



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

ANTONIO ALBUQUERQUE DE SOUZA

ESTUDOS BIOELETROQUÍMICOS DE NITROQUINONAS
DERIVADAS DA *NOR*- β -LAPACHONA

Maceió

2011

ANTONIO ALBUQUERQUE DE SOUZA

**ESTUDOS BIOELETROQUÍMICOS DE NITROQUINONAS
DERIVADAS DA NOR- β -LAPACHONA**

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

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marília Oliveira Fonseca
Goulart.**

**Maceió
2011**

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

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

S237e Souza, Antonio Albuquerque de.
Estudos bioeletroquímicos de nitroquinomas derivada da nor- β -lapachona / Antonio Albuquerque de Souza. – 2011.
167 f. : il. tabs., grafs.

Orientadora: Marília Oliveira Fonseca Goulart.
Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2011.

Bibliografia: f. 158-167.

1. Bioeletroquímica. 2. Sensores de DNA. 3. Nor- β -lapachona. 4. Nitroquinomas. 5. Farmacoeletroquímica. 6. β -ciclodextrina. I. Título.

CDU: 543.061



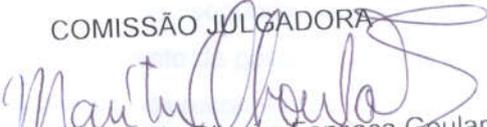
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA

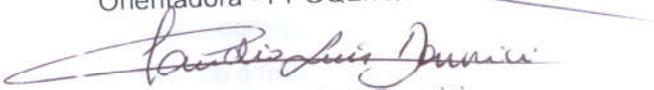


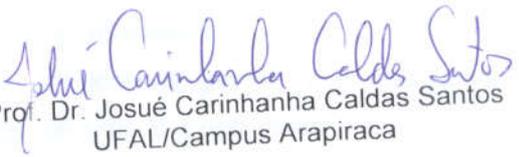
BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1384, Fax (82) 3214-1384
email: cpgqb@qui.ufal.br

Membros da Comissão Julgadora da Tese de Doutorado de **Antonio Albuquerque de Souza**, intitulada: "**Estudos Bioeletroquímicos de Nitroquinonas Derivados da Nor- β -Lapachona**", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 26 de agosto de 2011, às 14h17min, na Sala de Aulas do PPGQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA


Prof.^a Dr.^a Marília Oliveira Fonseca Goulart
Orientadora - PPGQB/IQB/UFAL


Prof. Dr. Claudio Luis Donnici
DQ/ICEX/UFMG


Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos
UFAL/Campus Arapiraca


Prof.^a Dr.^a Fabiane Caxico de Abreu Galdino
PPGQB/IQB/UFAL


Prof.^a Dr.^a Simoni Margareth Plentz Meneghetti
PPGQB/IQB/UFAL

AGRADECIMENTOS

A Deus, a razão do existir, cuja presença constante enche meu coração de júbilo.

A todos os meus familiares, meus pais, irmãos e sobrinhos, fundamentais em horas de dificuldade. Em especial minha mãe, o alicerce de toda a caminhada e a razão do querer mais.

A minha orientadora, Prof^a Doutora Marília Goulart, pela oportunidade de aprender com seu gesto, por partilhar seus conhecimentos e experiências, e por ter ido muito além do papel de orientadora. Nada seria possível sem sua imensa capacidade de proporcionar uma segunda oportunidade de crescimento e retificação, incentivando o crescimento da pessoa humana que encontrou o caminho da ciência e, assim, a capacidade de reconhecer sua pequenez diante da inevitável possibilidade de errar. Não acredito que as coisas aconteçam por acaso, mas se isso tudo foi obra do acaso, não consigo imaginar alguém que tenha sido mais privilegiado que eu, pois a inspiração é fruto de seu reflexo.

A Prof^a Doutora Fabiane Caxico, por sua personalidade singular, capaz de proporcionar momentos extremamente agradáveis. Sua disposição em ajudar promoveu discussões científicas de grande qualidade, além de injetar energia e ânimo nos momentos de dificuldade e descrença.

A Prof^a. Doutora Janesmar Camilo, a primeira pessoa que me acolheu no laboratório de eletroquímica me dando a oportunidade de chegar até aqui. Minha imensa gratidão por ter sido o catalisador desse processo.

Ao Prof^o. Doutor Josealdo Tonholo, pelo acolhimento e todo apoio desde minha ingresso no grupo.

Ao Prof. Eufrânio N. da Silva Jr. (DQ/UFMG) e ao já falecido Prof. Antonio Ventura Pinto (NPPN/UFRJ), pela síntese e concessão das amostras trabalhadas na presente tese.

Aos amigos que me acompanharam desde a graduação: Alan John, amigo especial, também companheiro de estudos, e agora colega de trabalho, um grande privilégio; Wanessa, que mesmo longe do alcance dos olhos, não deixou de se fazer presente e prestar seu imenso apoio, oferecendo-me palavras de incentivo. Não consigo expressar em palavras a alegria que é poder conviver com vocês.

Ao grupo de Eletroquímica, ao qual tenho um profundo apreço e gratidão, simplesmente por ter me permitido ir além dos próprios sonhos. Aqui conheci pessoas especiais, com as quais espero cultivar a gratificante amizade estabelecida.

Aos amigos Écio, Paulo, Cícero, Phabyanno e Augusto, com os quais aprendi a superar as diferenças e desfrutar uma verdadeira amizade.

A Camila, por sua constante presença nesses momentos finais, sua ajuda na repetição de experimentos e, principalmente, pelos vários momentos de descontração desfrutados que permitiram construir uma gratificante amizade; Alane Cabral, elétrica e de convivência deliciosa, por sua amizade, seu carinho e todo apoio em momentos decisivos. Alani, por estar sempre apta a prestar sua solidariedade; os. Fabrícia, sempre delicada e apta a ajuda. Francisco e Cleylton pela convivência surpreendente e muito gratificante. Iara, de personalidade ímpar, cuja racionalidade permite enxergar a grandeza das conquistas Adicionalmente a Cleylton e Cícero, pela ajuda na organização do sumário e figuras.

As novas integrantes do grupo de Eletroquímica, Gabi, Juliana e Fátima; detentoras de um astral contagiante e de deliciosa convivência.

Aos amigos que conheci logo que ingressei no grupo de eletroquímica, Sandra Mary (Sandrinha), Aline, (Alinitxe), Francine (Francietxe), doce, solícita e com a capacidade de inferir sempre positivamente, e José Rui. Enfim, todos aqueles que por um lapso de memória possam não ter sido mencionados, obrigado por também fazerem parte desse momento.

A todos os Professores do IQB. Em especial aos Professores Josealdo Tonholo, Simomi Meneghetti, Lúcia Conserva, Marília Goulart, Fabiane Caxico, Ana Queijeiro e Ana Góis, com vocês aprendi que a atividade docente é uma dádiva de extraordinária grandeza.

Ao grupo de eletroquímica da Universidade do Chile, “as Paolas”, Paulina, Karla, Claudio, Valéria, as Professoras Claudia e Soledad, em especial Raúl, fundamental para execução de parte desse trabalho, além de toda gentileza e solicitude quando em convívio de todos. Grato pela aula de gentileza e cordialidade, a capacidade de servir realmente é um dom.

Ao Professor J. A. Squella, da Universidade do Chile, pela gentileza e hospitalidade ao me receber em seu grupo de pesquisa.

A CAPES e CNPq, pela bolsa concedida durante o desenvolvimento desse trabalho.

A FAPEAL, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro ao grupo.

“Se não houver frutos, valeu a beleza das flores; se não houver flores, valeu a sombra das folhas; se não houver folhas, valeu a intenção da semente.”

Henfil

RESUMO

Quinonas despertam muito interesse devido às suas diversas atividades biológicas, principalmente como agentes antitumoral e tripanossomicida. A citotoxicidade de quinonas decorre de dois mecanismos principais: geração de EROs resultando no estresse oxidativo e alquilação de nucleófilos celulares, como o DNA e algumas enzimas, como as topoisomerases. Sua atividade depende de biorredução, similarmente ao que acontece com compostos nitroaromáticos. Eles também catalisam reações de transferência de elétrons biológicas e, após a redução geram ânions radicais (ânions radicais semiquinona e nitro), que dependendo da estabilidade, podem transferir seus elétrons livres a moléculas aceptoras. Neste trabalho, compostos de funcionalidade mista derivados da *nor*- β -lapachona, com um grupo nitroanilina, foram estudados eletroquimicamente nos meios prótico (tampão acetato) e aprótico (DMF + TBABF₄, DMSO + TBAP e acetonitrila + TBABF₄), utilizando carbono vítreo e mercúrio como eletrodos de trabalho. Os compostos apresentaram um comportamento redox complexo e o mecanismo elucidado por espectroeletroquímica. Os produtos da eletro-redução da *nor*- β -lapachona e nitroquinonas reagiram com oxigênio, indicativo da geração de EROs, na ordem de reatividade **2** > *nor*- β -lapachona > **3** > **1**. Foi investigada a interação com DNA, que se mostrou positiva para as nitroquinonas e negativa para o precursor *nor*- β -lapachona, concordantes com ensaios biológicos que também evidenciou que as nitroquinonas causam dano ao DNA. A estabilidade do nitrosemiquinona, tempos de meia-vida e as taxas reacionais referentes à reação química de desproporcionamento acoplada ao processo eletroquímico para cada derivado foram determinadas usando eletrodo de mercúrio. A partir desses estudos, foi evidenciada a menor estabilidade para o nitrofenilamina *meta*-substituída ($k_2 = 15,188 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $t_{1/2} = 0,06 \text{ s}$). Nos estudos por espectroeletroquímica das nitroquinonas, observou-se a geração de intermediários radicalares (ânions radicais semiquinona e nitro), com diferenças entre os nitroderivados *o*- e *m*-, assim como para o *p*-derivado. Com objetivo de aumentar a solubilidade das nitroquinonas, para posteriores estudos *in vivo*, foi avaliada a formação de complexos de inclusão com β -ciclodextrina. Foram obtidos resultados positivos, refletindo em alternativa viável para formulações posteriores com estes compostos e ensaios biológicos.

Palavras-Chave: Sensores de DNA. *Nor*- β -lapachona. Nitroquinonas. β -ciclodextrina. Parâmetros Eletroquímicos. Farmacoeletroquímica.

ABSTRACT

Quinones have been the subject of much interest due to their various biological activities, mainly as antitumor and as trypanocidal agents. Quinones are cytotoxic by two main mechanisms: the generation of ROS resulting in oxidative stress and alkylation of cellular nucleophiles, such as DNA and some enzymes such as topoisomerases. Their activity depends on bioreduction, similarly to what happens to nitroaromatic compounds. They also catalyze electron transfer reactions in biological processes and, after reduction generate radical anions (semiquinone radical anion and nitro), which depending on stability, can furnish their free electrons to acceptor molecules. In the present study, compounds with mixed functionalities derived from *nor*- β -lapachone, including a nitroaniline group were electrochemically studied in protic (acetate buffer) and aprotic (DMF+TBABF₄, DMSO+TBAP and Acetonitrile+TBABF₄) media, using glassy carbon and mercury as working electrodes. The compounds showed a complex redox behavior and the mechanism was elucidated using electron spin resonance. The electroreduced products of *nor*- β -lapachone and of the nitroquinones reacted with oxygen, indicative of the generation of reactive oxygen species, reactivity in the order of **2** > *nor*- β -lapachone > **3** > **1**. We investigated their interaction with DNA, which was shown to be positive for nitroquinones and negative for the precursor *nor*- β -lapachone, in agreement with biological assays which had also shown that the nitroquinones cause DNA damage. The stability of the nitrosemiquinones, their half-life times were measured using mercury electrode, and the reaction rates for the electrochemical process-following-up-disproportionation reaction were measured. From these studies, a lower stability for the *meta*-substituted nitrophenylaniline ($k_2 = 5.188 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $t_{1/2} = 0.06 \text{ s}$) was evidenced. Upon spectroelectrochemical reduction studies of the nitroquinones, the generation of radicalar intermediates (semiquinone radical anion and nitro radical anion) was observed, with differences between *o*-, *m*-derived compounds and the *p*-substituted one. To increase the solubility of the nitroquinones, in order to allow in vivo studies, the formation of inclusion complexes with β -cyclodextrin were evaluated. Positive results were obtained, leading to a viable formulation alternative for further biological studies with the compounds.

Keywords: DNA sensors. *Nor*- β -lapachone. Nitroquinones. β -cyclodextrin. Electrochemical Parameters. Pharmacoelectrochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vias de formação de ERO, o processo de peroxidação lipídica e do papel da glutatona (GSH) e outros antioxidantes (vitamina E, vitamina C, ácido lipóico), no manejo do estresse oxidativo (equações não balanceadas). Reação 1: O ânion radical superóxido é formado pelo processo da redução do oxigênio molecular mediado por enzimas oxidases NAD(P)H e xantina oxidase ou não enzimaticamente, por compostos redox-reativos, como o composto semi-ubiquinona da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons. Reação 2: o radical superóxido sofre dismutação pela superóxido dismutase (SOD) a peróxido de hidrogênio. Reação 3: o peróxido de hidrogênio é eliminado mais eficientemente pela enzima glutatona peroxidase (GPx) que requer GSH como doador de elétrons. Reação 4: a glutatona oxidada (GSSG) é reduzida de volta a GSH, pela enzima glutatona redutase (G_{red}) que utiliza NADPH como doador de elétrons. Reação 5: alguns metais de transição (por exemplo, Fe^{2+} , Cu^+ e outros) podem quebrar o peróxido de hidrogênio ao radical reativo hidroxila (reação de Fenton). Reação 6: o radical hidroxila pode abstrair um elétron a partir de ácidos graxos poliinsaturados (LH) para dar origem a um radical lipídico carbono-centrado (L^{\cdot}). Reação 7: o radical lipídico (L^{\cdot}) pode posteriormente interagir com o oxigênio molecular para gerar um radical peroxila lipídico (LOO^{\cdot}). Se o radical peroxila lipídico resultante LOO^{\cdot} não for reduzido pelo uso de antioxidantes, o processo de peroxidação lipídica ocorre (reações 18-23 e 15-17). Reação 8: o radical peroxila lipídico (LOO^{\cdot}) é reduzido dentro da membrana por uma forma reduzida da vitamina E (T-OH), resultando na formação de um hidroperóxido lipídico e um radical de vitamina E (TO^{\cdot}). Reação 9: a regeneração da vitamina E pela vitamina C: o radical de vitamina E (TO^{\cdot}) é reduzido novamente a vitamina E (T-OH) pelo ácido ascórbico (a forma fisiológica de ascorbato é a espécie monoaniônica

ascorbato, AscH^-) deixando para trás o radical ascorbila (Asc^\bullet). Reação 10: a regeneração da vitamina E por GSH: o radical de da vitamina E oxidada (TO^\bullet) é reduzido por GSH. Reação 11: a glutatona oxidada (GSSG) e o radical ascorbila (Asc^\bullet) são reduzidos de volta para GSH e à espécie ascorbato monoaniônica, AscH^- , respectivamente, pelo ácido dihidrolipóico (DHLA), que é convertido em ácido α -lipóico (ALA). Reação 12: a regeneração de DHLA a partir de ALA usando NADPH. Reação 13: hidroperóxidos lipídicos são reduzidos a alcoóis e oxigênio molecular pela GPx, usando GSH como doador de elétrons. *O processo de peroxidação lipídica:* Reação 14: hidroperóxidos lipídicos podem reagir rapidamente com Fe^{2+} para formar radicais alcoxil lipídicos (LO^\bullet), ou muito lentamente com Fe^{3+} para formar radical peroxila lipídico (LOO^\bullet). Reação 15: radical alcoxila lipídico (LO^\bullet), por exemplo, derivado da reação de ciclização do ácido araquidônico sofre reação de ciclização para formar um hidroperóxido, em anel de seis membros. Reação 16: anel hidroperóxido de seis membros sofre reações posteriores (envolvendo β -cisão) para formar 4-hidroxinonenal. Reação 17: o 4-hidroxinonenal é transformado em um aduto inócuo glutatátil (GST, glutatona S-transferase). Reação 18: um radical peroxila localizado na posição interna do ácido graxo pode reagir por ciclização para produzir um peróxido cíclico adjacente a um radical carbono-centrado. Reação 19: Este radical pode ser reduzido para formar um hidroperóxido (reação não mostrada) ou pode sofrer uma segunda ciclização para formar um peróxido bicíclico que após o acoplamento ao oxigênio molecular e redução gera uma molécula estruturalmente análoga ao endoperóxido. Reação 20: o composto formado é um produto intermediário para a produção de malondialdeído. Reações 21, 22, 23: malondialdeído pode reagir com as bases citosina, adenina e guanina do DNA para formar adutos M_1C , M_1A e M_1G , respectivamente.33

Figura 2 - Potenciais padrão (E^0) de redução para o oxigênio molecular e espécies relacionadas (valores de E^0 (V) em solução aquosa com O_2 a 1 atm, pH = 7,0).....	35
Figura 3 - Reação de guanina com radical hidroxila.....	36
Figura 4 - Em condições normais, a célula é capaz de desintoxicar os radicais, mas em excesso de ERO ocorre uma série de mudanças em macromoléculas e no ambiente celular, que podem levar ao acúmulo de mutações oncogênicas contribuindo, assim, para a patogênese do câncer e a promoção do tumor. Modificações químicas no DNA alteram a especificidade das ligações de hidrogênio, causam a abertura de anéis de purina e os produtos da fragmentação de pirimidinas impedem a replicação do DNA por meio de mudanças conformacionais que diminuem a eficiência das polimerases do DNA. Adicionalmente, o dano oxidativo a proteases e lesões locais em tecidos pode promover a progressão do tumor e metástase.....	39
Figura 5 - Geração de espécies oxigenadas reativas após redução do grupo quinona e desintoxificação, pelo emprego de catalase e superóxido-dismutase (S.O.D.).....	41
Figura 6 - Representação de mecanismos pelos quais pró-fármacos ativados por biorredução exercem suas atividades farmacológicas. A: Ativação seletiva em hipóxia; B: Ativação em condições normóxicas, geração do Estresse Oxidativo.	42
Figura 7 - Estruturas do metronidazol (a), mitomicina C (b) e tirapazamina (c)	43
Figura 8 - Sumário dos potenciais mecanismos de citotoxicidade de quinonas.	44
Figura 9 - Estruturas químicas de ubiquinonas (d), plastoquinonas (e) e vitamina tipo K (f).	48

Figura 10 - Processo de redução de quinonas (Q), formando ânion radical (Q [•]), uma semiquinona instável, pode ser estabilizado pela interação com proteínas, e a hidroquinona (QH ₂), forma estável.....	48
Figura 11 - Processo de redução de quinonas. Alquilação e ciclagem redox com conseqüente formação de adutos e geração de ERO. O processo indicado pelo (asterisco) ocorre apenas para quinonas que autooxidam.....	49
Figura 12 - Esquema quadrado representativo da oxirredução de quinonas em vários meios.....	50
Figura 13 - Mecanismos gerais de ação biológica de quinonas.....	51
Figura 14 - Estruturas químicas da β-lapachona (g) e lapachol (h).....	51
Figura 15 - Estrutura química de isoquinolinaquinona (j) e derivado 7-aminoisoquinolina-5,8-quinona (k).....	52
Figura 16 - Espécies eletrofílicas geradas a partir da metabolização do Tamoxifeno.....	53
Figura 17 - Estrutura Química do Metronidazol (l) e mesonidazol (m).....	55
Figura 18 - Fragmentação redutiva de compostos aromáticos amino ou hidroxilamino substituídos, gerando intermediário eletrofílico iminoquinometano.....	55
Figura 19 - Provável mecanismo biorredutivo de nitrocompostos aromáticos.....	57
Figura 20 - Mecanismo de alquilação do DNA, A e B representam grupos eletrofílicos.....	59

Figura 21 - Mecanismo eletroquímico de dano oxidativo <i>in situ</i> da adriamicina ao DNA.....	61
Figura 22 - Representação do modo de operação do biossensor de DNA. O analito entra entre as fitas do DNA, modifica sua conformação, o que leva à exposição de suas bases, passíveis de oxidação anódica.	63
Figura 23 - Voltamograma de pulso diferencial obtido com eletrodo de carbono vítreo modificado com DNA (60 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em uma solução de tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 4,5: 1° voltamograma do ssDNA (linha vermelha) e dsDNA (linha preta), 40° voltamograma do dsDNA (linha pontilhada).....	63
Figura 24 - Estruturas químicas da Doxorrubicina (o), Mitomicina C (b), Benznidazol (p) e Niclosamida (q).	65
Figura 25 - Estrutura química da <i>nor</i> - β -lapachona (r).	65
Figura 26 - Rota sintética dos derivados arilaminos substituídos da <i>nor</i> - β -lapachona	66
Figura 27 - Substâncias derivadas da <i>nor</i> - β -lapachona estudadas no presente trabalho.....	70
Figura 28 - Voltamograma cíclico detalhando as correntes de pico em relação ao zero de corrente.	73
Figura 29 - Voltamogramas cíclicos da <i>nor</i> - β -lapachona e seus nitroderivados (C = 1 mmol L ⁻¹) em DMF/TBABF ₄ (0,1 mol L ⁻¹). Eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$	85

