, V. C.; PAQUIM, A.-M.C.; BRETT, A. M. O. Electrochemical DNA Sensors for Detection of DNA Damage. **Sensors**, v. 5, p. 377-393, 2005.

DOGAN-TOPAL, B.; USLU, B.; OZKAN, S. A.: Voltammetric studies on the HIV-1 inhibitory drug Efavirenz: The interaction between dsDNA and drug using electrochemical DNA biosensor and adsorptive stripping voltammetric determination on disposable pencil graphite electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 2358-2364, 2009.

DRUMMEN, G. P. C. et al. C11-Bodipy^{581/591}, an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro)spectroscopic characterization and validation of methodology. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, n. 4, p. 473-490, 2002.

DUANG, X.-Y. et al. Mangiferin: A possible strategy for periodontal disease to therapy. **Medical Hypotheses**, v. 76, p. 486-488, 2011.

ECKERMANN, A. L. et al. Electrochemistry of redox-active self-assembled monolayers. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 254, p.1769-1802, 2010.

EDWARDS, M. et al. Scanning electrochemical microscopy: principles and applications to biophysical systems. **Physiological Measurement**, v. 27, p. R63–R108, 2006.

ENCICLOPÆDIA BRITANNICA, 2007. Disponível em: <http://media.web.britannica.com/eb-media/37/96837-004-AAC9A5BB.jpg>>. Acesso em 13 jan. 2012.

ELINGOLD, I. Mechanism of action of novel naphthofuranquinones on rat liver microsomal peroxidation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 182, p. 213-219, 2009.

EL OUARIACHI, E. M. et al. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and solvent extracts of *Ptychotis verticillata* from Morocco. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 533-536, 2011.

FALLER, A. L. K.; FIALHO, E. Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 561-568, 2010.

FERRAZ, P. A. L. et al. Electrochemical aspects of the reduction of biologically active 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 507, p. 275-286, 2001.

FERREIRA, F. R., **Estudo do encapsulamento de compostos antioxidantes em β -ciclodextrina por métodos eletroquímicos e espectroscópicos**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Alagoas, 2007, 81 p.

FERREIRA, F. R. et al. Electrochemical investigations into host-guest interactions of a natural antioxidant compound with β -cyclodextrin. **Electrochimica Acta**, v. 56, p. 797-803, 2010.

FERREIRA, G. N. M., DA SILVA, A.-C., TOMÉ, B. Acoustic wave biosensors: physical models and biological applications of quartz crystal microbalance. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 12, 2009.

FERREIRA, S. B. et al. β -Lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 2, p. 140-160, 2010.

FERREIRA, S. B. et al. Synthesis and anti-Trypanosoma cruzi activity of β -lapachone analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 3071-3077, 2011.

FEZOUA-BOUBEGTITEN, Z., et al. Determination of molecular groups involved in the interaction of annexin A5 with lipid membrane models at the air-water interface **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1798, p. 1204-1211, 2010.

FREIRE, C. P. V., et al. Synthesis and biological evaluation of substituted α - and β -2,3-dihydrofuran naphthoquinones as potent anticandidal agents. **Medical Chem. Commun.**, 229(1) (2010) 229.

FREY, B. L.; CORN, R. M.; WEIBEL, S. C. **Handbook of Vibrational Spectroscopy**, John Wiley & Sons, 2001.

FOLCH-CANO, C. et al. Antioxidant activity of inclusion complexes of tea catechins with β -cyclodextrins by ORAC assays. **Food Research International**, v. 43, p. 2039-2044, 2010.

GABRIELLI, C. A SECM assisted EQCM study of iron pitting. **Electrochimica Acta**, v. 52, p. 7706-7714, 2007.

GHOSH, B. C. et al. Spectroscopic investigation of the three prototropic forms of a β -cyclodextrin-indolizine derivative from its inclusion-cum-charge-transfer complexes. **Chemical Physics Letters**, v. 504, p. 100-106, 2011.

GIORDANO, F.; NOVAK, C.; MOYANO, J. R. Thermal analysis of cyclodextrin and their inclusion compounds. **Thermochimica Acta**, v. 308, p. 123-151, 2001.

GÓMEZ-ZALETA, B. et al. UV/vis, ^1H , and ^{13}C NMR spectroscopic studies to determine mangiferin pKa values. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 64, 1002-1009, 2006.

GUARDA, A. et al. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 144-150, 2011.

GREEN, M. J.; BARNER, B. J.; CORN, R. M. Real time sampling electronics for double modulation experiments with Fourier transform infrared spectrometers. **Review of Scientific Instrument**, v. 62, p.1426-1430, 1991.

HALL, H. et al. Investigations on the mechanism of action of the novel antitumor agents 2-benzothiazolyl, 2-benzoxazolyl, and 2-benzimidazolyl hidrazones derived from 2-acetylpyridine, **Archiv der Pharmazie Medical Chemistry**, v. 332, p. 115-123, 1999.