- Figura 30** - a: Análise da corrente de pico (I_{pc1}), para a primeira onda de redução de 1, em função de $v^{1/2}$, caracterizando o fenômeno de transporte de massa em solução. b: Gráfico de potencial de pico de primeira onda de redução em função do $\log v$ (DMF/TBABF₄ 0,100 mol L⁻¹).86
- Figura 31** - a: Análise da corrente de pico (I_{pc1}), para a primeira onda de redução de 2, em função de $v^{1/2}$, caracterizando o fenômeno de transporte de massa em solução. b: Gráfico de potencial de pico de primeira onda de redução em função do $\log v$ (DMF/TBABF₄ 0,100 mol L⁻¹).87
- Figura 32** - Análise da corrente de pico (I_{pc1}), para a primeira onda de redução de 3, em função de $v^{1/2}$, caracterizando o fenômeno de transporte de massa em solução. b: Gráfico de potencial de pico de primeira onda de redução em função do $\log v$ (DMF/TBABF₄ 0,100 mol L⁻¹).87
- Figura 33** - Voltamogramas cíclicos dos nitroderivados da *nor*- β -lapachona, **1**, **2** e **3** ($C = 1 \text{ mmol L}^{-1}$) em DMF/TBABF₄ (0,1 mol L⁻¹). Eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ 88
- Figura 34** - Mecanismo proposto para reação química acoplada ao processo de formação ânion radical nitro.91
- Figura 35** - Voltamograma cíclico da *nor*- β -lapachona ($C = 1 \text{ mmol L}^{-1}$) em DMSO/TBAP (0,1 mol L⁻¹), eletrodo Hg, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ 92
- Figura 36** - Curva teórica desenvolvida para mecanismo de desproporcionamento e dimerização.93
- Figura 37** - Voltamograma cíclico de **1** ($C_1 = 1 \text{ mmol L}^{-1}$) em DMSO/TBAP (0,1 mol L⁻¹), eletrodo de Hg. **a**: Voltamograma em 100 mV s^{-1} . **b**: Dependência da corrente de pico para a primeira onda de redução em função da velocidade a velocidade varredura.94

Figura 38 - Dependência da razão I_{pa}/I_{pc} em relação à velocidade de varredura. DMSO/TBAP (0,1 mol L ⁻¹).	95
Figura 39 - a: Curva experimental da razão I_{pa}/I_{pc} em função do log de ω obtida para 1 . b: (■) Curva teórica para desproporcionamento; (●) Curva teórica de dimierização (Olmstead <i>et al.</i> 1969); (▲) Curva experimental de 1	96
Figura 40. Curva ω vs τ , DMSO/TBAP (0,1 mol L ⁻¹), de acordo com o procedimento teórico para a reação de desproporcionamento.	97
Figura 41 - Voltamogramas cíclicos de 2 ($C_2 = 1$ mmol L ⁻¹) em DMSO/TBAP (0,1 mol L ⁻¹). Eletrodo de Hg. a : Voltamograma a 100 mV s ⁻¹ . b : Dependência da corrente de pico para a primeira onda de redução em função da velocidade a velocidade varredura.	98
Figura 42 - Dependência da razão I_{pa}/I_{pc} em relação à velocidade de varredura. DMSO/TBAP (0,1 mol L ⁻¹).	98
Figura 43 - Curva ω vs τ , DMSO/TBAP (0,1 mol L ⁻¹) para 2 , de acordo com o procedimento teórico para reação de desproporcionamento.	99
Figura 44 - Voltamogramas cíclicos de 3 ($C = 1$ mmol L ⁻¹) em DMSO/TBAP (0,1 mol L ⁻¹). Eletrodo de Hg. a : Voltamograma a 100 mV s ⁻¹ . b : Estudo da primeira onda de redução em função da velocidade a velocidade varredura.	100
Figura 45 - Dependência da razão I_{pa}/I_{pc} em relação à velocidade de varredura. DMSO/TBAP (0,1 mol L ⁻¹).	101
Figura 46 - Curva ω vs τ , DMSO/TBAP (0,1 mol L ⁻¹) para 3 , de acordo com o procedimento teórico para reação de desproporcionamento.	101

- Figura 47** - Mecanismo de redução eletroquímica do nitroderivado **1** ao ânion radical semiquinona e subsequente reação química de desproporcionamento..... 103
- Figura 48** - Polarografia TAST para *nor*- β -lapachona (**a**) e os derivados nitroquinonas, **1** (**b**), **2** (**c**) e **3** (**d**), ($C = 1 \text{ mmol L}^{-1}$) em DMSO/TBAP ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de Hg. 104
- Figura 49** - Voltamogramas cíclicos comparativos da *nor*- β -lapachona e seus derivados nitrados **1**, **2** e **3** ($C = 1 \text{ mmol L}^{-1}$) em DMF/TBAPF₄ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de carbono vítreo, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ 107
- Figura 50** - Voltamogramas cíclicos de **1** (**a**) e **3** (**b**), $c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$, em CH₃CN/TBAPF₆ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), eletrodo de carbono vítreo. Voltamogramas obtidos em vários E_{λ} (potenciais de inversão), $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ 108
- Figura 51** - Espectro de EPR para a espécie eletrogerada a partir do composto **1** ($C = 1 \text{ mmol L}^{-1}$), CH₃CN/TBAPF₆ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), em banda de raio X (9,85 GHz), após eletrólise em potencial constante ($E_{ap.} = -1,30 \text{ V}$ vs Fc⁺/Fc) e estrutura do radical semiquinona gerado. Espectro experimental (●). Espectro teórico simulado (●)..... 110
- Figura 52** - Estrutura numerada dos nitroderivados da *nor*- β -lapachona (**1**, **2** e **3**)..... 111
- Figura 53** - Espectro de EPR para espécies eletrogeradas a partir do composto **1** ($c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$), CH₃CN/TBAPF₆ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), em banda de raio X (9,85 GHz), após eletrólise em potencial constante ($E_{ap.} = -1,80 \text{ V}$ vs Fc⁺/Fc). Espectro teórico simulado (●). Espectro experimental (●). 112

- Figura 54** - Espectro de EPR para espécies eletrogeradas a partir do composto **3** ($c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$), $\text{CH}_3\text{CN/TBABF}_6$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), em banda de raio X (9,85 GHz), após eletrólise em potencial constante ($E_{\text{ap.}} = - 1,30 \text{ V vs Fc}^+/\text{Fc}$) e estrutura do radical semiquinona. Espectro experimental (●). Espectro teórico simulado (●)..... 113
- Figura 55** - Espectro de EPR para espécies eletrogeradas a partir do composto **3** ($c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$), $\text{CH}_3\text{CN/TBABF}_6$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), em banda de raio X (9,85 GHz), após eletrólise em potencial constante ($E_{\text{ap.}} = - 1,80 \text{ V vs Fc}^+/\text{Fc}$). Espectro teórico simulado (●). Espectro experimental (●). 114
- Figura 56** - Possibilidade de ligação de hidrogênio intramolecular com o próton amino das nitroquinonas..... 116
- Figura 57** - Provável de mecanismo de redução da função quinona de **3** (QPh-*p*- NO_2) seguida por mecanismo de auto-protonação em meio aprótico. 117
- Figura 58** - Provável de mecanismo de redução da função quinona de **1** (QPh-*o*- NO_2) e **2** (QPh-*o*- NO_2) em meio aprótico..... 118
- Figura 59** - Voltamograma Cíclico da *nor*- β -lapachona ($c = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$) em meio aquoso etanólico (30%), tampão acetato pH 4,5. Eletrodo de carbono vítreo, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$119
- Figura 60** - Voltamogramas Cíclicos de **1** ($c = 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) em meio aquoso etanólico (30%) no sentido da redução (**a**) e oxidação (**b**), tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), pH 4,5. Eletrodo de carbono vítreo, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ 120
- Figura 61** - **a**: Voltamogramas Cíclicos de **2** ($c = 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) em meio aquoso etanólico (30%), tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), pH 4,5. **b**:

- Voltamogramas Cíclicos de **2** ($c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$) em meio aquoso etanólico (30%), tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), pH 4,5. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ 121
- Figura 62** - Voltamogramas Cíclicos de **3** ($C = 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) em meio aquoso etanólico (30 %), no sentido da redução (**a**) e oxidação (**b**), tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), pH 4,5. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ 122
- Figura 63** - **a**: Voltamograma Cíclico da *nor*- β -lapachona em DMF/TBABF₄ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), eletrodo de carbono vítreo, em presença de diferentes concentrações de oxigênio: (a) 0, (b) 0,075, (c) 0,125, (d) 0,84, (e) 0,246, $\beta = 100 \text{ mV s}^{-1}$. **b**: Curva de I_{p1c} / I_{p1a} em função da concentração de oxigênio..... 124
- Figura 64** - **a**: Voltamograma Cíclico de **1** em DMF/TBABF₄ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), eletrodo de carbono vítreo, em presença de diferentes concentrações de oxigênio: (a) 0, (b) 0,004, (c) 0,006, (d) 0,008, (e) 0,109, (f) 0,150, (g) 0,168, (h) 0,250 e (i) 0,340 mmol L^{-1} , $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. **b**: Curva de I_{pc1} / I_{pa1} em função da concentração de oxigênio..... 125
- Figura 65** - **a**: Voltamogramas cíclicos de **2** ($C_2 = 1 \text{ mmol L}^{-1}$) em DMF + TBABF₄ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), eletrodo de carbono vítreo, em presença de diferentes concentrações de oxigênio: (a) 0, (b) 0,096, (c) 0,131, (d) 0,165, (e) 0,200, (f) 0,237, (g) 0,318, (h) 0,806, (i) 1,42 mmol L^{-1} . $\beta = 100 \text{ mV s}^{-1}$. **b**: Curva de I_{pR1} / I_{pO1} em função da concentração de oxigênio..... 126
- Figura 66** - **a**: Voltamogramas cíclicos de **3** ($C_3 = 1 \text{ mmol L}^{-1}$) em DMF + TBABF₄ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), eletrodo de carbono vítreo, em presença de diferentes concentrações de oxigênio: (a) 0, (b) 0,0006, (c) 0,002, (d) 0,005, (e) 0,006, (f) 0,128, (g) 0,168, (h) 0,184, (i) 0,234 mmol L^{-1} . $v = 100$

mV s⁻¹. **b:** Curva de Ip_{R1} / Ip_{O1} em função da concentração de oxigênio..... 127

Figura 67 - a: VPD do biossensor de dsDNA, em ausência (●) e presença de **1** (●). VPD de **1**, em eletrodo de carbono vítreo (●). **b:** VPD do biossensor de dsDNA, em ausência de **1** (●) e presença de **1** (●). VPD de **1** em eletrodo de carbono vítreo (●) ($E_{ap} = - 0,8$ V). Todas a análises foram realizadas em meio aquoso etanólico (10%), tampão acetato (0,1 mol L⁻¹) pH 4,5, C = 0,05 mmol L⁻¹. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 5$ mV s⁻¹. 130

Figura 68 - a: VPD do biossensor de dsDNA em ausência (●) e após exposição (15 minutos) a **2** em 0,006 mmol L⁻¹ (●), 0,05 mmol L⁻¹ (●) e 0,02 mmol L⁻¹ (●). **b:** VPD do biossensor de dsDNA em ausência (●), e após exposição (15 minutos) a **2** em 0,02 mmol L⁻¹ (●) e VPD de **2** em eletrodo de carbono vítreo (●) na mesma concentração. Todas as análises foram realizadas em meio aquoso etanólico (10 %), (tampão acetato (0,1 mol L⁻¹), pH 4,5. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 5$ mV s⁻¹. 131

Figura 69 - VPD do biossensor de dsDNA, em ausência de **2** (●), em presença de **2** (●). VPD de **2** em eletrodo de carbono vítreo (●), com aplicação de potencial de redução ($E_{ap} = - 0,8$ V), $c = 0,02$ mmol L⁻¹. Todas a análises foram realizadas em meio aquoso etanólico (10%), tampão acetato (0,1 mol L⁻¹) pH 4,5. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 5$ mV s⁻¹. 132

Figura 70 - a: VPD do biossensor de DNA, em ausência (●) e presença de **3** (●). VPD de **3** em eletrodo de carbono vítreo (●). **b:** VPD do biossensor de DNA, em ausência de **3** (●), em presença de **3** (●). VPD de **3** em eletrodo de carbono vítreo (●), com aplicação de potencial de redução ($E_{ap} = - 0,8$ V), $c = 0,05$ mmol L⁻¹. Todas a análises foram

- realizadas em meio aquoso etanólico (10%), tampão acetato (0,1 mol L⁻¹) pH 4,5.. Eletrodo de carbono vítreo, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$ 133
- Figura 71** - Estrutura química das bases nitrogenadas do DNA..... 134
- Figura 72** - VPD do ssDNA em função da concentração de *nor*- β -lapachona (●) 0,01; (●) 0,02, (●) 0,06, (●) 0,10 e (●) 0,20 mmol L⁻¹. Meio aquoso etanólico (27%), tampão acetato (0,1 mol L⁻¹), pH 4,5. Eletrodo de carbono vítreo, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$ 135
- Figura 73** - a: VPD do ssDNA em função da concentração de **1** (●) 0, (●) 0,01; (●) 0,02, (●) 0,05, (●) 0,06 e (●) 0,07 mmol L⁻¹. b: Gráfico de corrente de pico de oxidação do ssDNA em função da concentração de **1**. Meio aquoso etanólico (27%), tampão acetato (0,1 mol L⁻¹), pH 4,5. Eletrodo de carbono vítreo, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$ 136
- Figura 74** - a: VPD do ssDNA em função da concentração de **2** (●) 0, (●) 0,005; (●) 0,01, (●) 0,02, (●) 0,03 e (●) 0,05 mmol L⁻¹. b: Gráfico de corrente de pico de oxidação de guanina e adenina em função da concentração de **2**. Meio aquoso etanólico (27%), tampão acetato (0,1 mol L⁻¹), pH 4,5. Eletrodo de carbono vítreo, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$ 136
- Figura 75** - a: VPD do ssDNA em função da concentração de **3** (●) 0, (●) 0,01; (●) 0,03, (●) 0,05, (●) 0,07 e (●) 0,1 mmol L⁻¹. b: Gráfico de corrente de pico de oxidação de guanina e adenina em função da concentração de **2**. Meio aquoso etanólico (27%), tampão acetato (0,1 mol L⁻¹), pH 4,5. Eletrodo de carbono vítreo, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$ 137
- Figura 76** - (a) Estrutura funcional da β -ciclodextrina (Budal, 2003). (b) Estrutura química da β -ciclodextrina..... 139
- Figura 77** - Voltamogramas Cíclicos da *nor*- β -lapachona (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 7,4, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ 140
- Figura 78** - Estrutura proposta para o complexo *nor*- β -lapachona- β -CD: (a) inclusão a partir do anel aromático e (b) inclusão a partir da do anel diidrofurano. 141
- Figura 79** - **a:** Voltamogramas Cíclicos de **1** (0,1 mmol L⁻¹) em diferentes concentrações de β -CD, (●) 0, (●) 0,01, (●) 0,1 e (●) 1 mmol L⁻¹, tampão fosfato pH 7,4. **b:** Voltamogramas Cíclicos de **1** (0,1 mmol L⁻¹) com adição de diferentes concentrações de β -CD, (●) 0, (●) 0,01, (●) 0,1 e (●) 1 mmol L⁻¹, tampão fosfato pH 7,4 + EtOH (5%). Eletrodo de carbono vítreo, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ 142
- Figura 80** - Estrutura proposta para o complexo de inclusão **1**- β -CD..... 143
- Figura 81** - **a:** Voltamogramas Cíclicos de **2** (0,1 mmol L⁻¹) em diferentes concentrações de β -CD, (●) 0, (●) 0,01, (●) 0,1 e (●) 1 mmol L⁻¹. **b:** Voltamogramas em varreduras sucessivas de **2** (0,1 mmol L⁻¹) em presença β -ciclodextrina (0,01 mmol L⁻¹), em eletrodo de carbono vítreo, tampão fosfato pH 7,4, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ 144
- Figura 82** - **a:** Voltamogramas Cíclicos de **2** (0,1 mmol L⁻¹) em diferentes concentrações de β -CD, (●) 0, (●) 0,01, (●) 0,1 e (●) 1 mmol L⁻¹ **b:** Voltamogramas em varreduras sucessivas de **2** (0,1 mmol L⁻¹) em presença β -CD (0,01 mmol L⁻¹). Tampão fosfato pH 7,4 + EtOH (5%), eletrodo de carbono vítreo, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ 145
- Figura 83** - Estrutura proposta para o complexo de inclusão **2**- β -CD..... 145
- Figura 84** - **a:** Voltamogramas Cíclicos de **3** (0,1 mmol L⁻¹) em diferentes concentrações de β -CD, (●) 0, (●) 0,01, (●) 0,1 e (●) 1 mmol L⁻¹,

tampão fosfato pH 7,4. **b:** Voltamogramas Cíclicos de **3** (0,1 mmol L⁻¹) com adição de diferentes concentrações de β-CD, (●) 0, (●) 0,01, (●) 0,1 e (●) 1 mmol L⁻¹, tampão fosfato (pH 7,4) + EtOH (5%). Eletrodo de carbono vítreo, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ 146

Figura 85 - Estrutura proposta para o complexo de inclusão **3**-β-CD..... 147

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Atividade Citotóxica expressa por CI_{50} em μmolL^{-1} para linhagens de células cancerosas: HL – 60: Leucemia; MDA- MB435: Melanoma; SF295: Glioblastoma; HTC 8: Carcinoma de Cólon; DU 145: Carcinoma de próstata; PC-3: Carcinoma de Próstata; CMSP: Células Mononucleadas de Sangue Periférico, após 72 horas de exposição ao composto (via MTT e Alamar Blue).67
- Tabela 2** - Atividade frente formas tripomastigotas do *T. cruzi*.67
- Tabela 3** - Parâmetros eletroquímicos da *nor*- β -lapachona e seus derivados. Eletrodo de Carbono Vítreo, E_p vs. $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{Cl}^-$ 0,1 mol L^{-1} , $v = 100$ mV s^{-1}89
- Tabela 4** - Parâmetros eletroquímicos obtidos para os derivados da *nor*- β -lapachona. Análise da estabilidade do intermediário gerado no primeiro processo de redução. Eletrodo de Mercúrio, E_p vs. $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{Cl}^-$ 0,1 mol L^{-1} , meio DMSO/TBAP (0,1 mol L^{-1}). 102
- Tabela 5** - Parâmetros eletroquímicos obtidos para *nor*- β -lapachona e seus derivados. Eletrodo de Hg, E_p vs. $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{Cl}^-$ 0,1 mol L^{-1} meio DMSO/TBAP (0,1 mol L^{-1}). 105
- Tabela 6** - Valores de potencial para os compostos **1** e **3**, em eletrodo de carbono vítreo, E_p vs. vs Fc/Fc^+ 109
- Tabela 7** - Valores potenciais de pico catódico para a *nor*- β -lapachona e nitroquinonas em eletrodos de carbono vítreo (**ECV**) e mercúrio (**Hg**). 115

Tabela 8 - Potencias de pico para as nitroquinonas em meio aquoso/etanólico, eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$	122
Tabela 9 - Parâmetros eletroquímicos relacionados ao mecanismo de redução da <i>nor</i> - β -lapachona e seus derivados. Parâmetros cinéticos, reatividade com oxigênio e com DNA, obtidos por métodos eletroquímicos e, percentagem de decréscimo das correntes de pico referentes à oxidação das bases guanina (G) e adenina (A) do ssDNA.	150
Tabela 10 - Determinação dos valores de Cl_{50} para as nitroanilinas precursoras. .	153

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

A	oxidante ou acceptor de elétrons
CAT	catalase
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico.
dsDNA	ácido desoxirribonucléico em fita dupla (ou dupla hélice)
E_{ap}	potencial aplicado
E_{pc}	potencial de pico catódico
E_{pa}	potencial de pico anódico
$E_{p1/2}$	potencial a meia altura da onda
E_{redox}	potencial a meia altura da onda
E_{λ}	potencial de inversão
EPR	ressonância do spin do elétron
ERO	espécies reativas de oxigênio
ERN	espécies reativas de nitrogênio
EtOH	etanol
F	constante de Faraday (96485 C)
GPx	glutaciona peroxidase.
GR	glutaciona redutase
GST	glutaciona S-transferase
GSH	glutaciona reduzida.
GSSG	glutaciona oxidada
HFCC	constante de acoplamento hiperfina
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
I_d	corrente difusional
I_{pc}	corrente de pico catódica
I_{pa}	corrente de pico anódica
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolina
n	número de elétrons
Ox	espécie oxidada
pH	potencial hidrogeniônico
R	constante dos gases

Red	espécie reduzida
ssDNA	ácido desoxirribonucléico em fita simples (ou simples hélice).
S.O.D.	superóxido-dismutase.
T	temperatura em Kelvin
TBAP	perclorato de tetrabutílamônio
TBABF₄	tetrafluorborato de tetrabutílamônio
VC	voltametria cíclica
VPD	voltametria de pulso diferencial
ΔE_p	diferença de potencial de pico
v	velocidade de varredura de potencial.
$v^{1/2}$	raiz quadrada da velocidade de varredura.
ΔG	energia livre Gibbs

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
1.1	Considerações Gerais	29
1.2	Relevância da Eletroquímica em Química Medicinal	31
1.3	Quinonas e Nitroaromáticos	45
1.3.1	Quinonas.....	46
1.3.2	Compostos Nitroaromáticos.....	53
1.4	Biossensor Eletroquímico de DNA	57
1.5	Sobre Nitroquinonas	64
2	OBJETIVOS	69
2.1	Geral	69
2.2	Específicos	69
3	EXPERIMENTAL	70
3.1	Reagentes e Solventes	70
3.2	Estudos Eletroquímicos	71
3.2.1	Estudos em Meio Aprótico	71
3.3	Estudos em Meio Prótico - Reatividade frente ao ssDNA	77
3.3.1	Estudos em Biossensor de dsDNA.....	77
3.3.2	Preparação do Gel de dsDNA	78
3.3.3	Condicionamento do Eletrodo	78
3.3.4	Estudo da Interação das Substâncias Estudadas com dsDNA	78
3.3.5	Preparação da Solução de ssDNA	79
3.3.6	Estudo da Interação das Substâncias com ssDNA	79
3.4	Estudo da Interação da <i>Nor</i>-β-lapachona e Derivados com β-ciclodextrina (β-CD).....	80
3.5	Análise da Citotoxicidade de <i>o</i>-, <i>m</i>- e <i>p</i>-nitroanilinas <i>in vitro</i> – Ensaio do MTT.....	80
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
4.1	Estudos em Meio Aprótico	83

4.1.1	Estudo em Eletrodo de Carbono Vítreo	83
4.1.2	Estudos em Eletrodo de Mercúrio.....	90
4.2	Estudos em Espectroeletrólítica.....	106
4.3	Racionalização dos Resultados em Meio Aprótico	115
4.4	Estudos em Meio Prótico.....	118
4.5	Estudo em Presença de Oxigênio	123
4.6	Estudos em Biossensor de dsDNA.....	128
4.7	Estudos em ssDNA	134
4.8	Comportamento Eletroquímico das Nitroquinonas em Presença de β-ciclodextrina	138
4.9	Atividade Biológica e Comportamento Eletroquímico da <i>Nor</i>-β- lapachona e Nitroquinonas	147
5	CONCLUSÕES.....	155
	PERSPECTIVAS	157
	REFERÊNCIAS.....	158

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

O estudo das reações de transferência de elétrons constitui uma ferramenta valiosa para compreensão dos inúmeros eventos que ocorrem em nível biológico e, deste modo, contribuem de forma significativa para a química medicinal. A maioria dos processos biológicos envolve reações de oxi-redução e estes, por sua vez, são responsáveis por funções vitais e de manutenção da integridade celular. Desta forma, uma vez que tais eventos são uma consequência das reações de transferência de elétrons, que dependem do estado redox da célula, a eletroquímica pode contribuir de forma muito efetiva na compreensão dos mesmos. Embora o termo estado redox celular não seja facilmente definido, uma vez que este é consequente de pares de substâncias com capacidade redutora/oxidante, estudos têm demonstrado que células e/ou tecidos estão sujeitos a estresse oxidativo ou redutivo quando os pares de substâncias responsáveis pela manutenção das funções vitais se encontram em desequilíbrio (Schafer & Buettner, 2001; De Abreu *et al.*, 2002; Hillard *et al.*, 2008).

Nos seres humanos, a energia necessária para construção de estruturas celulares, assim como a manutenção destas, é obtida a partir de processos redox, em que moléculas orgânicas doam elétrons ao oxigênio, repercutindo num ambiente redutor em células e tecidos. Esses pares redox são responsáveis pelo fluxo de elétrons e, conseqüentemente de mudanças entre um ambiente redutor/oxidante, podendo atuar de forma interligada. O termo estado redox é usado em referência à razão entre as formas reduzida e oxidada em um par redox específico, como por exemplo, no caso do par GSSG/2GSH, que é considerado o tampão redox celular. Assim, o estado redox desse par poderia ser usado para indicar o ambiente redox celular (Schafer & Buettner, 2001).

Nos seres humanos, a energia necessária à execução das funções biológicas advém de processos de oxidação/redução, em que pares redox são responsáveis pelo fluxo de elétrons, promovendo uma mudança no ambiente redox celular, com consequente liberação de energia. O ambiente redox de um conjunto de pares redox interligados como encontrado em fluídos biológicos, organelas, células, ou tecidos é a soma dos produtos do potencial de redução e da capacidade redutora dos pares

redox presentes. Desta forma, em nível celular, a capacidade redutora pode ser estimada pela determinação da concentração de espécies reduzidas em um par redox, enquanto que o potencial de redução pode ser obtido através da equação de Nernst (Schafer & Buettner, 2001). Em termos matemáticos, esta consideração pode ser representada pela equação abaixo:

$$\text{Balanço redox} = \sum_{i=t}^{n(\text{acoplados})} E_i \times [\text{espécies reduzidas}]_i \quad \text{eq 1}$$

Em que E_i é o potencial de redução da semi-célula para um dado par redox e $[\text{espécies reduzidas}]_i$ é a concentração das espécies reduzidas em um par redox.

Desta forma, vale ressaltar a importância da equação de Nernst, que permite determinar a voltagem de uma célula eletroquímica (ΔE), uma vez que a mesma incorpora a energia de Gibbs (ΔG) e a expressão de ação das massas (Q). Esta equação tem amplas aplicações nas reações eletroquímicas biológicas, que são responsáveis pela produção de energia e para construção e manutenção das estruturas necessárias a um organismo. Como nos organismos vivos os eventos não ocorrem sob condições padrões, a relação pode ser derivada a partir de um processo como representado a seguir:



sendo que o potencial da célula eletroquímica pode ser expresso então pela equação de Nernst:

$$\Delta E = \Delta E^0 - \frac{RT}{nF} \ln Q \quad \text{eq 3}$$

em que n é o número de elétrons transferidos na reação redox, F é a constante de Faraday ($F = 96485 \text{ coulombs mol}^{-1}$), R é a constante dos gases ($R = 8,314 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$) e T , a temperatura em Kelvin.

No entanto, do ponto de vista termodinâmico, a célula não se encontra em equilíbrio com o ambiente, isto só ocorre quando a mesma morre, cujo $\Delta E = 0$. Dentro da célula, as reações químicas tentam atingir o equilíbrio, porém, isto é permitido somente para algumas reações selecionadas, como as reações de degradação de açúcares. Assim, para a manutenção da estrutura e funções

celulares é requerido que muitas reações químicas não atinjam o equilíbrio. Contudo, em curtos períodos de tempo, a concentração destes pares redox e a razão $[Ox]/[Red]$ não muda, sendo, portanto, possível a aplicação da equação de Nernst, eq. 3.

1.2 Relevância da Eletroquímica em Química Medicinal

A mudança no balanço redox celular tem sérias conseqüências nos processos biológicos, como o desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidante resultando no estresse oxidativo (Valko *et. al*, 2004). Uma vez que o ambiente redox de uma célula viva está relacionado essencialmente a sua capacidade de redução ou oxidação, esta capacidade é inerente ao estado dos pares redox, presentes na célula, sendo alguns diretamente acoplados e interagindo via processos enzimáticos, definidos de várias maneiras, como em termos do par $NAD^+/NADH$, $NADP^+/NADPH$ ou $GSSG/2GSH$ (Hillard *et. al*, 2008). O ciclo redox da glutatona (GSH) e de proteínas sensíveis a processos redox, como a glutatona S-transferase (GST) e tioredoxina constituem o sistema antioxidante primário da célula frente a espécies reativas (Fernández-Checa, 2003).

Outras implicações conseqüentes do desbalanço redox celular incluem alterações nos processos de síntese de DNA e RNA, síntese de proteínas, ativação de enzimas, e mesmo a regulação do ciclo celular. Desta forma, o ambiente redox celular controla o ciclo celular, determinando se uma célula irá proliferar, diferenciar ou morrer (Schafer & Buettner, 2001).

O estresse oxidativo é uma importante conseqüência do desbalanço redox, sendo o resultado da produção descontrolada de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN). A geração destas espécies pode ocorrer endogeneamente durante diversas atividades metabólicas da célula. Em células de mamíferos, a maior fonte de espécies reativas de oxigênio intracelular é a mitocôndria (Hileman *et al.*, 2004). Tanto a geração de espécies reativas de EROs quanto de ERN, que resultam do estresse oxidativo, tem despertado grande interesse devido ao papel biológico duplo que apresentam (Valko, *et al.*, 2006). A produção de ERO e de ERN é parte integrante do metabolismo humano e é

observada em diversas condições fisiológicas, como por exemplo, na fagocitose, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor, na apoptose, no controle da pressão sanguínea (Vasconcelos *et al.*, 2007).

Em condições de superprodução de espécies reativas de oxigênio, estas podem atuar como mediadoras em processos danosos à estrutura celular. Todas as espécies reativas têm potencial para interagir com componentes celulares, incluindo o DNA ou com esqueleto de desoxirribose danificando as bases do DNA ou promovendo a quebra de fitas (Valko *et al.*, 2004). Espécies reativas podem promover a peroxidação de lipídios e membranas, gerando intermediários reativos ao DNA, que formam adutos com o DNA, promovem oxidação de proteínas e inativação de enzimas (Hileman *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2006). Algumas lesões oxidativas ao DNA são promutagênicas, desempenhando assim importante papel no desenvolvimento do câncer (Valko *et al.*, 2004).

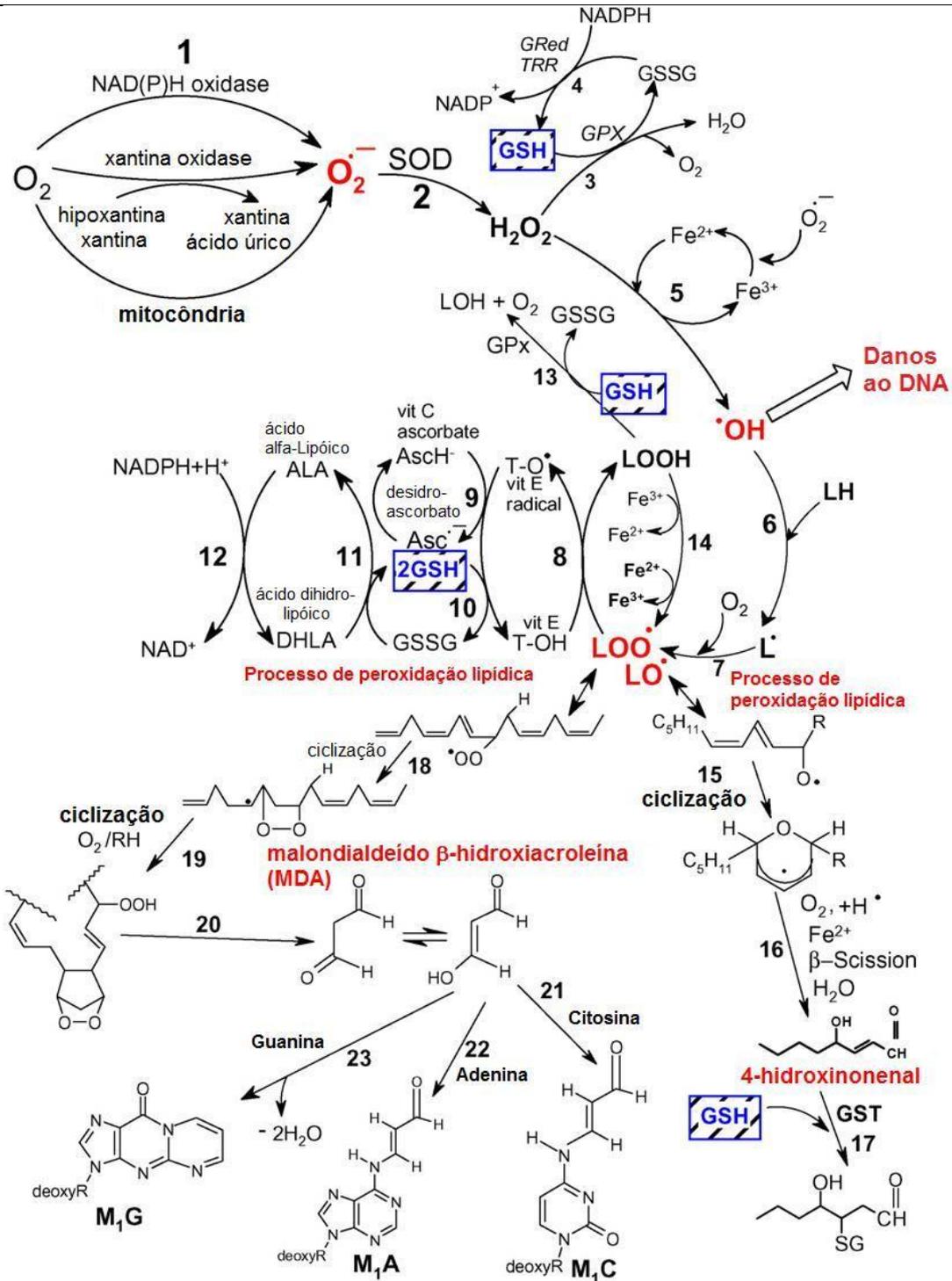
Em células aeróbias, a cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria e o retículo endoplasmático são as maiores fontes de espécies reativas de oxigênio, como o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Na mitocôndria a formação de EROs está associada a diversas condições, como patologias, processo de envelhecimento. No retículo endoplasmático, tais espécies resultam da perda ou doação de elétrons por parte do citocromo NADPH: P450 redutase, o sistema $FADH_2$ e citocromo b_5 ao oxigênio (Matés *et al.*, 2000; Fleury *et al.*, 2002). No organismo, o sistema antioxidante responsável pelo controle e restabelecimento do equilíbrio na produção de espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio são as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase e várias outras peroxidases (Vasconcelos, *et al.*, 2007).

Por definição, espécies reativas são entidades químicas, moléculas ou fragmentos de moléculas, contendo um ou mais elétrons desemparelhados em orbital atômico ou molecular. A presença de elétrons desemparelhados confere a estas espécies um alto grau de reatividade (Valko *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2006). As espécies reativas derivadas do oxigênio representam a classe mais importante nos sistemas vivos, sendo o próprio oxigênio molecular, no estado fundamental, possuidor de uma configuração eletrônica única que o caracteriza como um birradical. A adição de um elétron ao oxigênio resulta na formação do ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Este radical, advindo de processos metabólicos ou através da

ativação do oxigênio molecular por irradiação física, é considerado ERO primária. O ânion radical superóxido é capaz de reagir em etapas posteriores com outras moléculas para gerar espécies reativas secundárias, seja de forma direta, ou em processos catalisados por enzimas ou reações com metais. As diversas vias responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio, o sistema antioxidante responsável pelo controle e o dano decorrente da presença destas espécies é representado na Figura 1 (Valko *et al.*, 2007).

Figura 1. Vias de formação de ERO, o processo de peroxidação lipídica e do papel da glutatona (GSH) e outros antioxidantes (vitamina E, vitamina C, ácido lipóico), no manejo do estresse oxidativo (equações não balanceadas). Reação 1: O ânion radical superóxido é formado pelo processo da redução do oxigênio molecular mediado por enzimas oxidases NAD(P)H e xantina oxidase ou não enzimaticamente, por compostos redox-reativos, como o composto semi-ubiquinona da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons. Reação 2: o radical superóxido sofre dismutação pela superóxido dismutase (SOD) a peróxido de hidrogênio. Reação 3: o peróxido de hidrogênio é eliminado mais eficientemente pela enzima glutatona peroxidase (GPx) que requer GSH como doador de elétrons. Reação 4: a glutatona oxidada (GSSG) é reduzida de volta a GSH, pela enzima glutatona redutase (G_{red}) que utiliza NADPH como doador de elétrons. Reação 5: alguns metais de transição (por exemplo, Fe^{2+} , Cu^+ e outros) podem quebrar o peróxido de hidrogênio ao radical reativo hidroxila (reação de Fenton). Reação 6: o radical hidroxila pode abstrair um elétron a partir de ácidos graxos poliinsaturados (LH) para dar origem a um radical lipídico carbono-centrado (L^{\cdot}). Reação 7: o radical lipídico (L^{\cdot}) pode posteriormente interagir com o oxigênio molecular para gerar um radical peroxila lipídico (LOO^{\cdot}). Se o radical peroxila lipídico resultante LOO^{\cdot} não for reduzido pelo uso de antioxidantes, o processo de peroxidação lipídica ocorre (reações 18-23 e 15-17). Reação 8: o radical peroxila lipídico (LOO^{\cdot}) é reduzido dentro da membrana por uma forma reduzida da vitamina E (T-OH), resultando na formação de um hidroperóxido lipídico e um radical de vitamina E (TO^{\cdot}). Reação 9: a regeneração da vitamina E pela vitamina C: o radical de vitamina E (TO^{\cdot}) é reduzido novamente a vitamina E (T-OH) pelo ácido ascórbico (a forma fisiológica de ascorbato é a espécie monoaniônica ascorbato, $AscH^{\cdot}$) deixando para trás o radical ascorbila (Asc^{\cdot}). Reação 10: a regeneração da vitamina E por GSH: o radical de da vitamina E oxidada (TO^{\cdot}) é reduzido por GSH. Reação 11: a glutatona oxidada (GSSG) e o radical ascorbila (Asc^{\cdot}) são reduzidos de volta para GSH e à espécie ascorbato monoaniônica, $AscH^{\cdot}$, respectivamente, pelo ácido dihidrolipóico (DHLLA), que é convertido em ácido α -lipóico (ALA). Reação 12: a regeneração de DHLLA a partir de ALA usando NADPH. Reação 13: hidroperóxidos lipídicos são reduzidos a alcoóis e oxigênio molecular pela GPx, usando GSH como doador de elétrons. *O processo de peroxidação lipídica:* Reação 14: hidroperóxidos lipídicos podem reagir rapidamente com Fe^{2+} para formar radicais alcóxil lipídicos (LO^{\cdot}), ou muito lentamente com Fe^{3+} para formar radical peroxila lipídico (LOO^{\cdot}). Reação 15: radical alcóxila lipídico (LO^{\cdot}), por exemplo, derivado da reação de ciclização do ácido araquidônico sofre reação de ciclização para formar um hidroperóxido, em anel de seis membros. Reação 16: anel hidroperóxido de seis membros sofre reações posteriores (envolvendo β -cisão) para formar 4-hidroxinonenal. Reação 17: o 4-hidroxinonenal é transformado em um aduto inócuo glutatatil (GST, glutatona S-transferase). Reação 18: um radical peroxila localizado na posição interna do ácido graxo pode reagir por ciclização para produzir um peróxido cíclico adjacente a um radical carbono-centrado. Reação 19: Este radical pode ser reduzido para formar um hidroperóxido (reação não mostrada) ou pode sofrer uma segunda ciclização para formar um peróxido bicíclico que após o acoplamento ao oxigênio molecular e redução gera uma molécula estruturalmente análoga ao endoperóxido. Reação 20: o composto

formado é um produto intermediário para a produção de malondialdeído. Reações 21, 22, 23: malondialdeído pode reagir com as bases citosina, adenina e guanina do DNA para formar adutos M_1C , M_1A e M_1G , respectivamente.



Fonte: Valko *et al.*, 2007, adaptado.

A maior quantidade de ânion radical superóxido é gerada dentro da mitocôndria da célula através da cadeia de transporte de elétrons, que é a principal fonte de ATP em células de mamíferos e, portanto, essencial a vida. Durante o

processo de transdução de energia, ocorre a “perda” prematura de elétrons ao oxigênio, gerando o ânion radical superóxido, Figura 1, que está relacionado a várias condições patológicas (Valko *et al.*, 2007). Os parâmetros termodinâmicos envolvidos nas quatro etapas de redução monoelétrica do oxigênio à água são representados na Figura 2 (Valko *et al.*, 2004).

Figura 2. Potenciais padrão (E^0) de redução para o oxigênio molecular e espécies relacionadas (valores de E^0 (V) em solução aquosa com O_2 a 1 atm, pH = 7,0).

Redução de um elétron	E^0 (V) vs ECS
$O_2 + e^- \rightleftharpoons O_2^{\cdot -}$	- 0,33
$O_2^{\cdot -} + e^- + 2H^+ \rightleftharpoons H_2O_2$	+ 0,94
$H_2O_2 + H^+ + e^- \rightleftharpoons HO^{\cdot} + H_2O$	+ 0,38
$HO^{\cdot} + H^+ + e^- \rightleftharpoons H_2O$	+ 2,33
Redução de dois elétrons	
$O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons H_2O_2$	+ 0,30
$H_2O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons 2H_2O$	+ 1,35
Redução de quatro elétrons	
$O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightleftharpoons H_2O_2$	+ 0,82

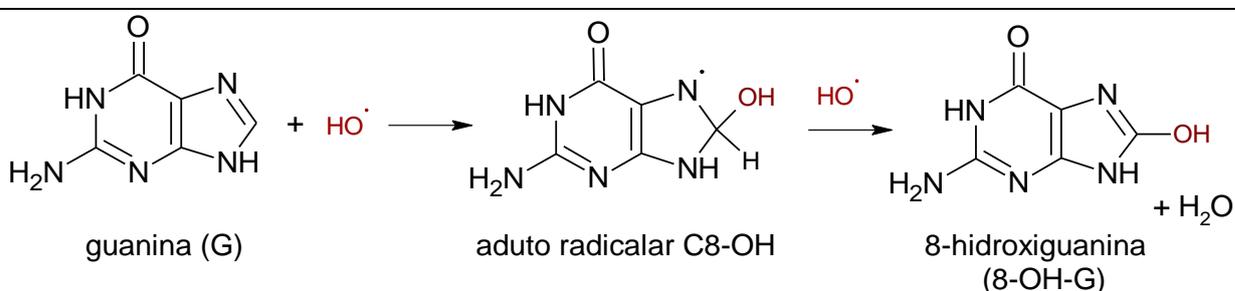
Fonte: Valko *et al.*, 2004, adaptado.