HLAVATA, L. et al. Evaluation of damage to DNA induced by UV-C radiation and chemical agents using electrochemical biosensor based on low molecular weight DNA and screen-printed carbon electrode. **Electrochimica Acta**, v. 71, p. 134-139, 2012.

HERMANDON, G.T. Zero-length cross-linkers. In: **Bioconjugate techniques**. San Diego: Academic Press, 1996. Cap. 3, p. 169-173.

HILLARD, E. A. et al. Electrochemical parameters and techniques in drug development, with an emphasis on quinones and related compounds. **Chemical Communication**, p. 2612-2628, 2008.

HUANG, L. et al. Investigation on a host–guest inclusion system by β -cyclodextrin derivative and its analytical application. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p. 1113-1117, 2011.

HSU, C.-P. S. Infrared Spectroscopy. In: SETTLE, F. **Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry**. 1997, cap. 15, p. 247-283. ISBN-10:0131773380.

IVANOVIC, J. et al. In vitro control of multiplication of some food-associated bacteria by thyme, rosemary and sage isolates. **Food Control**, v. 25, p. 110-116, 2012.

JIMÉNEZ-ALONSO, S. Electronic and Cytotoxic Properties of 2-Amino-naphtho[2,3-b]furan-4,9-diones. **Journal Organic Chemistry**, v. 76, p. 1634-1643, 2011.

JIMENEZ, P. C. et al. Biological activity in extract of Ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from northeastern Brazilian coast. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 287, n° 1, p. 93-101, 2003.

KAROLIN et al. Fluorescence and Absorption Spectroscopic Properties of Dipyrrometheneboron Difluoride (BODIPY) Derivatives in Liquids, Lipid Membranes, and Proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, p. 7801-7806, 1994.

KOHEN, R., NYSKA, A. Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. **Toxicologic Pathology**, v. 30, n. 6, p. 620-650, 2002.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, p. 217-233, 2011.

LAGUERRE, M., LECOMTE, J., VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, v. 46, p. 244 -282, 2007.

LA-SCALEA, M. A.; SERRANO, S. H. P.; GUTZ, I. G. R. Eletrodos modificados com DNA: uma nova alternativa em eletroanálise. **Química Nova**, v. 22, n. 3, 1999.

LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chemical Research in Toxicology**, v. 5, p. 227-231, 1992.

LEFERINK, N. G. H. et al. Gating mechanisms for biological electron transfer: Integrating structure with biophysics reveals the nature of redox control in cytochrome P450 reductase and copper-dependent nitrite reductase. **FEBS Letters**, v. xxx, p. xxx-xxx, 2011.

LEINARTAS, K.; MIECINSKAS, P.; JUZELIUNAS, E. Ruthenium dioxide quartz crystal nano-balance. **Sensors and Actuators B**, v. 137, p. 762-767, 2009.

LI, J. et al. Preparation and characterization of the inclusion complex of Baicalin (BG) with β -CD and HP- β -CD in solution: An antioxidant ability study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 73, p. 752-756, 2009.

LIU, L.; ZHU, S. A study on the supramolecular structure of inclusion complex of β -cyclodextrin with prazosin hydrochloride. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 472-476, 2007.

LOFTSSON, T.; MASSON, M. Review. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 225, p. 15-30, 2001.

LU, X.; WANG, Q.; LIU, X. Review: Recent applications of scanning electrochemical microscopy to the study of charge transfer kinetics. **Analytica Chimica Acta**, v. 601, p. 10-25, 2007.

LU, Z. et al. Complexation of resveratrol with cyclodextrins: Solubility and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 113, p. 17-20, 2009.

LUCAS-ABELLÁN, C. et al. Comparative study of different methods to measure antioxidant activity of resveratrol in the presence of cyclodextrins. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1255-1260, 2011.

MA, W. et al. In situ spectroelectrochemistry and cytotoxic activities of natural ubiquinone analogues. **Tetrahedron**, v. 67, p. 5990-6000, 2011.

MACDONALD, R. C. et al. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1061, n. 2, p. 297-303, 1991.

MACDONALD, M. L.; MURRAY, I. V. J.; AXELSEN, P. H. Mass spectrometric analysis demonstrates that BODIPY 581/591 C11 overestimates and inhibits oxidative lipid damage. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 42, p. 1392-1397, 2007.

MAHO, A., et al. Electro-assisted assembly of aliphatic thiol, dithiol and dithiocarboxylic acid monolayers on copper. **Electrochimica Acta**, v. 56, p. 3954-3962, 2011.

MÅRTENSSON, C., HERNÁNDEZ, V. A. Ubiquinone-10 in gold-immobilized lipid membrane structures acts as a sensor for acetylcholine and other tetraalkylammonium cations. **Bioelectrochemistry**, v. xxx, p. xxx-xxx, 2012.