Como observado na Figura 1, as espécies reativas estão relacionadas a uma cascata de reações, tendo as biomoléculas, como alvos importantes. Uma consequência deste efeito são as mutações permanentes do material genético pelo ataque de espécies reativas, que representam as etapas iniciais envolvidas nos processos de metagênese, carcinogênese e envelhecimento (Valko *et al.*, 2007). Nesse sentido, papel importante é atribuído ao radical hidroxila, forma neutra do íon hidróxido, produzido a partir da reação catalítica com ferro II (reação de Fenton), uma espécie altamente reativa, que possui um tempo de meia vida curto ($\sim 10^{-9}$ s). No organismo, a maior parte do ferro (65 %) está ligada à hemoglobina, 10% constitui a mioglobina, citocromos e enzimas que contém ferro, enquanto que 25% está ligado a proteínas que armazenam ferro, como ferritina e hemosiderina. Aproximadamente 0,1% do ferro corporal circula no plasma como reservatório permutável, essencialmente ligado à transferrina, sendo os processos de absorção e armazenamento desse metal regulados por proteínas reguladoras de ferro. A

desregulação da expressão dessas enzimas pode ser prejudicial ou até mesmo letal (Jomova & Valko, 2011).

É bem sabido que vários tecidos cancerosos decorrem de danos ao DNA, sendo o radical hidroxila, gerado no processo supracitado, um poderoso oxidante frente às bases desta biomolécula. É relatado que o dano ao DNA resulta na geração de mais de 100 produtos, contudo, a 8-hidroxi guanina (8-OH-G), produto da adição do radical hidroxila a ligação dupla da guanina, o mais conhecido, Figura 3 (Jomova & Valko, 2011).

Figura 3. Reação de guanina com radical hidroxila.



Fonte: Jomova & Valko, 2011.

Desta forma, de grande importância é a concentração de oxigênio na célula. Alguns tecidos, por exemplo, tumores sólidos, apresentam regiões com baixa concentração de oxigênio (hipóxia). A concentração de O₂ influencia profundamente o resultado das reações eletroquímicas biológicas (Goulart *et al.*, 2006). Os fármacos ativados em situações de hipóxia apresentam amplas aplicações, principalmente, por suplantarem a resistência de células tumorais hipóxicas à radioterapia. As propriedades-chave de tais fármacos incluem propriedades redox apropriadas, para ativação por redutases biológicas e para reação com oxigênio de tal modo que níveis normais de oxigênio possam inibir ou reverter o processo de redução (Oliveira & Alves, 2002). Nesse sentido, o câncer é a doença-alvo para a maioria desses pró-fármacos. É a área onde a maioria dos estudos de correlação entre parâmetros eletroquímicos e atividade biológica foi e é realizada (Goulart *et al.*, 2006).

O câncer é uma das doenças que mais causam temor na sociedade, por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor (Almeida *et al.*, 2005). Em princípio,

concebeu-se que o câncer resultava de um crescimento celular realizado de uma maneira descontrolada. Atualmente, é aceito que o câncer é consequência de mutações dentro do ciclo celular, de modo que células em condições de injúria ou mutação que normalmente morreriam, seguem o ciclo celular, acumulando mutações (Foster, 2008).

As alterações que geram as neoplasias podem ocorrer em genes especiais denominados protooncogenes, que a princípio são inativos em células normais. Quando ativados, os protooncogenes transformam-se em oncogenes, responsáveis pela malignização (transformação) das células normais (Almeida *et al.*, 2005). Geralmente, o câncer é descrito como sendo uma doença da diferenciação celular ou doença de origem celular. Seu processo de desenvolvimento é caracterizado pela ação cumulativa de múltiplos eventos ocorrendo em uma única célula e pode ser descrito em três estágios: iniciação, promoção e progressão. Espécies reativas de oxigênio (ERO) podem atuar em todos estes estágios (Valko *et al.*, 2006).

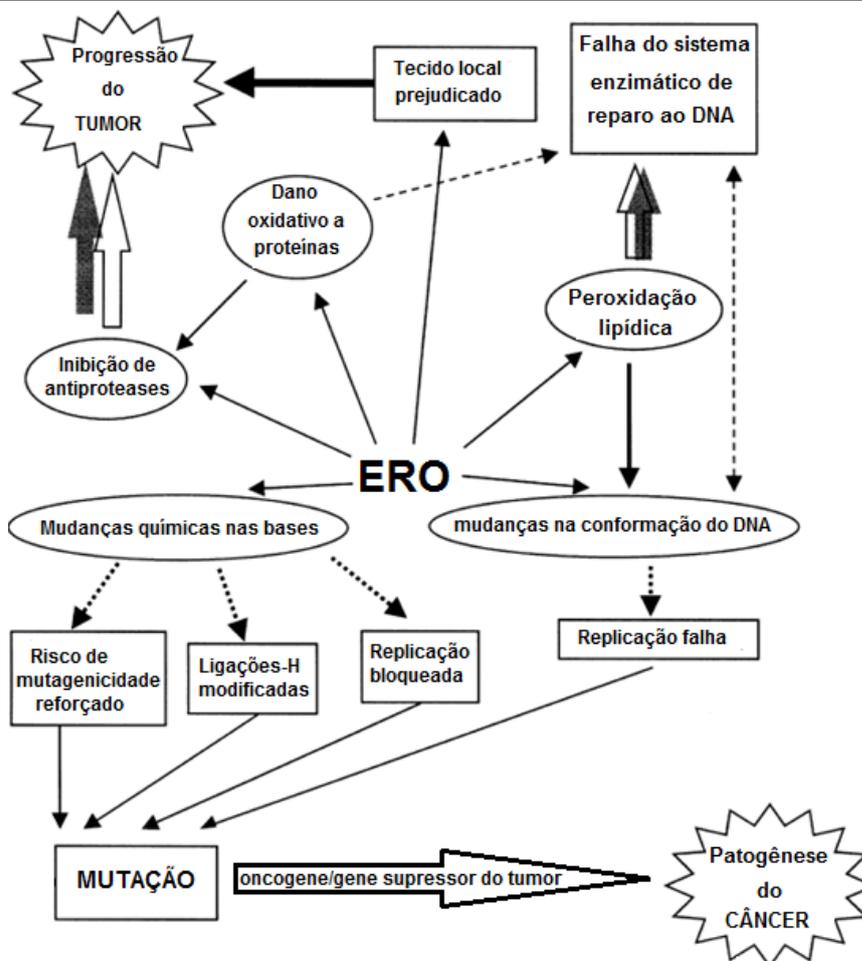
Na iniciação, EROs são responsáveis pelo dano oxidativo às bases do DNA, tendo como resultado uma alteração celular reversível. A promoção corresponde ao estágio onde ocorre a proliferação das células inicialmente alteradas e/ou inibição da morte celular programada (apoptose). O último estágio do processo carcinogênico, a progressão, envolve mudanças celulares e moleculares que ocorrem a partir de um estágio pré-neoplásico a neoplásico. Este estágio é irreversível e caracterizado por um acúmulo adicional do dano genético, resultando na transição de célula benigna para maligna, com consequente desenvolvimento do tumor (Valko *et al.*, 2006). Uma vez formadas, as células se comportam de forma anormal e multiplicam-se de maneira descontrolada. Novos vasos sanguíneos são formados como resultado dessa multiplicação constante para que haja nutrição destas células, em um processo denominado angiogênese. A manutenção e o acúmulo de massa dessas células formam os tumores malignos e elas também podem adquirir a capacidade de se desprenderem do tumor e de migrar, invadindo inicialmente os tecidos vizinhos, podendo chegar ao interior de um vaso sanguíneo ou linfático e, através destes, disseminam-se, chegando a órgãos distantes do local onde o tumor se iniciou, formando as metástases (Almeida *et al.*, 2005).

As mutações no DNA correspondem à etapa crítica da carcinogênese e níveis elevados de lesões oxidativas ao DNA são observados em vários tumores. Assim, é observado que o processo carcinogênico está diretamente ligado ao dano oxidativo do DNA e o produto de sua oxidação, a 8-hidroxi guanina, que atua como uma espécie altamente mutagênica (Valko *et al.*, 2006; Jomova & Valko, 2011). Uma vez que os produtos da oxidação do DNA são mutagênicos e carcinogênicos, estes atuam como biomarcadores do estresse oxidativo de um organismo e do processo de carcinogênese. A Figura 4 representa os danos celulares provocados pelo excesso de espécies reativas de oxigênio com conseqüente mutação celular e câncer (Matés *et al.*, 2000).

No tratamento do câncer, os dois maiores problemas relacionados à quimioterapia resultam da falta de seletividade e resistência a fármacos. As estratégias que buscam aumentar a seletividade de fármacos se baseiam nas diferenças biológicas entre células normais e células cancerosas, e sobre a disponibilidade de agentes terapêuticos que têm como alvo eventos biológicos críticos a células cancerosas, mas não às células normais. As células cancerosas, em relação às normais, estão sob maior estresse oxidativo associado à transformação oncogênica, alterações na atividade metabólica e aumento na geração de EROs. O aumento da quantidade de EROs em células cancerosas pode ter conseqüências significativas, como a estimulação de proliferação celular, a promoção de mutações e instabilidade genética, e alterações na sensibilidade celular a agentes anticancerígenos (Pelicano *et al.*, 2004).

A heterogeneidade bioquímica das células cancerosas é a maior causa da resistência a fármacos durante a progressão da doença. Embora os mecanismos de resistência sejam complexos, dependentes do mecanismo de ação do agente anticancerígeno e de fatores genéticos das células, o dano ao DNA e mutações causadas por ERO podem fornecer um mecanismo pelo qual, variantes resistentes a fármacos evoluem constantemente. Contudo, as lesões celulares decorrentes da reatividade química de ERO, aliada ao fato que células cancerosas se encontram em estresse oxidativo pode fornecer uma possibilidade única de matar células cancerosas através de sua vulnerabilidade aos danos provocados por ERO (Pelicano *et al.*, 2004).

Figura 4. Em condições normais, a célula é capaz de desintoxicar os radicais, mas em excesso de ERO ocorre uma série de mudanças em macromoléculas e no ambiente celular, que podem levar ao acúmulo de mutações oncogênicas contribuindo, assim, para a patogênese do câncer e a promoção do tumor. Modificações químicas no DNA alteram a especificidade das ligações de hidrogênio, causam a abertura de anéis de purina e os produtos da fragmentação de pirimidinas impedem a replicação do DNA por meio de mudanças conformacionais que diminuem a eficiência das polimerases do DNA. Adicionalmente, o dano oxidativo a proteases e lesões locais em tecidos pode promover a progressão do tumor e metástase.



Fonte: Matés *et al.*, 2000, adaptado.

No processo de descoberta e/ou síntese de novos fármacos é de crucial relevância o conhecimento do destino metabólico do candidato a fármaco no corpo humano. O aumento no número de novas entidades químicas nos últimos anos requer técnicas de rastreamento rápido que possam prover informações confiáveis e acessíveis sobre a biotransformação. A eletroquímica é uma das técnicas mais sensíveis e versáteis disponíveis para o estudo de biomoléculas. Atualmente, os métodos eletroquímicos são considerados uma ferramenta útil para o estudo das reações de transferência de elétrons e podem ser usados para simular reações

redox biológicas (Garrido *et al.*, 2011). Nesse sentido, a eletroquímica constitui um método padrão para o estudo das reações redox e a literatura fornece vasto material sobre o uso de técnicas eletroquímicas com aplicação em biologia (Bard & Faulkner, 1990; Hillard *et al.*, 2008). É observado um conjunto de similaridades entre as reações biológicas e as eletroquímicas, no que se refere aos processos de transferência de elétrons (TE): a natureza heterogênea (interface eletrodo-solução, enzima-solução); os processos podem ocorrer tanto em meio aquoso quanto não-aquoso, em temperaturas similares e ambos os processos requerem uma orientação específica (Dryhurst *et al.*, 1977).

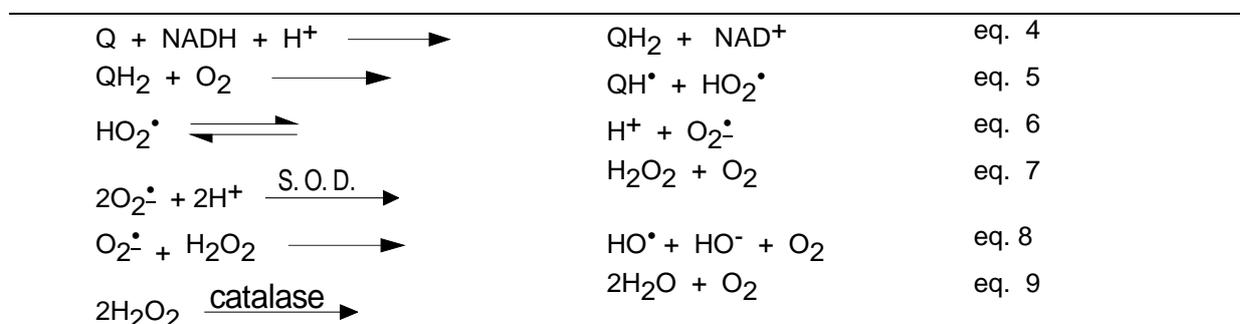
A eletroquímica atua como uma ferramenta útil que auxilia na elucidação do mecanismo de ação de fármacos ou até mesmo pode colaborar no planejamento de compostos biologicamente ativos. Várias técnicas eletroquímicas podem ser empregadas, sendo a voltametria cíclica uma das mais utilizadas. Estas permitem obter inúmeras informações a respeito dos processos de transferência de elétrons, inclusive biológicos. Os parâmetros eletroquímicos normalmente obtidos e empregados são os potenciais de oxidação (E_{pa}) e redução (E_{pc}) ou E_{redox} ($(E_{pc} + E_{pa})/2$) (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} . O potencial E_{redox} ou o parâmetro similar, $E_{1/2}$ (potencial a meia altura de onda, principalmente, em polarografia), fornece uma medida quantitativa da facilidade de redução de um oxidante ou acceptor de elétrons A, onde quanto mais anódico o potencial do par (A/A^{\bullet}), mais poderoso o oxidante. Similarmente, para valores de potencial (E) mais catódicos de (A^{\bullet}/A^{2-}), melhor agente redutor. Informações sobre parâmetros eletroquímicos constituem ferramentas das mais relevantes em Química Medicinal (De Abreu *et al.*, 2002).

No desenvolvimento racional de fármacos é fundamental o entendimento dos mecanismos de ação, através da identificação dos possíveis alvos celulares ou intermediários responsáveis pelo efeito desejado.

A despeito das amplas possibilidades do processo e da complexidade da química da célula/tecido, é possível racionalizar o papel da eletroquímica no campo da Química Medicinal em um arcabouço teórico definido e não muito extenso. Um

deles é relacionado ao duo Transferência de Elétrons-Estresse Oxidativo (TE-EO). A geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) por cicladores redox (agentes que sofrem reações redox, reversivelmente) ocorre via transferência de elétrons a classes de substâncias que contém “eletróforos”, como quinonas (ou precursores fenólicos), complexos metálicos (ou complexantes), nitrocompostos aromáticos (ou suas formas reduzidas) e iminas conjugadas (ou íons imínio) (Kovacic; Osuna, 2000), entre outras, que após sofrerem reações redox, estão aptas a transferir elétrons ao oxigênio, gerando o ânion-radical superóxido e uma cascata de outras espécies reativas, Figura 5.

Figura 5. Geração de espécies oxigenadas reativas após redução do grupo quinona e desintoxificação, pelo emprego de catalase e superóxido-dismutase (S.O.D.).



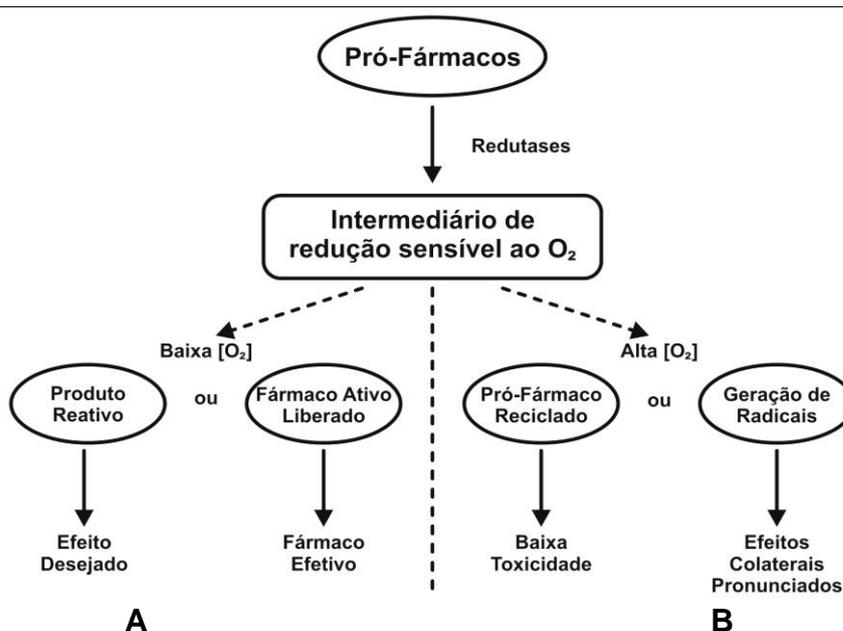
Fonte: Autor, 2011.

A alquilação após processos biorredox é o segundo dos mecanismos principais e descreve o efeito de compostos, que expressam seu modo de ação farmacológica como agentes alquilantes, mas o fazem após redução ou oxidação *in vivo*. A grande maioria destes agentes empregados clinicamente são pró-fármacos e se comportam como armadilhas eletrofílicas para nucleófilos moleculares ou endobióticos, após redução ou oxidação catalisada ou não por enzimas (Rajski & Williams, 1998). Os dois mecanismos, TE-EO ou alquilação biorredox, não são mutuamente exclusivos e podem ocorrer simultaneamente. A predominância de um sobre o outro depende tanto do balanço redox celular quanto do conteúdo de oxigênio dos sistemas biológicos envolvidos, como pode ser observado na Figura 6 (Wardman *et al.*, 2001).

Entre os compostos farmacologicamente ativos que atuam por este caminho, papel de destaque é atribuído às quinonas e aos nitroaromáticos. Esses fármacos podem ser metabolizados *in vivo*, formando intermediários reativos, que podem atuar

como cicladores redox ou como agentes alquilantes do DNA e, assim serem responsáveis por inúmeras atividades biológicas (Morales-Morales *et al.* 2007; Silva Júnior *et al.*, 2007). Entre as principais atividades para as classes em questão, destacam-se atividades antineoplásica, antifúngica, tripanossomicida. Assim, quinonas e nitroaromáticos, embora correspondam a uma classe bem estudada e difundida na literatura, continuam a despertar grande interesse por parte dos pesquisadores em Química Medicinal (Da Silva Júnior *et al.*, 2007; Cavalcanti, 2010; Da Silva Júnior *et al.*; 2010), em que mudanças estruturais de compostos cuja atividade já é conhecida ou síntese de novos compostos que contenham estes grupos funcionais tornam-se caminhos atrativos na busca de fármacos mais potentes e/ou seletivos para atuarem frente a patologias.

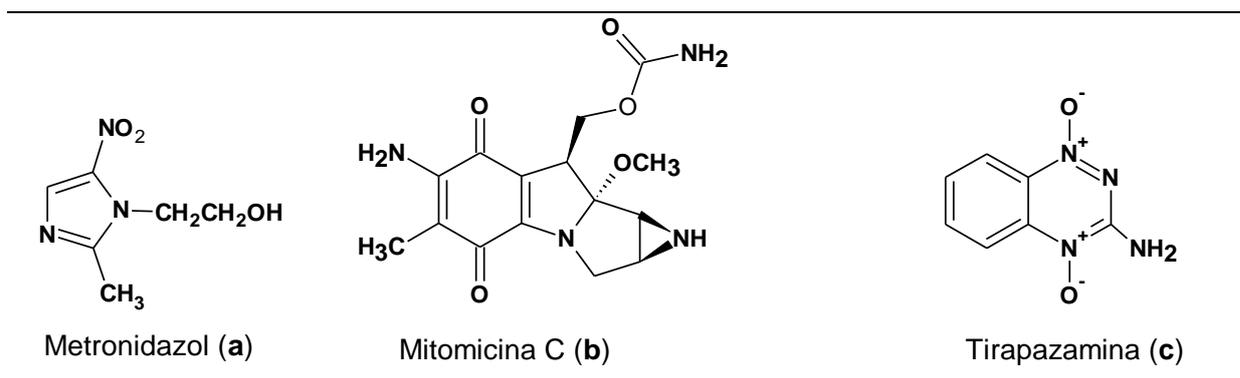
Figura 6. Representação de mecanismos pelos quais pró-fármacos ativados por biorredução exercem suas atividades farmacológicas. **A:** Ativação seletiva em hipóxia; **B:** Ativação em condições normóxicas, geração do Estresse Oxidativo.



Fonte: Wardman *et al.*, 2001, adaptado.

De modo geral, os fármacos biorredutíveis não são tão numerosos, correspondendo a três classes principais: os nitroaromáticos (a), compostos que possuem a função quinona (b) e N-óxidos (c), Figura 7, todos detentores de comprovada atividade anti-cancerígena seletiva a células hipóxicas, após redução biológica (Monge *et al.* 1995; Naughton, 2001; Moreno *et al.*, 2011).

Figura 7. Estruturas do metronidazol (a), mitomicina C (b) e tirapazamina (c)



Fonte: Autor, 2011.

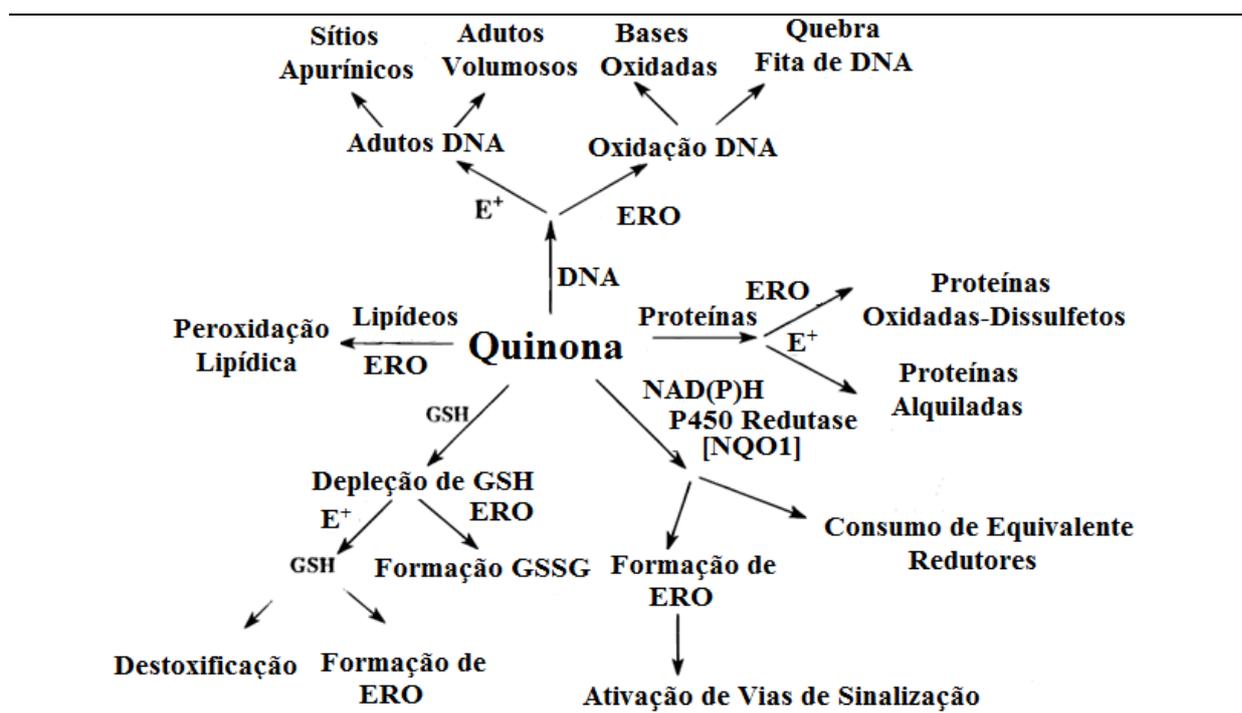
Os aspectos termodinâmicos não são, na maioria das vezes, suficientes, para a compreensão da atividade farmacológica de fármacos. Aspectos cinéticos revelam-se extremamente importantes na liberação de fármacos ativos ou na geração do Estresse Oxidativo nos sítios-alvo. Moléculas com baixa afinidade eletrônica (potenciais de redução mais negativos) são ativadas inadequadamente por enzimas, enquanto moléculas facilmente redutíveis podem ser rapidamente metabolizadas ou excretadas ou ainda ativadas fora do alvo (Kelson *et al.*, 1998). O potencial de redução do fármaco (que pode controlar a velocidade de reação), o pK_a do radical e a natureza cinética desse último podem influenciar tanto a atividade quanto a seletividade do fármaco (Yanagi *et al.*, 1974).

Do ponto de vista biológico, a ativação redutiva representa um elegante caminho para fármacos cujo alvo são células com limitada concentração de oxigênio. Os compostos nitroaromáticos apresentam extensa aplicação na clínica, sendo empregados no tratamento de infecções anaeróbicas, no tratamento do câncer como citotoxinas a células hipóxicas e como radiosensibilizadores (Squella *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2001), no tratamento de doenças causadas por protozoários parasíticos, como a doença de Chagas (Bollo *et al.*, 2005; Maya *et al.*, 2002).

Uma vez que ação farmacológica de muitos compostos biologicamente ativos decorre da geração do estresse oxidativo após transferência de elétrons, vale ressaltar que o mesmo é dependente do potencial de redução do fármaco. Quando o potencial de redução do grupo eletroativo é mais positivo que $-0,5$ V vs ENH (Eletrodo Normal de Hidrogênio), a ciclagem redox *in vivo* pode ocorrer. O resultado deste pré-requisito termodinâmico é a geração catalítica de grande quantidade de

EROs com conseqüentes efeitos tóxicos e benéficos (Kovacic & Osuna, 2000; Kovacic, 2007). Assim, é observado que fármacos com maior eletroafinidade (potencial de redução mais positivo) são geralmente mais tóxicos e mutagênicos e, também mais rapidamente metabolizadas (Gál *et al.*, 2010).

Figura 8. Sumário dos potenciais mecanismos de citotoxicidade de quinonas.



Fonte: Bolton *et al.*, 2000, adaptado.

Considerando que o estresse oxidativo resulta da transferência de elétrons ao oxigênio a partir dos intermediários de redução de grupos eletroativos, como quinona e nitro, informações valiosas sobre a cinética e a termodinâmica desses processos podem ser adquiridas pelos métodos eletroquímicos. Contudo, em muitas situações faz-se necessário a utilização de técnicas adicionais às eletroquímicas, que podem ser usadas concomitantemente ou alternativamente. Dentre estas, a ressonância do spin do elétron (EPR) auxilia de forma pontual na definição estrutural e na medida do tempo de vida de radicais eletrogerados (Goldberg *et al.*, 1996).

A Ressonância do Spin do Elétron (EPR), também conhecida por Ressonância Paramagnética do Elétron (RPE), é um processo de absorção ressonante de microondas por átomos, íons ou moléculas com ao menos um elétron desemparelhado (espécies paramagnéticas), em presença de um campo magnético estático. Esta técnica foi descoberta pelo físico russo Zavoiski, em 1945, sendo

atualmente aplicada em química, física, biologia e ciências médicas. A ESR é empregada para mapear a distribuição de um elétron desemparelhado em uma molécula fornecendo informações sobre os níveis de energia (De Moura, 2008). A técnica de ressonância do spin do elétron associada à eletroquímica, espectroeletroquímica, tem sido aplicada para caracterizar a presença dos intermediários radicalares gerados na eletrorredução de quinonas e nitroaromáticos (González *et al.*, 2007; Valle-Bourrouet *et al.*, 2010; Hernández-Muñoz *et al.*, 2010). Em estudo recente, a presença de dois intermediários radicalares gerados a partir da redução dos grupos quinona e nitroaromático (Hernández *et al.*, 2008), foi caracterizada por espectroeletroquímica.

Outro aspecto importante a ser considerado que interfere diretamente nas aplicações farmacêuticas de compostos orgânicos biologicamente ativos é a insolubilidade em meio aquoso. Os mecanismos de liberação de fármacos com intuito de aumentar suas características hidrofílicas, taxas de dissolução e biodisponibilidade constituem uma importante estratégia em Química Farmacêutica (Wemp *et al.*, 2008). Nesse sentido, a literatura relata a possibilidade de complexação entre moléculas orgânicas lipofílicas, íons inorgânicos, entre outros, com ciclodextrina. A formação de complexos de inclusão entre ciclodextrina e compostos biologicamente ativos pode aumentar a solubilidade desses compostos, bem como a biodisponibilidade e a liberação *in loco*, de compostos detentores de atividade biológica (Wang *et al.*, 2008). Nesse contexto, a eletroquímica pode auxiliar no entendimento dos mecanismos de inclusão por meio das mudanças observadas nas correntes e potenciais de pico relacionados a grupos eletroativos (De Abreu *et al.*, 2007).

1.3 Quinonas e Nitroaromáticos

As quinonas e nitroaromáticos apresentam uma gama atividades farmacológicas. São amplamente utilizados com agentes antitumoral, antiviral, antifúngico, tripanossomicida, entre outras atividades. O mecanismo de ação é similar, dependente de biorredução, tendo como alvos, importantes biomoléculas. Devido às características eletrofílicas dos grupos funcionais, vários mecanismos podem ser observados. Contudo, papel de destaque é atribuído à alquilação

bioredox e ciclagem redox com conseqüente geração do estresse oxidativo (Alegria *et al.*, 2004).

1.3.1 Quinonas

As quinonas são amplamente distribuídas na natureza e muito estudadas por apresentarem diversas atividades biológicas. Nos seres humanos, estas substâncias são encontradas como compostos endógenos, tais como a coenzima Q, Figura 9 (d) e os metabólitos do hormônio estrogênio, e como compostos exógenos, como os utilizados em clínica médica. Devido a sua importância para os seres humanos e sua alta reatividade, quinonas são muito estudadas do ponto de vista toxicológico (Alegria *et al.*, 2004).

Inúmeras quinonas desempenham papel vital na bioquímica de células vivas e exercem relevante atividade biológica. Na natureza, as quinonas estão envolvidas em etapas importantes do ciclo de vida dos seres vivos, principalmente nos níveis da cadeia respiratória e da fotossíntese, como as ubiquinonas (d) e as plastoquinonas (e), Figura 10. As naftoquinonas, como as vitaminas do tipo K (f), Figura 9, essencial aos seres vivos, possuem ação controladora da coagulação sanguínea (Silva *et al.*, 2003). Como carreadores de elétrons nos processos de fosforilação oxidativa que ocorre na mitocôndria, a formação de ATP é termodinamicamente favorecida como conseqüência da transferência de elétrons por quinonas e outras moléculas, a partir do NADH ou FADH₂ ao oxigênio molecular (Salas *et al.*, 2003).

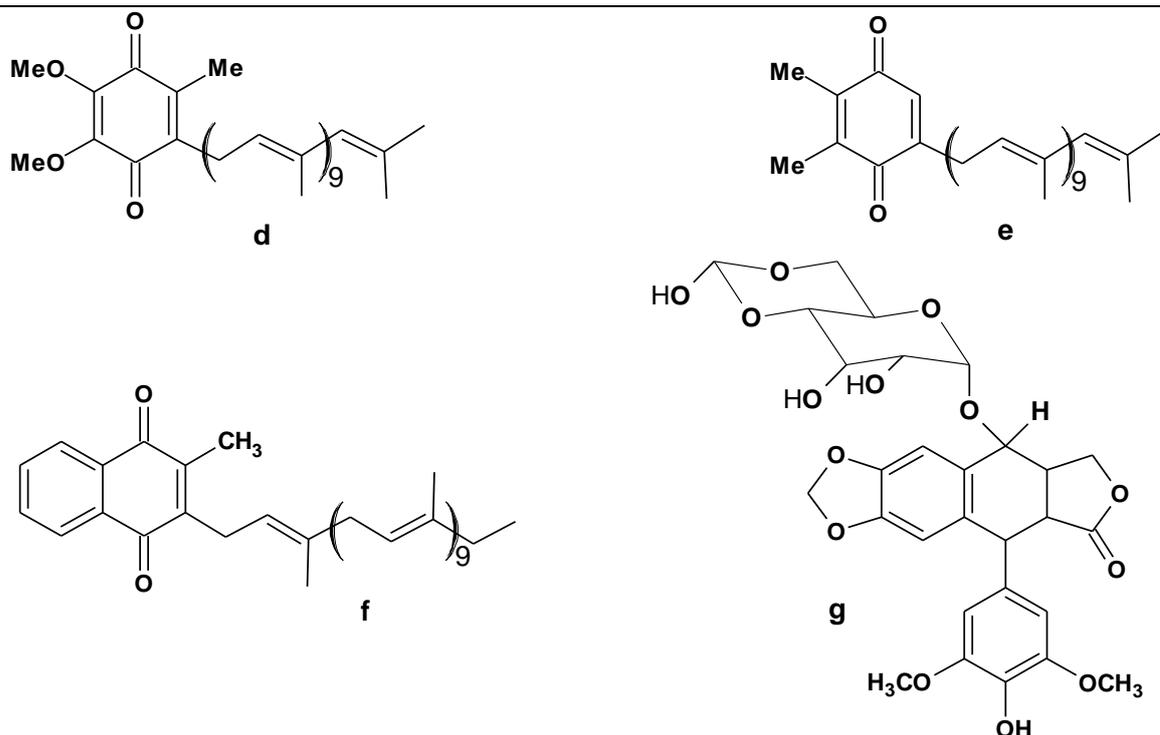
Os compostos quinonóides também apresentam um interessante espectro de atividades biológicas decorrentes de suas características oxidantes e eletrofílicas. Similarmente aos nitroaromáticos, estes compostos possuem a habilidade de, após transferência de elétrons (TE), gerarem espécies reativas de oxigênio (O₂^{•-}, H₂O₂, HO^{•-}) (Figura 6), com conseqüente estresse oxidativo (EO), ou atuarem como agentes alquilantes do DNA ou outras macromoléculas de relevância biológica. O interessante espectro de atividades biológicas de quinonas é sumarizado na Figura 8, que evidencia os dois mecanismos principais característicos das quinonas, a alquilação de biomoléculas e a ciclagem redox (Bolton *et al.*, 2000) Além de ciclagem redox e geração de EROs com conseqüente estresse oxidativo, outros

mecanismos de ação envolvem arilação, intercalação, indução de quebra de fitas do DNA, e alquilação via formação de intermediário quinonametídeo (Giuliv & Cadenas, 1994; Plyta *et al.*, 1998; Fisher *et al.*, 2007).

As quinonas correspondem a uma das classes mais importantes de agentes antitumorais (Bernardo *et al.*, 2004). Quinonas representam uma ampla classe de moléculas eletrofílicas que podem formar adutos covalentes com proteínas e produzir efeitos toxicológicos por meio deste mecanismo. Como cicladores redox, produzem EROs e posterior estresse oxidativo (Fisher *et al.*, 2007), conforme já demonstrado (Figura 8). Uma gama de atividades biológicas, incluindo atividades bactericida, fungicida, antiparasitária e inseticida é atribuída às quinonas (Babula *et al.*, 2009). Por serem moléculas eletrofílicas, compostos sulfidrílicos são alvos da reatividade química de quinonas. Glutationa (GSH), o maior tiol não protéico celular, atua como citoprotetor, ligando-se covalentemente a moléculas eletrofílicas, impedindo assim modificações covalentes em biomacromoléculas (Fisher *et al.*, 2007).

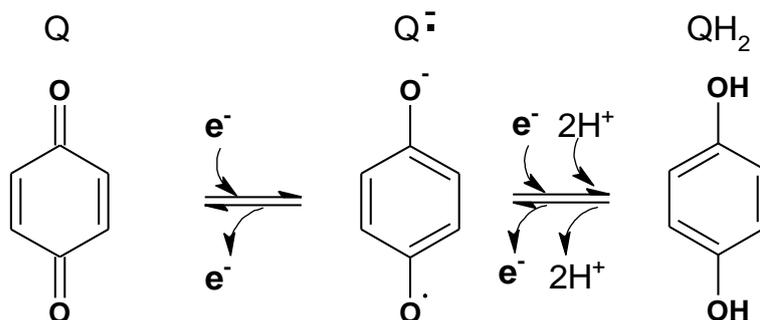
No desenvolvimento de fármacos, principalmente quimioterápicos que atuam como cicladores redox, quinonas apresentam extrema relevância. A bioativação de quinonas que atuam como agentes antineoplásicos têm sido muito estudada dentro do contexto químico-estrutural, o que pode resultar em diferentes mecanismos de bioativação e atividade (Gutierrez, 2000). Nesse contexto, muitos fármacos são derivados de quinonas, ou compostos como etoposídeo (**g**), Figura 9, que podem ser facilmente convertidos em quinonas por oxidação *in vivo*. O mecanismo está ligado aos processos redox catalisados por sistema enzimático, sendo as atividades biológicas centradas nas ligações *orto* e *para*-quinonóide, aceptores de elétrons capazes de formar ânions radicais, diânions ou espécies protonadas, Figura 10 (da Silva Júnior *et al.*, 2007; Nowicka & Kruk, 2010).

Figura 9. Estruturas químicas de ubiquinonas (**d**), plastoquinonas (**e**) e vitamina tipo K (**f**).



Fonte: Autor, 2011.

Figura 10. Processo de redução de quinonas (Q), formando ânion radical ($Q^{\cdot-}$), uma semiquinona instável, pode ser estabilizado pela interação com proteínas, e a hidroquinona (QH_2), forma estável.

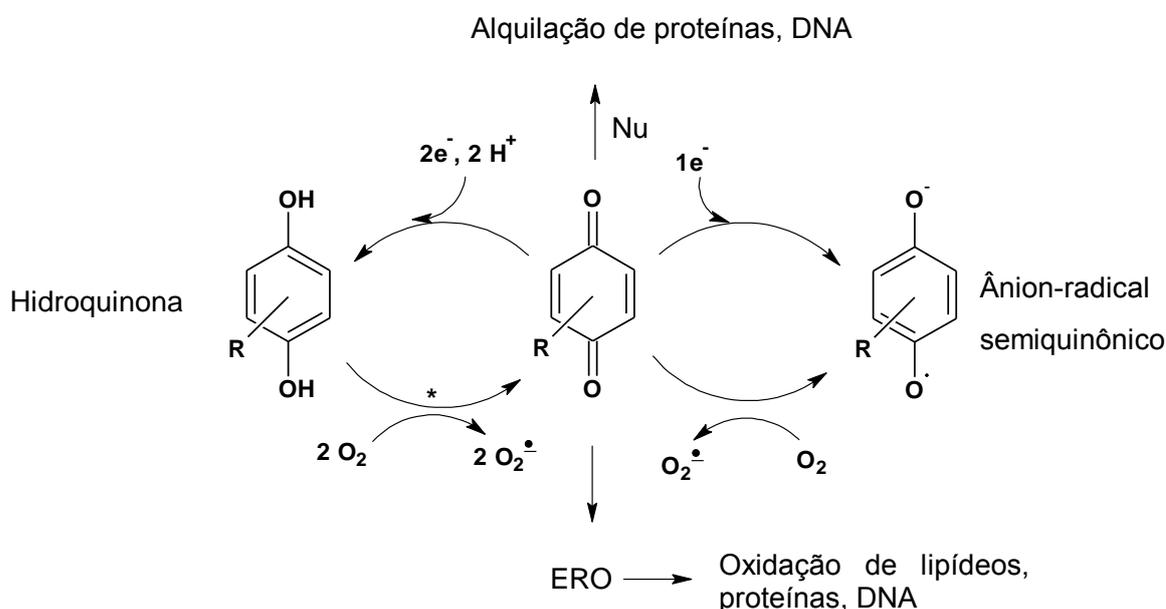


Fonte: Autor, 2011.

Em nível biológico, as quinonas são reduzidas em etapas que envolvem o consumo de um e/ou dois elétrons, catalisadas por sistema enzimático. A redução via consumo de um elétron se dá através das enzimas NADPH:citocromo P450 redutase microssômica, NADPH: citocromo b_5 redutase microssômica e NADPH:ubiquinona oxirredutase mitocondrial. Para o processo redox envolvendo

dois elétrons as enzimas que o catalisam são a NAD(P)H:quinona oxidoreductase, também denominada enzima DT-diaforase e a lipoamida desidrogenase (Giuliv & Cadenas, 1994; Bolton *et al.*, 2000; Ross *et al.*, 2000; Gutierrez 2000). No decorrer dos processos supracitados, reações secundárias justificam as propriedades farmacológicas destas substâncias, como observado na Figura 11.

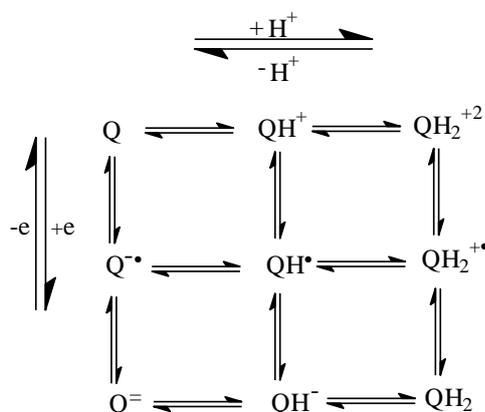
Figura 11. Processo de redução de quinonas. Alquilação e ciclagem redox com conseqüente formação de adutos e geração de ERO. O processo indicado pelo (asterisco) ocorre apenas para quinonas que autooxidam.