MENDELSON, R.; MAO, G.; FLACH, C. R. Infrared reflection-absorption spectroscopy: Principles and applications to lipid-protein interaction in Langmuir films. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1798, p. 788-800, 2010.

MOLFETA, F. A. **Planejamento de quinonas com atividade tripanossomicida**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 2007, 115 p.

MOREL, A.-L. et al. Optimized immobilization of gold nanoparticles on planar surfaces through alkyldithiols and their use to build 3D biosensors. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, p. 304-312, 2010.

MULINACCI, N. et al. ¹H-NMR NOE and molecular modelling to characterize thymol and carvacrol β -cyclodextrin complexes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 128, p. 81-88, 1996.

NASIR, M. N., BESSON, F. Interactions of the antifungal mycosubtilin with ergosterol-containing interfacial monolayers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1818, p. 1302-1308, 2012.

NEELAKANDAN, C., KYU, T. Hydrogen bonding interactions and miscibility studies of poly(amide)/poly-(vinyl pyrrolidone) blends containing mangiferin. **Polymer**, v. 50, p. 2885-2892, 2009.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 503-515, 2010.

NOWICKA, A. M. et al. Nanogravimetric and voltammetric DNA-hybridization biosensors for studies of DNA damage by common toxicants and pollutants. **Biophysical Chemistry**, v. 146, p. 42-53, 2010.

NASONGKLA, N. et al. Enhancement of Solubility and Bioavailability of β -Lapachone Using Cyclodextrin Inclusion Complexes. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 10, p. 1626-1633, 2003

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4619-4626, 2001.

OZBEN, T. Oxidative Stress and Apoptosis: Impact on Cancer Therapy. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n 9, p. 2181-2196, 2007.

PARDO-ANDREU, G. L. et al. Fe(III) improves antioxidant and cytoprotecting activities of mangiferin. **European Journal of Pharmacology**, v. 547, p. 31-36, 2006.

PATIL, A. V.; DAVIS, J. J. Molecular scale bioelectrochemistry. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 255 p. 1970-1980, 2011.

PINTO, E. M. et al. Electrochemical and surface characterisation of carbon-film-coated piezoelectric quartz crystals. **Applied Surface Science**, v. 255, p. 8084-8090, 2009.

POLYAKOV, N. E. et al. Inclusion complexes of carotenoids with cyclodextrins: ¹H NMR, EPR, and optical studies. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, n° 7, p. 872-880, 2004.

PRABHU, S. et al. Cardioprotective effect of mangiferin on isoproterenol induced myocardial infarction in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 44, p. 209-215, 2006.

REICHSTEIN, A. et al. Synthesis and Structure–Activity Relationships of Lapacho Analogues. 1. Suppression of Human Keratinocyte Hyperproliferation by 2-Substituted Naphtho[2,3-b]furan-4,9-diones, Activation by Enzymatic One- and Two-Electron Reduction, and Intracellular Generation of Superoxide. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, pg. 7273–7284, 2012.

ROBERTS, W. S. et al. Advances in the application of scanning electrochemical microscopy to bioanalytical systems. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, p. 301-318, 2007.

ROBERTS, W. S.; et al. Detection and imaging the expression of the trans-membrane protein CD44 in RT112 cells by use of enzyme-labeled antibodies and SECM. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 41, p. 282-288, 2013.

SADIK, O. A.; ALUOCH, A. O.; ZHOU, A. Status of biomolecular recognition using electrochemical techniques. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 2749-2765, 2009.

SALAS, C. et al. Trypanosoma cruzi: Activities of lapachol and α - and β -lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 668-674, 2008.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LAURRARI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. **Food Research International**, v. 32, p. 407-412, 1999.

SARAULI, D. et al. Investigation of the mediated electron transfer mechanism of cellobiose dehydrogenase at cytochrome c-modified gold electrodes **Bioelectrochemistry**, doi:10.1016/j.bioelechem.2011.07.003.

SAXENA, A. et al. Natural antioxidants synergistically enhance the anticancer potential of AP9-cd, a novel lignan composition from *Cedrus deodara* in human leukemia HL-60 cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, p. 580-590, 2010.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V.; Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na α -lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, p. 407-416, 2003.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Spectrometric identification of organic compounds. John Wiley & Sons, Inc. 7^o edition, 2005.

SKODA, M. W. A. et al. Optimizing the PMIRRAS signal from a multilayer system and application to self-assembled monolayers in contact with liquids. **Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena**, v. 172, p.21-26, 2009.