Fonte: Bolton *et al.*, 2000, adaptado.

A facilidade de redução observada para quinonas, Figura 11, deve-se ao fato de formarem sistemas aromáticos, onde a redução via um elétron resulta na formação de semiquinonas (Q^{\bullet}) enquanto que a redução completa via dois elétrons e dois prótons gera a hidroquinona (QH_2). Por serem espécies eletrofílicas, quinonas não são suscetíveis a reações de protonação, contudo, quando protonadas constituem oxidantes mais fortes que as respectivas formas não protonadas. Tais características conferem as quinonas a habilidade de formarem ânions radicais estáveis em pH fisiológico. O comportamento eletroquímico padrão para os processos redox de quinonas é representado na Figura 12 (De Abreu *et al.*, 2002).

Figura 12. Esquema quadrado representativo da oxirredução de quinonas em vários meios.



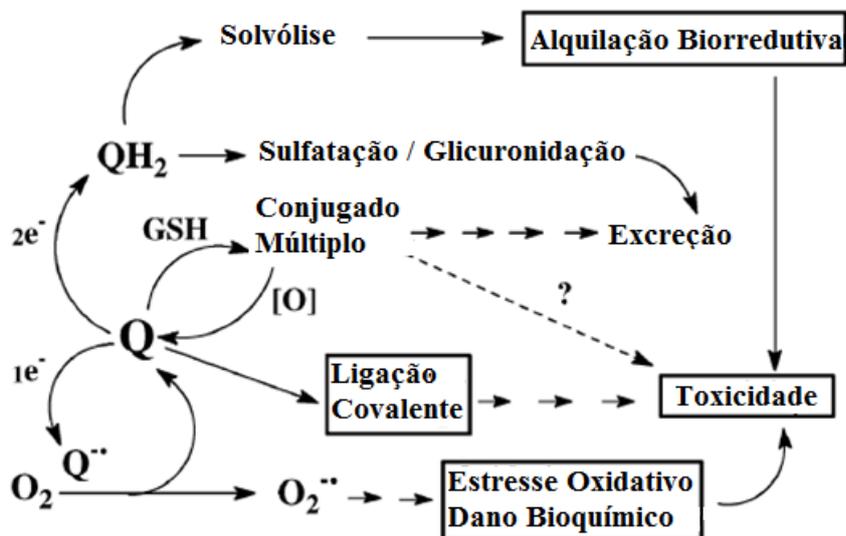
Fonte: De Abreu *et al.*, 2002).

Os principais mecanismos responsáveis pela ação biológica de quinonas (Figuras 8 e 11) são resumidos na Figura 13. Sua toxicologia 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 hidroquinona ou catecol (Hillard *et al.*, 2008).

Entre as quinonas, a naftoquinona β -lapachona (**h**), Figura 14, é uma das mais estudadas por apresentar numerosas atividades biológicas. A β -lapachona é uma *orto*-naftoquinona derivada do lapachol (**i**), Figura 14, que ocorre naturalmente em cascas de árvores (*Tabebuia avellanedae*) nativas da América do Sul (Gupta *et al.*, 2002). A β -lapachona possui vários efeitos farmacológicos, incluindo atividades antibacteriana, antimalárica, antifúngica, tripanossomicida, e atividades citotóxicas ligadas à geração de espécies reativas de oxigênio. Este composto também inibe diretamente a atividade enzimática das topoisomerasas I e II do DNA, com conseqüente citotoxicidade (Gupta *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005; De Abreu *et al.*, 2007). Atividade antineoplásica expressiva contra linhagens de células humanas em concentrações de 1 a 10 μ M também tem sido observada para a β -lapachona (CI₅₀). A citotoxicidade foi observada para várias linhagens de células cancerosas a partir de pacientes com leucemia promielocítica, câncer de próstata, glioma maligno, hepatoma, cólon, câncer de mama, ovário, pâncreas, linhas de células de mieloma

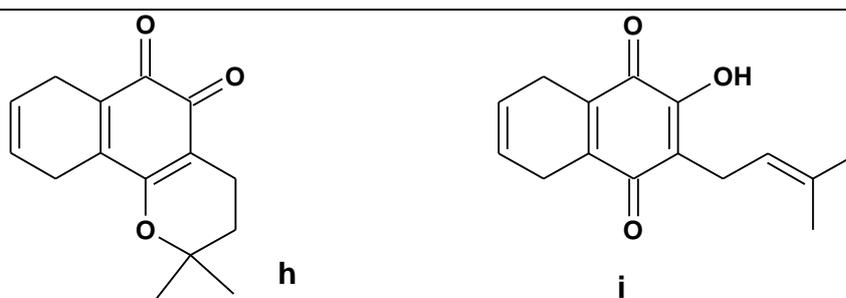
múltiplo, incluindo linhas resistentes aos medicamentos, os carcinomas de pulmão humano e células de osteossarcoma.

Figura 13. Mecanismos gerais de ação biológica de quinonas.



Fonte: Hillard *et al.*, 2008, adaptado.

Figura 14. Estruturas químicas da β -lapachona (g) e lapachol (h).

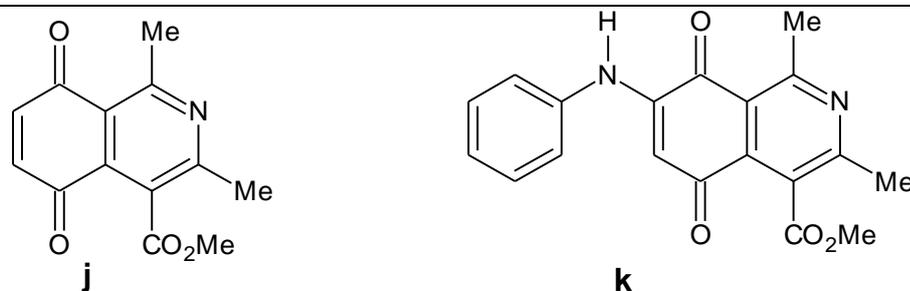


Fonte: Autor, 2011.

Diante do interessante espectro de atividades biológicas dos compostos quinonóides, uma gama de estudos é direcionada aos mesmos, sejam de origem natural ou sintética (Valderrama *et al.*, 2005; Valderrama *et al.*, 2008; Da Silva Júnior *et al.*, 2011). Um exemplo interessante é o estudo realizado com derivados de isoquinolinaquinona (j), em que uma variedade de 7-aminoisoquinolina-5,8-quinona (k), Figura 15, foi sintetizada. (Valderrama *et al.*, 2009). Atividade anticancerígena *in vitro* dos compostos derivados da série (j) frente a células de adenocarcinoma

gástrico, câncer de pulmão e carcinoma de bexiga foi observada. Foi avaliado o efeito da substituição do grupo amino sobre a atividade, sendo observado aumento quando este é substituído por um grupo fenila e decréscimo quando da substituição por um grupamento alquila, exceto para o grupo metila que não causou mudanças na atividade (Valderrama *et al.*, 2009). O referido estudo também analisou as propriedades redox dos compostos, uma vez que se faz necessária a biorredução da quinona para a atividade biológica e, a presença de grupos eletroatrantes nas moléculas analisados promoveu um deslocamento anódico nos potenciais de redução e, portanto, boa correlação deste parâmetro com a atividade biológica.

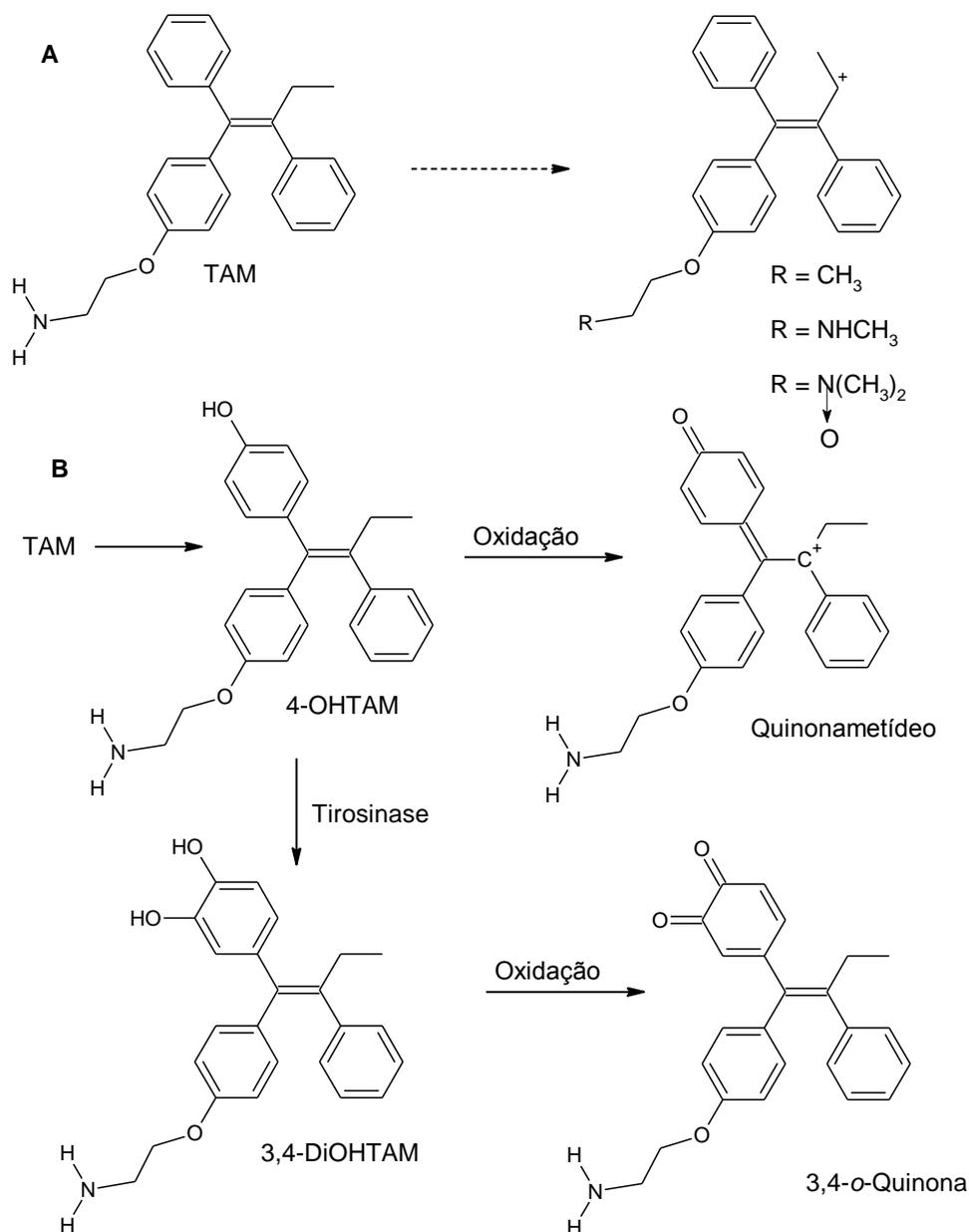
Figura 15. Estrutura química de isoquinolinaquinona (j) e derivado 7-aminoisoquinolina-5,8-quinona (k).



Fonte: Valderrama *et al.*, 2009, adaptado.

Em estudo recente (Garrido *et al.*, 2011), o potencial terapêutico da classe quinonóide é observado a partir dos produtos da metabolização do tamoxifeno (TAM), uma substância anti-estrogênica não-esteroidal aprovada pela FDA-USA (“Food and Drug Administration – United States of America”) desde 1978 como quimioterápico na terapia do câncer de mama e, também utilizado na prevenção desta neoplasia em pacientes saudáveis sob alto risco (Mourits *et al.*, 2001). O metabolismo do tamoxifeno (TAM), enzimaticamente ou quimicamente, gera pelo menos três diferentes metabólitos eletrofílicos, incluindo um carbocátion, uma quinometídeo e uma *orto*-quinona, Figura 16. Essas espécies são altamente reativas, podendo sofrer processos de polimerização subseqüentes entre si e/ou com biomarcadores e antioxidantes endógenos. A *o*-quinona, resultante da oxidação do metabólito catecol (3,4-DiOHTAM) pode alquilar resíduos de aminoácidos em proteínas, causar dano ao DNA celular por meio da geração de espécies reativas de oxigênio e/ou alquilar o DNA (Garrido *et al.*, 2011).

Figura 16. Espécies eletrofílicas geradas a partir da metabolização do Tamoxifeno.



Fonte: Garrido *et al.*, 2011, adaptado.

1.3.2 Compostos Nitroaromáticos

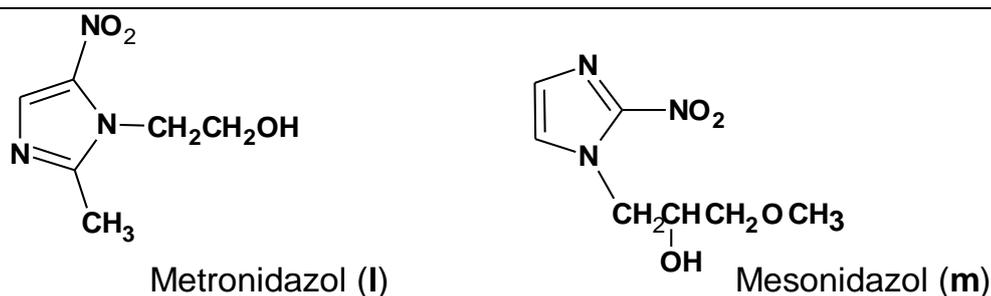
Estudos eletroquímicos de compostos nitroaromáticos se iniciaram nos princípios de 1900, quando as etapas envolvidas na redução do nitrobenzeno foram demonstradas. Contudo, grande ainda é o interesse nesta classe de compostos, uma vez que muitos nitrocompostos são preparados para uso como fármacos e

conseqüentemente introduzidos nos organismos vivos e metabolizados via processos redox. Assim, estes compostos são constantemente estudados eletroquimicamente, sendo possível concluir que sua redução envolve uma série de adições monoelétrônicas e etapas químicas subseqüentes, responsáveis pelas diferenças observadas nos processos de redução (Baizer, 1991; Núñez-Vergara *et al.*, 2005; Goulart *et al.*, 2007; Bollo *et al.*, 2011).

Em nível biológico, similaridades entre nitroaromáticos e quinonas são observadas, uma vez que catalisam reações de transferência de elétrons nos processos biológicos, principalmente por meio da geração de ânions radicais (semiquinonas e ânions radicais nitroaromáticos), que dependendo de sua estabilidade, podem transferir seus elétrons livres a moléculasceptoras. Estas moléculasceptoras podem ser outras espécies eletrogeradas ou oxigênio molecular, que é, então, reduzido ao ânion radical superóxido, gerando espécies reativas de oxigênio e, dependendo da concentração, condições de estresse oxidativo no interior da célula. O conhecimento e estudo das propriedades eletroquímicas das espécies que geram radicais em ciclos biológicos de oxidação e redução são essenciais para a compreensão da atividade biológica deste tipo de composto (Souza *et al.*, 2010).

Importantes representantes das classes dos nitrocompostos são os nitroimidazóis, que apresentam diversas atividades biológicas, sendo observada toxicidade preferencial a tecidos tumorais hipóxicos. Dentre estes, testados clinicamente como radiosensibilizadores, o metronidazol (**I**) e o mesonidazol (**m**), Figura 17, são rapidamente reduzidos por radicais gerados por radiação ou através dos sistemas enzimáticos (Heimbrook *et al.*, 1988). Contudo, apesar da citotoxicidade seletiva destes dois compostos a células hipóxicas, eles apresentam baixa potência, requerendo assim a administração de altas doses para exercerem sua atividade (Oliveira & Alves, 2002). Esta característica reforça o quão valioso é o caminho seguido no intuito de melhorar os perfis biológicos de fármacos por meio de modificações estruturais.

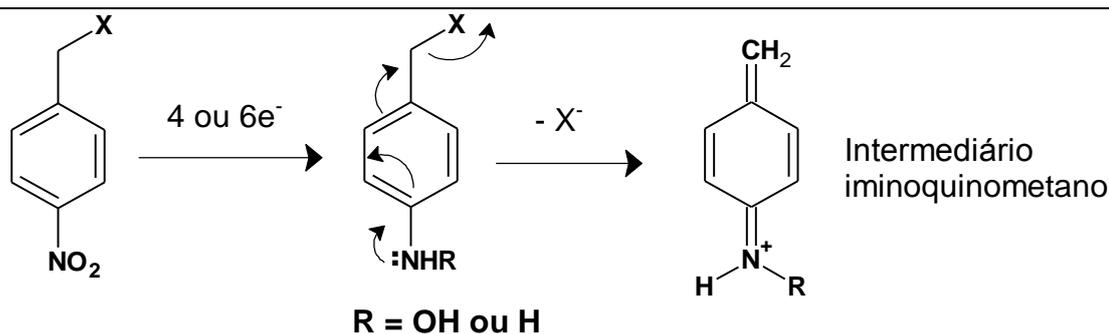
Figura 17. Estrutura Química do Metronidazol (I) e mesonidazol (m).



Fonte: Autor, 2011.

A ativação de nitroaromáticos pode acontecer por uma redução enzimática direta seguida de reação com oxigênio, gerando espécies reativas de oxigênio ou, alternativamente, em baixa concentração de oxigênio, por geração, após extensa redução, de espécies eletrofílicas (iminoquinometanos), Figura 18 (De Abreu *et al.*, 2001). Mais detalhadamente, nitrocompostos após sofrerem redução em condições de hipóxia, Figura 18, com formação da hidroxilamina (4 elétrons) ou amina (6 elétrons), via intermediário nitroso (2 elétrons), liberam um fármaco ativo que pode ser um intermediário alquilante, capaz de se ligar ao DNA ou a outras biomoléculas (Jaffar *et al.*, 2001; Oliveira & Alves, 2002), como tióis e ácidos nucleicos, resultando assim em um efeito tóxico potencial.

Figura 18. Fragmentação reductiva de compostos aromáticos amino ou hidroxilamino substituídos, gerando intermediário eletrofílico iminoquinometano.



Fonte: De Abreu *et al.*, 2001, adaptado.

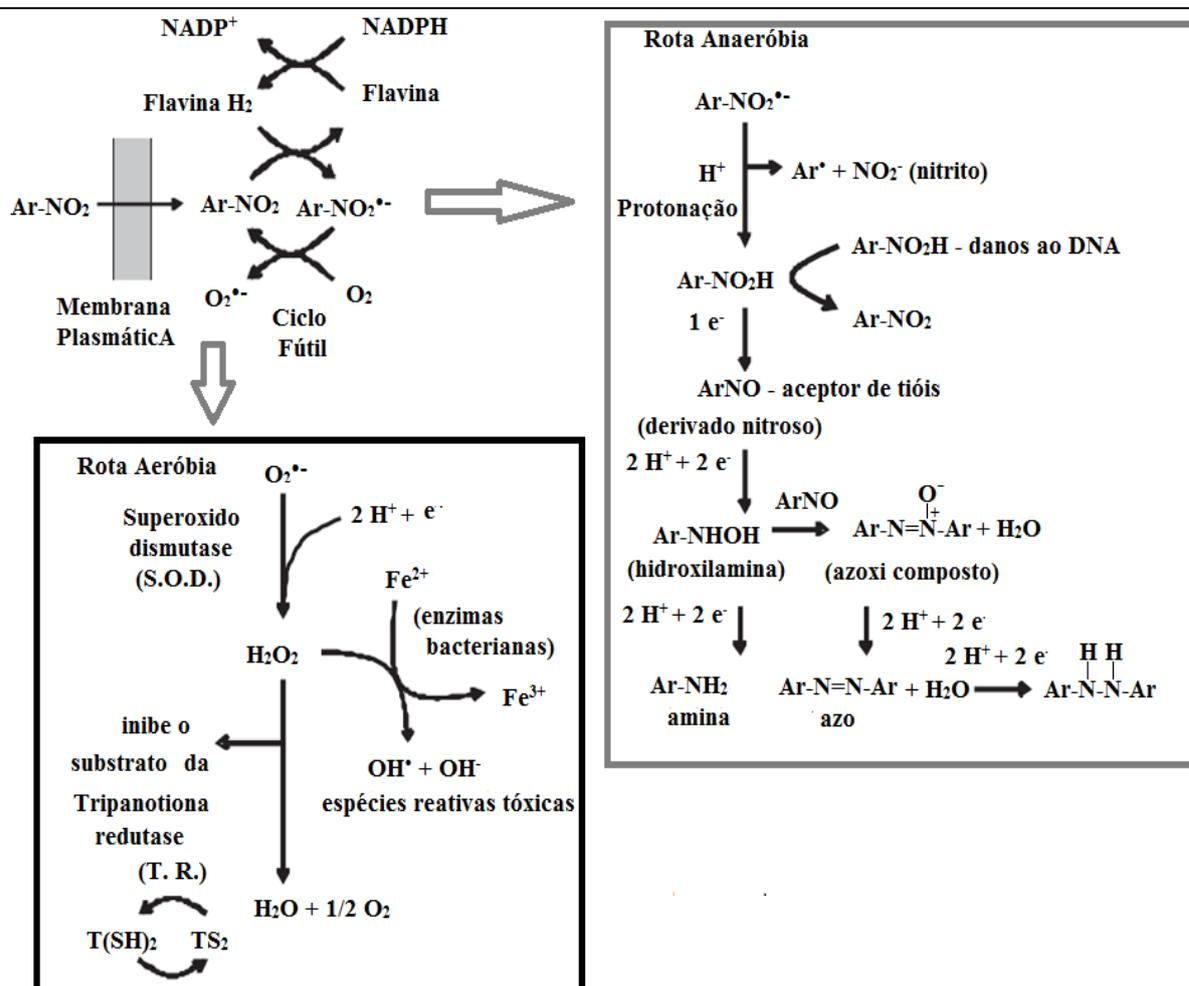
Como observado na Figura 19, os principais intermediários formados a partir da redução enzimática do grupo nitro em meio anaeróbico até o derivado amino são o ânion radical nitro ($Ar-NO_2^{\cdot-}$) e a hidroxilamina ($Ar-NHOH$). Estes intermediários podem interagir com o DNA celular, o que resulta nos efeitos farmacológicos

observados. Contudo, outros intermediários também apresentem atividade biológica, entre os quais, a toxicidade ao DNA supostamente causada pelo ânion radical protonado $\text{Ar-NO}_2\text{H}^{+\bullet}$ e a inativação enzimática desempenhada pelo derivado nitroso (Ar-NO), agindo como acceptor de grupos tióis de enzimas destoxicantes. Já em meio aeróbio, o ânion radical nitro gerado no processo de redução enzimática interage com o oxigênio presente no meio, em uma etapa metabólica denominada ciclo fútil, formando o ânion radical superóxido $\text{O}_2^{\bullet-}$, que por sua vez, sofre ação de enzimas, como a superóxido dismutase, S.O.D., formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que pode desestruturar membranas biológicas e também reagir com enzimas ferredoxinas, liberando espécies reativas, como o radical hidroxila (OH^\bullet), tóxicas a células bacterianas e parasitárias (Paula *et al.*, 2009; Viodé *et al.*, 1999; Kovacic & Osuna, 2000; Brezden *et al.*, 1994; Berube *et al.*, 1991).

A redução eletroquímica de nitroaromáticos tem sido amplamente estudada em meio prótico e aprótico. Nesses estudos é avaliada a dependência do processo redox com o pH do meio, a estabilidade dos intermediários de redução e a caracterização do mecanismo eletródico, interação com tióis de relevância biológica, como a glutathiona (GSH) e determinação de constantes reacionais do intermediário radicalar gerado no primeiro processo de redução do grupo nitro com oxigênio (La-Scalea *et al.*, 2005; Aravena *et al.*, 2005; Bollo *et al.*, 2005).

De modo geral, as técnicas eletroquímicas são usadas para estudar a formação, estabilidade e reatividade do produto da redução monoeletrônica do grupo nitro, o ânion nitro radical, em diferentes meios. O conhecimento e o estudo das propriedades eletroquímicas das espécies que geram radicais em ciclos biológicos de oxidação e redução são essenciais para a compreensão da atividade biológica destes compostos. A técnica de voltametria cíclica é um procedimento adequado para avaliar a estabilidade dos ânions radicais. Vários nitroaromáticos de importância biológica são capazes de gerar eletroquimicamente espécies radicalares e suas estabilidades podem ser estudadas a partir da técnica citada. Em resumo, a geração de ânion radical e sua estabilidade podem ser representadas por um mecanismo eletroquímico-químico (EC) em que uma primeira etapa eletroquímica é seguida por uma reação química acoplada (Souza *et al.*, 2010).

Figura 19. Provável mecanismo biorredutivo de nitrocompostos aromáticos.



Fonte: Paula *et al.*, 2009, adaptado.

1.4 Biossensor Eletroquímico de DNA

O estudo das interações entre moléculas orgânicas e o DNA é relevante por estar relacionado aos processos de transcrição e replicação do DNA *in vivo*, mutação de genes e variações das características de cada espécie, bem como por prover informações sobre fármacos cujo alvo biológico de ação é o DNA. Uma variedade de métodos tem sido empregada para investigar interações de moléculas com o DNA, a exemplo, a eletroforese em gel, a cristalografia de raio-X, a fluorescência, a espectroscopia no UV-Vis e a ressonância magnética nuclear (RMN). Técnicas eletroquímicas também são extensivamente empregadas para investigar interações entre o DNA e moléculas que apresentam atividade redox,

representando assim um campo bastante dinâmico. Isto se deve principalmente à alta sensibilidade, ao custo relativamente baixo, ao acompanhamento direto e à simplicidade dos respectivos métodos (Yang *et al.*, 2008).

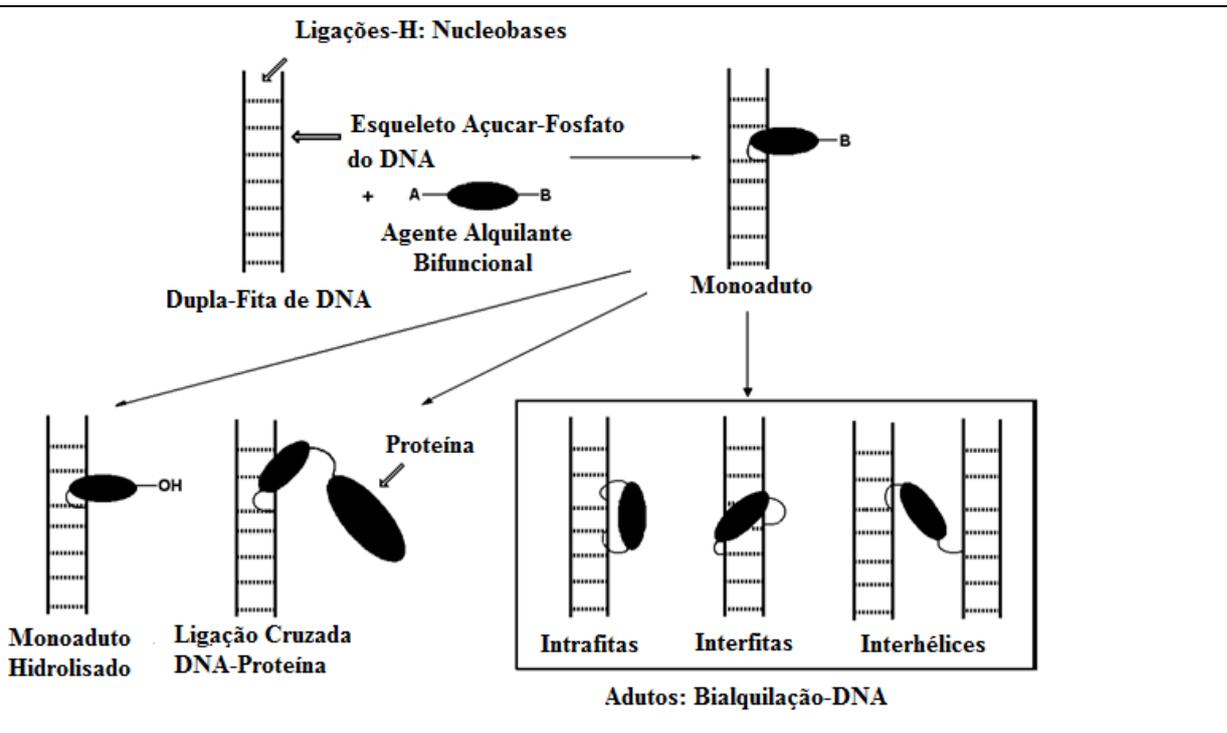
Desde que a estrutura do DNA fita dupla foi desvendada, a possibilidade de transferência de carga por parte dos pares de bases aromáticas empilhados na dupla hélice do DNA permitiu o desenvolvimento de vários estudos a cerca das propriedades condutoras do DNA. Embora o transporte de cargas pelo DNA resulte em dano oxidativo a partir de um agente oxidante, esta habilidade também é extremamente sensível à integridade das bases de DNA, assim como para o acoplamento de doadores e aceptores com o DNA. Tal sensibilidade tem promovido considerações a respeito do papel biológico das propriedades condutoras do DNA e a construção de sensores eletroquímicos de DNA com intuito de averiguar mutações, lesões de bases e ligação de proteínas (Gorodetsky *et al.*, 2008).

Os ácidos desoxirribonucléicos desempenham importante papel nos processos biológicos. O DNA é a biomolécula responsável pela determinação das características hereditárias, pois é transportador da informação genética, além de instruir a síntese de proteínas e enzimas por meio dos processos de replicação e transcrição da informação genética celular (Rauf *et al.*, 2005). Esta biomolécula consiste em duas cadeias antiparalelas de polinucleotídeos formados por unidades monoméricas de nucleotídeos. Cada nucleotídeo é formado por três tipos de componentes químicos: um grupo fosfato, que corresponde a uma pentose (desoxirribose), e quatro diferentes bases nitrogenadas. O esqueleto do DNA é representado pelo polímero açúcar-fosfato (desoxirribose-fosfato). As bases púricas, adenina (A) e guanina (G), e as bases pirimídicas, citosina (C) e timina (T), codificam a informação genética como uma função de suas ordens consecutivas na cadeia. A dupla hélice de DNA é resultante das ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas, A-T e G-C, presentes nas duas fitas de nucleotídeos que constituem a biomacromolécula (Almeida *et al.*, 2005; Disculescu *et al.*, 2005).

Nos sistemas vivos, o dano ao DNA está geralmente relacionado a processos de envelhecimento, neurológicos e de formação de tumores. Espécies reativas de oxigênio (ERO) são consideradas os principais responsáveis pelo dano oxidativo ao DNA, onde a guanina é a base mais facilmente oxidada, com formação da 8-

hidroxiguanina (Evans *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2008). A primeira etapa dos processos carcinogênicos e mutagênicos decorre de interações entre espécies químicas eletrofílicas com o DNA, seja de forma direta ou após ativação metabólica. Os sítios que potencialmente interagem com espécies eletrofílicas são os centros nucleofílicos do DNA: nitrogênio e oxigênio das bases púricas e pirimidicas, assim como o esqueleto fosfato (Bengini & Bossa, 2011). Considerando um agente bifuncional eletrofílico, Figura 20, a adição deste aos sítios nucleófilos do DNA pode ocorrer através da adição a um único sítio, formando um monoaduto, ou a dois sítios nucleófilos na mesma nucleobase, formando um sistema bicíclico ou tricíclico. Adicionalmente, esta adição pode ocorrer em nucleobases diferentes no mesmo sentido ou oposto à fita de DNA, resultando em ligações cruzadas intrafitas, interfitas e inter-hélices de DNA, ou ainda, ligar-se a proteínas, formando uma ligação cruzada DNA-proteína (De Abreu *et al.*, 2002; Bengini & Bossa, 2011).

Figura 20. Mecanismo de alquilação do DNA, A e B representam grupos eletrofílicos.



Fonte: De Abreu *et al.*, 2002, adaptado.

O entendimento dos mecanismos pelos quais moléculas orgânicas se ligam ao DNA é de grande importância para desenvolvimento de novos fármacos com melhores perfis farmacêuticos e conseqüentemente mais eficientes nas interações com o DNA. As interações de pequenas moléculas/fármacos com DNA envolvem

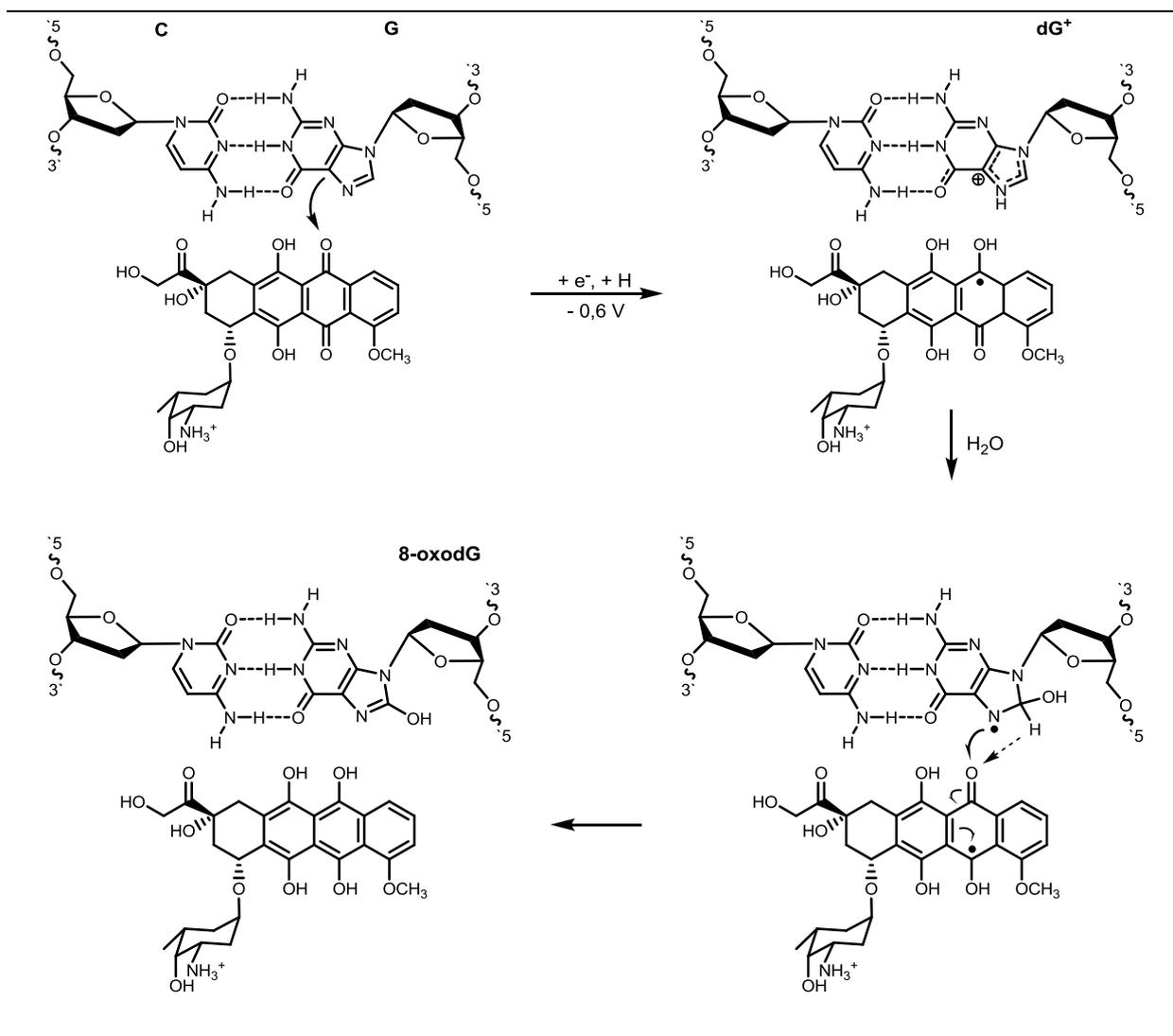
três mecanismos principais: o primeiro destes se dá por meio do controle de fatores de transcrição e polimerases, onde os fármacos interagem com proteínas que se ligam ao DNA. A segunda ocorre por meio da ligação com RNA, que pode ocorrer com o DNA dupla fita, formando uma tripla hélice, ou por expor uma fita simples de DNA, formando híbridos que podem interferir na atividade de transcrição. A última interação consiste na ligação direta de moléculas pequenas à dupla hélice do DNA, que podem ser de natureza eletrostática devido às cargas negativas do açúcar-fosfato (geralmente não específicas), intercalação entre os pares de bases e ligações covalentes (Meric *et al.* 2002; Rauf *et al.*, 2005; Heli *et al.*, 2005).

Os agentes alquilantes do DNA, que incluem as “mostardas” nitrogenadas, nitrosouréias, complexos tipo cisplatina e outros, correspondem aos agentes antineoplásicos mais antigos e mais utilizados. Esses compostos constituem fortes reagentes eletrofílicos que estabelecem ligações covalentes por reação de alquilação com os centros nucleofílicos do DNA, principalmente as bases púricas e pirimidínicas. Os agentes intercalantes do DNA, onde as acridinas e antraciclina constituem exemplos, promovem alterações no pareamento das bases. Estes agentes têm como alvo as fendas do DNA, Figura 21, através de um mecanismo de ação baseado na intercalação nos pares de bases nitrogenadas, o que envolve interações eletrostáticas, além de complexos de transferência de elétrons (Almeida *et al.*, 2005).

Biossensores eletroquímicos tem sido amplamente utilizados para averiguar o mecanismo de interação de fármacos. Um exemplo disto é o estudo realizado com doxorubicina, ou adriamicina, um agente intercalante do DNA. A adriamicina é um antibiótico pertencente à classe das antraciclina com um amplo espectro de aplicações quimioterápicas e antineoplásicas. O emprego de biossensor eletroquímico de dsDNA permitiu confirmar o mecanismo de intercalação de adriamicina na dupla hélice do DNA através de seu potencial redox, cuja intensidade de corrente aumentou gradativamente com o tempo de contato do biossensor em solução de adriamicina. Picos adicionais referentes à oxidação de guanosina e adenina também foram observados e o mecanismo de dano foi proposto como representado na Figura 21. O processo se inicia a partir de uma transferência de elétrons da guanina ao grupo quinona da adriamicina intercalada no DNA, gerando um cátion radical guanina e a semiquinona adriamicina. Os potenciais de redução

e/ou oxidação destas espécies podem ser mensurados eletroquimicamente através do biossensor (Brett *et al.*,2002).

Figura 21. Mecanismo eletroquímico de dano oxidativo *in situ* da adriamicina ao DNA.



Fonte: Brett *et al.*, 2002, adaptado.

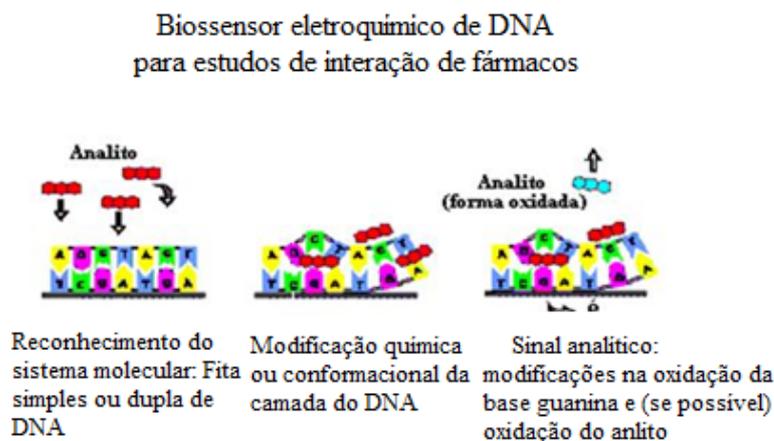
Os testes diagnósticos de câncer são freqüentemente baseados em sistemas para determinação de agentes que causam dano ao DNA. É estabelecido que algum dano irreversível ao DNA possa resultar em doenças hereditárias, que apresentam conseqüências letais, mutagênicas ou carcinogênicas para a célula. Devido à grande variedade de compostos que atuam por esse caminho, o sucesso na determinação de ações mutagênicas requer o desenvolvimento de métodos simples e sensíveis para determinação da reatividade potencial desses agentes com macromoléculas biológicas. Entre os agentes químicos carcinogênicos que são reativos *per se*, agentes alquilantes constituem um grupo com conhecida reatividade

química (Séquaris & Valenta, 1987). Desta forma, um dos alvos biológicos mais relevantes para mecanismo de ação de fármacos é o DNA. Muitos compostos se ligam e interagem com o DNA, causando mudanças na estrutura do DNA e seqüência de bases, provocando perturbações na replicação do DNA (Brett & Chiorcea, 2003).

Neste contexto, o emprego de biossensores eletroquímicos de DNA constitui ferramenta valioso para elucidar os mecanismos biológicos de ação de fármacos ou candidatos a fármacos (Brett *et al.*, 1997; Rauf *et al.*, 2005; Chiorcea-Paquim *et al.*, 2009). Biossensores eletroquímicos de DNA, Figura 22, consistem em dispositivos cujo elemento de reconhecimento biológico é o DNA fita dupla (dsDNA) ou DNA fita simples (ssDNA), imobilizado sobre um transdutor eletroquímico (eletrodo), que permite mensurar processos onde ocorrem ligações específicas com o DNA (Mousty, 2004; Brett & Chiorcea, 2003). Especificamente, eletrodos modificados com DNA dupla fita podem ser construídos para detectar o modo de interação entre pequenas moléculas como fármacos e espécies carcinogênicas com o ácido nucléico imobilizado sobre superfície eletródica (Dogan-Topal *et al.*, 2009).