SMITH, A. L. The quartz crystal microbalance. In. BROWN, M. E.; GALLAGHER, P. K. **Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry. Recent Advances, Techniques and Applications**. Elsevier, 2008, v. 5, cap. 5, p. 133-169

SONG, Y., BUETTNER G. R. Thermodynamic and kinetic considerations for the reaction of semiquinone radicals to form superoxide and hydrogen peroxide. **Free Radical and Biological Medicine**, v. 49, pg. 919-962, 2010.

SAWYER, D. T., VELENTINE, J. S. How super is superoxide? *Accounts of Chemical Research*, v.14 pg. 393, 1981.

SOUTHAMPTON ELECTROCHEMISTRY GROUP. **Instrumental Methods in Electrochemistry**. Edited by Southampton Electrochemistry Group. 2001.

STRAZISAR, M.; ANDRENESEK, S.; SMIDOVNIK, A. Effect of β -cyclodextrin on antioxidant activity of coumaric acids. **Food Chemistry**, v. 110, p. 636-642, 2008.

SZENTE, L. and SZEJTALI, J. Cyclodextrins as food ingredients. **Trends Food Science & Technology**, v. 15, p. 137-142, 2004.

SZEJTALI, J.; SZENTE, L. Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 61, p. 115-125, 2005.

TAGLIAZUCCHI, M. et al. PM IRRAS spectroelectrochemistry of layer-by-layer self-assembled polyelectrolyte multilayers. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 649, p. 110-118, 2010.

TENG, H., et al. Medical combination containing mangiferin and its preparation. CN1977855-A Ch Patent, 2007.

TRASFERETTI, B. C.; DAVANZO, C. U. Introdução às técnicas de reflexão especular e de reflexão-absorção no infravermelho: (2) reflexão-absorção. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 99-104, 2001.

TUANTRANONT, A. et al. A review of monolithic multichannel quartz crystal microbalance: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 687, p. 114-128, 2011.

TUTORIAL MÓDULO EQCM. Disponível em: <<http://www.metrohm-Autolab.com/Products/Echem/ModulesFolder/EQCM.html>>. Acesso em 2012.

ÜNDEGER, U. et al. Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 2037-2043, 2009.

VARELA, H.; MALTA, M.; TORRESI, R. M. Técnicas *in situ* de baixo custo em eletroquímica: a microbalança a cristal de quartzo. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 664-679, 2000.

VASUDEVAN, D., WENDT, H. Electroreduction of oxygen in aprotic media. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 192, pg. 69, 1995.

VENTURINI, C. G. et al. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 360-368, 2008.

VIÉ, V. et al. Specific anchoring modes of two distinct dystrophin rod sub-domains interacting in phospholipid Langmuir films studied by atomic force microscopy and PM-IRRAS. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1798, p. 1503-1511, 2010.

VIITALA, T. et al. Fluid dynamics modeling for synchronizing surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance as tools for biomolecular and targeted drug delivery studies. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. xxx, p. xxx-xxx, 2012.

WANG, Z. et al. Dissoluble mangiferin inclusion compound and its preparation method. CN101019877-A Chinese Patent, 2007.

WANG, Y. et al. The electrochemical reduction of 1,4-benzoquinone in 1-ethyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethane-sulfonyl)-imide, [C₂mim][NTf₂]: A voltammetric study of the comproportionation between benzoquinone and the benzoquinone dianion. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 648, p. 134-142, 2010.

WANG, R.-R. et al. Mangiferin, an Anti-HIV-1 Agent Targeting Protease and Effective against Resistant Strains. **Molecules**, v. 16, p. 4264-4277, 2011.

WANG, W., HU, Y., WANG, C., LU, X. Comparative electrochemical investigations on series of SH-terminated-functional porphyrins. **Electrochimica Acta**, v. 65, p. 244-250, 2012.

WENG, C.-J.; YEN, G.-C. Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: Phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, p. 76-87, 2012.

YAN, C. et al. Molecular modeling study of β -cyclodextrin complexes with (+)-catechin and (-)-epicatechin. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 26, p. 420-428, 2007.

YANG, J.; LIN, H.-J.; HUANG, H.-Y. Characterization of cyclodextrin-modified infrared chemical sensors. Part I. Modeling the mechanisms of interaction. **Analytica Chimica Acta**, v. 527, p. 27-36, 2004.

ZHAO, Y.-D. et al. DNA-modified electrodes; part 4: optimization of covalent immobilization of DNA on self-assembled monolayers. **Talanta**, v. 49, p. 751-756, 1999.

ZHANG, H. et al. Determination of Mangiferin in Rat Eyes and Pharmacokinetic Study in Plasma After Oral Administration of Mangiferin-Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin Inclusion. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 26 n. 4, 319-324, 2010.

ZHANG, J. et al. Interfacial electrochemical electron transfer in biology – Towards the level of the single molecule. *FEBS Letters* (2011), doi:10.1016/j.febslet.2011.10.023.

ZULUETA, A.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. **Food Chemistry**, v. 114, p. 310-316, 2009.