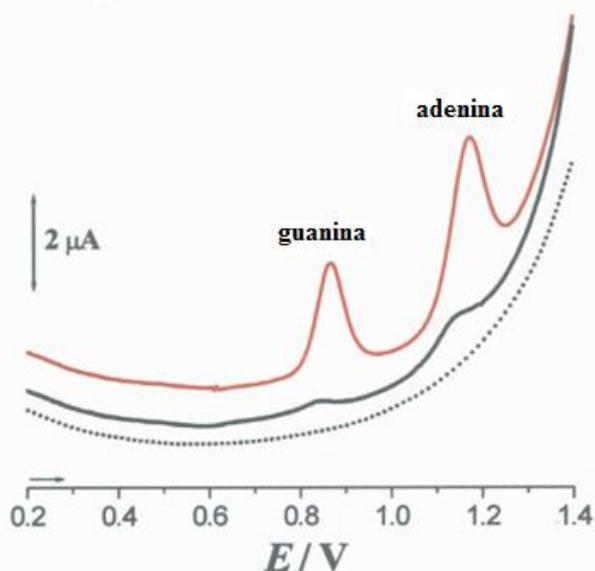
A oxidação eletroquímica do DNA em eletrodo de carbono vítreo através da voltametria de pulso diferencial, meio ácido (pH 4,5), apresenta dois picos de oxidação referentes às bases púricas (guanina e adenina), sendo as bases pirimídicas (timina e citosina) eletroinativas nestas condições (Brett *et al.*, 1999), Figura 23. De acordo com a Figura 23, o comportamento eletroquímico para o dsDNA (double strand ou fita dupla) em relação ao ssDNA (single strand ou fita simples) apresenta grande dificuldade de transferência de elétrons a partir da parte interna da forma rígida do dsDNA para a superfície eletródica. Por outro lado, no ssDNA, que se encontra em uma forma flexível, suas bases estão mais suscetíveis a processos de oxidação e, portanto, apresenta correntes de pico de alta intensidade de corrente (Diculescu *et al.*, 2005).

Figura 22. Representação do modo de operação do biossensor de DNA. O analito entra entre as fitas do DNA, modifica sua conformação, o que leva à exposição de suas bases, passíveis de oxidação anódica.



Fonte: De Moura, 2008, adaptado.

Figura 23. Voltamograma de pulso diferencial obtido com eletrodo de carbono vítreo modificado com DNA ($60 \mu\text{g mL}^{-1}$) em uma solução de tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5: 1° voltamograma do ssDNA (linha vermelha) e dsDNA (linha preta), 40° voltamograma do dsDNA (linha pontilhada).



Fonte: Disculescu *et al.*, 2005, adaptado.

A literatura é bem generosa no que se refere a estudos da interação de substâncias eletroativas com o DNA através do uso biossensores voltamétricos de DNA. Muitos compostos pertencentes a diferentes classes químicas (quinonas, nitroaromáticos, acridinas) têm sido investigados empregando-se diferentes metodologias. Em determinadas situações, o dano ao DNA foi observado de forma

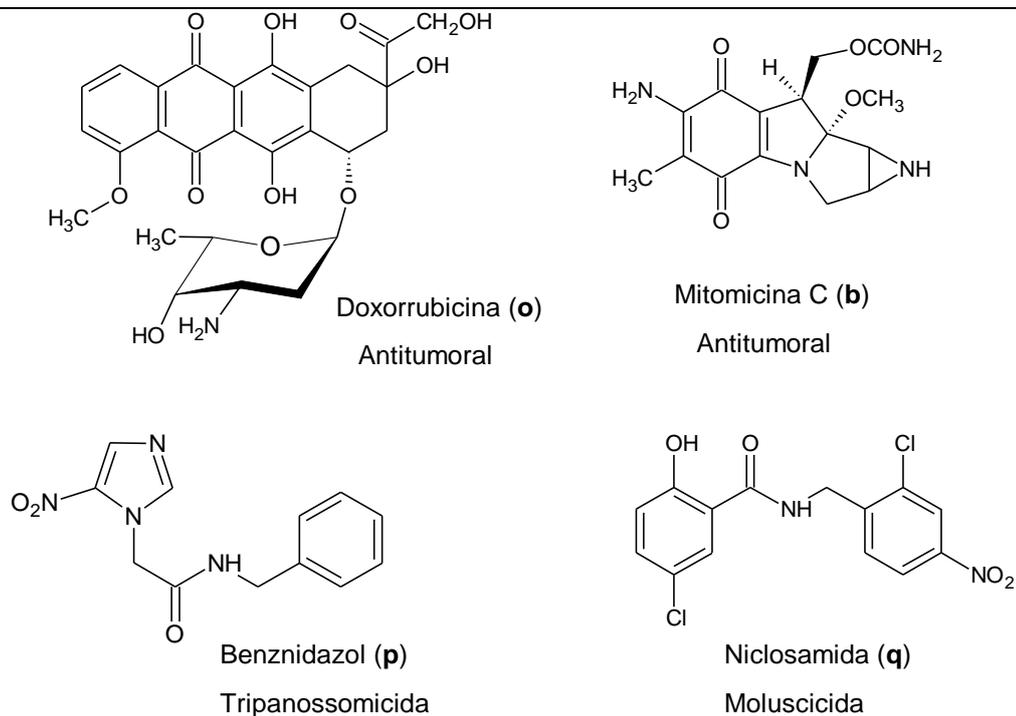
direta, onde o biossensor foi mantido em contato com solução da substância de interesse por determinado tempo, realizando-se varredura em potencial anódico para mensurar quaisquer alterações. Contudo, em algumas situações para averiguação da interação, fez-se necessário prévia ativação do fármaco, como redução do grupo eletroativo, por exemplo, havendo formação de intermediários reativos (Wang *et al.*, 1998; Brett *et al.*, 2002; De Abreu *et al.*, 2002).

Desta forma, observa-se que biossensores de DNA podem ser empregados tanto para investigar uma interação específica de um fármaco com uma base de DNA, como também para elucidar o mecanismo envolvido em tal interação. A interpretação de resultados é feita por meio de comparação dos perfis voltamétricos obtidos para o biossensor isoladamente e quando em contato com a substância/fármaco de interesse.

1.5 Sobre Nitroquinonas

Diante do exposto a respeito de compostos quinonóides e nitroaromáticos, é notória a sua importância, do ponto de vista biológico, pois inúmeras atividades são atribuídas aos mesmos. Nesse contexto, vários estudos de compostos pertencentes às respectivas classes, sejam no intuito de caracterização dos intermediários de redução, reatividade frente a alvos biológicos importantes ou desenvolvimento de derivados detentores dos grupos farmacofóricos são constantemente realizados. Alguns compostos quinonóides e nitroaromáticos bastante estudados em decorrência de suas atividades biológicas são representados na Figura 24. As quinonas Doxorubicina (**o**) e Mitomicina C (**b**), que apresentam atividade antitumoral preferencial a tumores sólidos, e os nitroaromáticos benznidazol (**p**), utilizado no tratamento da doença de Chagas, e niclosamida (**q**), um esquistossomicida, foram estudadas através de biossensores eletroquímicos de DNA, que evidenciaram que os mesmos são DNA-reativos (Yau *et al.*, 2003; Spanswick *et al.*, 1996; La-Scala *et al.*, 2002; De Abreu *et al.*, 2002), sendo estes um dos mecanismos responsáveis por suas atividades biológicas.

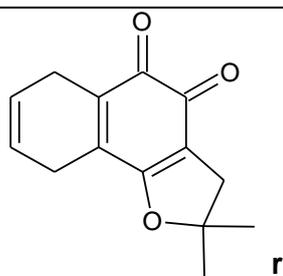
Figura 24. Estruturas químicas da Doxorubicina (o), Mitomicina C (b), Benznidazol (p) e Niclosamida (q).



Fonte: Autor, 2011.

Diante do interessante espectro de atividades apresentadas por compostos quinonóides e nitroaromáticos e, em busca de fármacos com melhor perfil farmacológico, análogos da *nor*- β -lapachona (r), Figura 25, com funcionalidade mista, foram sintetizados pelo Dr. Eufrânio N. da Silva Júnior (UFMG) coordenado pelo professor Dr. Antônio Ventura Pinto (UFRJ) (Da Silva Júnior *et al.*, 2007; Da Silva Júnior *et al.*, 2008; Da Silva Júnior *et al.*, 2010) e avaliadas suas atividades frente a linhagens de células cancerosas e cepas do *Trypanosoma cruzi*.

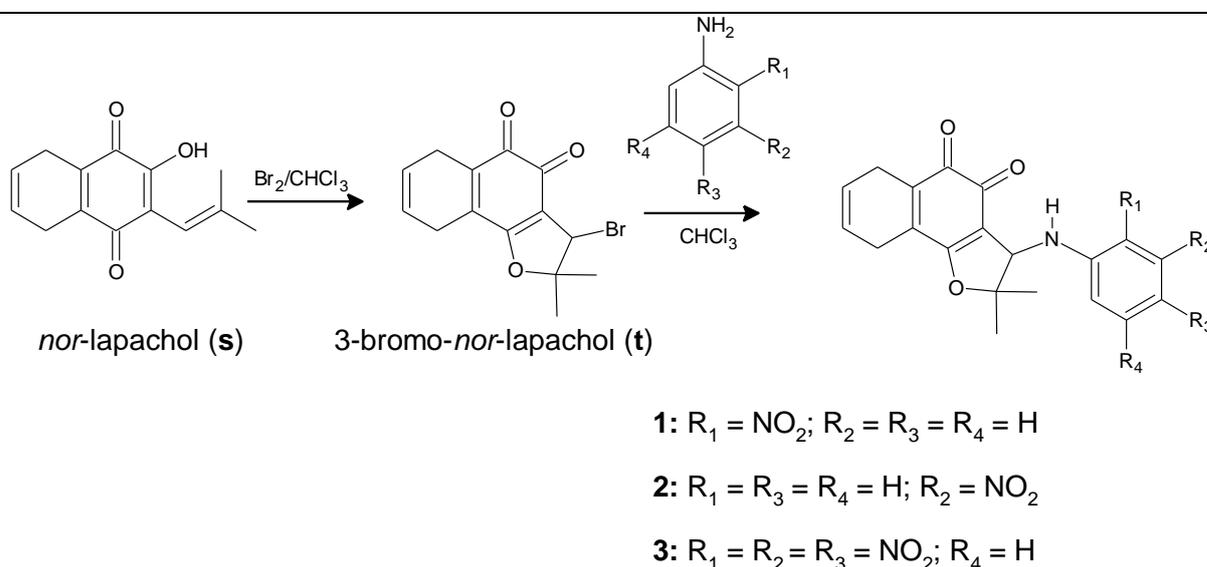
Figura 25. Estrutura química da *nor*- β -lapachona (r).



Fonte: Autor, 2011.

A *nor*- β -lapachona (**r**) foi sintetizada a partir do *nor*-lapachol (**s**), Figura 26, obtido pela oxidação de Hooker do lapachol (**h**) (Lee *et al.*, 1995). Em presença de bromo molecular, o *nor*-lapachol sofre ciclização ao derivado 3-bromo-*nor*-lapachol (**t**) que, via reação com um grupo arilamino, originou os derivados **1**, **2** e **3**, substituídos na posição C-3 do anel di-hidrofurânico com nitroanilina, Figura 26 (Da Silva Júnior *et al.*, 2007; Da Silva Júnior *et al.*, 2008; Da Silva Júnior *et al.*, 2010). As estruturas dos compostos arilaminados foram confirmadas pelo uso de técnicas espectroscópicas, como Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , infravermelho e espectrometria de massas.

Figura 26. Rota sintética dos derivados arilaminos substituídos da *nor*- β -lapachona



Fonte: Da Silva Júnior *et al.*, 2007, adaptado.

As atividades biológicas apresentadas pela *nor*- β -lapachona se mostraram similares às atividades já mencionadas para a naftoquinona β -lapachona (**g**). As atividades biológicas dos derivados substituídos com a nitroanilina (**1**, **2** e **3**) também foram avaliadas frente a várias linhagens de células tumorais humanas, Tabela 1, bem como frente a formas tripomastigota do *Trypanosoma cruzi*, agente causador da Doença de Chagas, Tabela 2 (Da Silva Júnior *et al.*, 2007; Da Silva Júnior *et al.*, 2010).

A partir dos resultados apresentados na Tabela 1, observa-se que os compostos apresentam atividade citotóxica frente a células MDA-MB435, superior à

doxorubicina, reforçando seu perfil antitumoral. Por outro lado, atividades interessantes também foram observadas para as demais linhagens de células tumorais, sendo obtido uma CI_{50} abaixo de $2 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Tabela 1. Atividade Citotóxica expressa por CI_{50} em μmolL^{-1} para linhagens de células cancerosas: HL – 60: Leucemia; MDA- MB435: Melanoma; SF295: Glioblastoma; HTC 8: Carcinoma de Cólon; DU 145: Carcinoma de próstata; PC-3: Carcinoma de Próstata; CMSP: Células Mononucleadas de Sangue Periférico, após 72 horas de exposição ao composto (via MTT e Alamar Blue).

Compostos	HL – 60	MDA- MB435	SF295	HTC 8	DU 145	PC-3	CMSP
Nor- β -lapachona (11)	1,75	0,31	1,36	1,58	1,30	1,98	>21,9
1 (QPh- <i>o</i> -NO ₂)	1,18	0,74	1,59	1,78	0,78	0,66	12,02
2 (QPh- <i>m</i> -NO ₂)	0,91	0,63	1,76	1,37	----	----	0,91
3 (QPh- <i>p</i> -NO ₂)	0,96	0,19	0,76	0,82	1,25	0,51	5,02
Doxorubicina	0,03	0,88	0,06	0,41	----	----	0,42

Fonte: Da Silva Júnior *et al.*, 2007; Cavalcanti, 2010, adaptado.

Quanto à atividade tripanossomicida, Tabela 2, esta se mostrou muito interessante para os compostos com grupo nitro substituinte em posição *o*- (1) e *m*- (2) (Da Silva Júnior *et al.*; 2008), superando o benznidazol, único fármaco atualmente aceito para o tratamento da Doença de Chagas (Folch-Cano *et al.*, 2010).

Tabela 2. Atividade frente formas tripomastigotas do *T. cruzi*.

Composto	$CI_{50}/24 \text{ h } (\mu\text{molL}^{-1})$
Nor- β -lapachona	>4800
1	55,6 \pm 4,6
2	86,3 \pm 4,6
3	857,3 \pm 96,4
Benznidazol	103,6 \pm 0.6

Fonte: Da Silva Júnior *et al.*; 2010, adaptado.

Diante das atividades biológicas obtidas para a *nor*- β -lapachona e nitroquinonas derivadas a partir dos ensaios biológicos, é possível racionalizar que a síntese de compostos de funcionalidade híbrida é um caminho interessante em

busca de fármacos com melhor perfil farmacológico. As atividades antitumorais das nitroquinonas frente ao precursor *nor*- β -lapachona se mostraram similares, assim como em relação ao antitumoral padrão doxorubicina. Quanto à atividade tripanossomicida, as nitroquinonas superaram de forma acentuada a *nor*- β -lapachona, e os compostos **1** e **2**, mostraram-se mais ativos que o benznidazol.

Nesse sentido, considerando os mecanismos de ação já conhecidos para compostos quinonóides e nitroaromáticos, os quais dependem de biorredução, é esperado que compostos hidrídicos (quinona e nitro) apresentem um perfil interessante no tocante ao mecanismo de ação. Assim, estudos que forneçam informações relativas aos produtos de redução, à estabilidade dos intermediários de redução e/ou interações com alvos biológicos importantes são relevantes para o entendimento dos mecanismos de ação em nível molecular.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Realizar estudos bioeletroquímicos de nitroquinonas visando à obtenção de parâmetros eletroquímicos que possam ser correlacionados com atividades biológicas, em busca do entendimento do mecanismo de ação em nível molecular.

2.2 Específicos

Investigar o comportamento eletroquímico de nitroquinonas em meio aquoso e não-aquoso.

Determinar através da técnica de voltametria cíclica, as constantes relacionadas a reações químicas acopladas aos processos de transferência heterogênea de elétrons para os compostos estudados

Avaliar a possibilidade de correlação entre os potenciais de redução das substâncias com as atividades biológicas já descritas na literatura.

Estudar a possibilidade interação de nitroquinonas com o DNA através da utilização de biossensor eletroquímico de DNA.

Estudar a reatividade das nitroquinonas em presença de oxigênio.

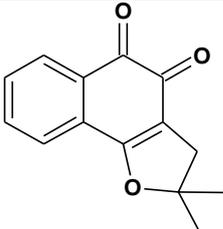
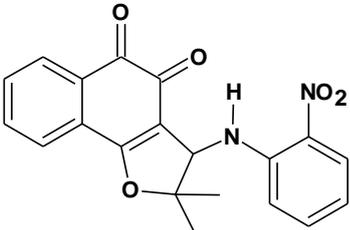
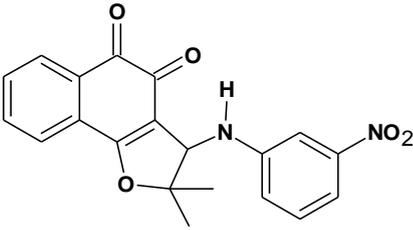
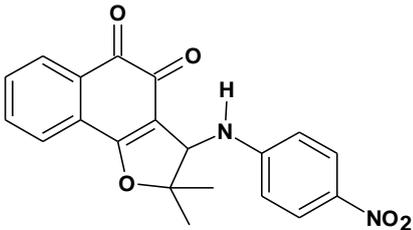
Investigar a interação entre as nitroquinonas e a β -ciclodextrina.

3 EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e Solventes

As nitroquinonas derivadas da *nor*- β -lapachona foram sintetizadas, purificadas e caracterizadas pelas técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , infravermelho e espectrometria de massas. (Da Silva Júnior, 2007; da Silva Júnior, 2008), Figura 27, e cordialmente cedidas pelo Prof. Dr. Vitor Francisco Ferreira (UFF) e pelo Prof. Dr. Eufrânio Nunes da Silva Júnior (UFMG). As substâncias estudadas no presente trabalho são representadas na Figura 27.

Figura 27. Substâncias derivadas da *nor*- β -lapachona estudadas no presente trabalho.

	<p>Nor-β-lapachona</p>
	<p>$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_3$ (MM = 228 g mol$^{-1}$)</p>
	<p>2,2-dimetil-2,3-di-hidronafto[1,2<i>b</i>]furan-4,5-diona</p>
	<p>Composto 1</p>
	<p>$\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5$ (MM = 364,35 g/mol)</p>
	<p>3-(2-Nitrofenilamino)-2,2-dimetil-2,3-di-hidronafto[1,2<i>b</i>]furan-4,5-diona</p>
	<p>Composto 2</p>
	<p>$\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5$ (MM = 364,35 g/mol)</p>
	<p>3-(3-Nitrofenilamino)-2,2-dimetil-2,3-di-hidronafto[1,2<i>b</i>]furan-4,5-diona</p>
	<p>Composto 3</p>
	<p>$\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5$ (MM = 364,35 g/mol)</p>
	<p>3-(4-Nitrofenilamino)-2,2-dimetil-2,3-di-hidronafto[1,2<i>b</i>]furan-4,5-diona</p>

3.2 Estudos Eletroquímicos

As análises eletroquímicas foram realizadas sempre utilizando sistema de três eletrodos (eletrodos de trabalho, auxiliar e referência). Conforme procedimento experimental, utilizou-se como eletrodo de trabalho, o carbono vítreo (BAS, área $7,065 \text{ mm}^2$) ou eletrodo de gota estática de mercúrio (SMDE). Em todas as situações foi utilizado como eletrodo de referência Ag|AgCl|Cl^- ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) em um tubo com capilar de Luggin e vycor em sua extremidade, e como eletrodo auxiliar foi utilizado um fio de platina.

As medidas eletroquímicas foram realizadas nos equipamentos AUTOLAB PGSTAT 20, AUTOLAB PGSTAT 30 e BAS 100B, interfaceados a um microcomputador. Os dados obtidos em cada análise foram então tratados no programa Origin 7,0 e Origin 8,0, para obtenção dos gráficos e dados.

3.2.1 Estudos em Meio Aprótico

Em estudos eletroquímicos, os solventes mais utilizados para compostos orgânicos são dimetilformamida (DMF) e dimetilsulfóxido (DMSO), pois além de serem solventes polares, apresentam uma larga janela de potencial de trabalho (Bard, 1990). Uma vez que tanto o DMF como o DMSO se decompõem, em altas temperaturas, sob pressão atmosférica, o caminho mais adequado para a purificação dos mesmos é sob pressão reduzida, após tratamento com CaH_2 (hidreto de cálcio) anidro, para o DMSO e para o DMF, o CuSO_4 (sulfato de cobre) anidro (para remoção de aminas). A forma totalmente anidra do solvente é de difícil obtenção. Deve-se evitar a presença de *N*-metilformamida, pois esta pode agir como um doador de prótons ou interferir no desenvolvimento da reação (Lund, 2001).

As análises em meio aprótico foram conduzidas utilizando como eletrólito suporte tetrafluoroborato de tetrabutilamônio (TBABF_4 , $0,1 \text{ mol L}^{-1}$). ou perclorato de tetrabutilamônio (TBAP), sendo este último sintetizado (3.2.1.1) e secado sob pressão reduzida a 40°C .

3.2.1.1 Síntese e Purificação de TBAP

Para a síntese de TBAP procedeu-se da seguinte forma: 103,69 g de brometo de tetrabutilamônio (TBABr) foram lentamente dissolvidos em 200 mL de água destilada, sendo adicionada posteriormente à solução aquosa de TBABr, uma alíquota de 30 mL de ácido perclórico (Aldrich), resultando em suspensão branca. O produto formado foi filtrado a vácuo, originando pequenos cristais brancos. A água mãe desse processo de filtração apresentava pH ~ 3,0, 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.

3.2.1.2 Análises Cinéticas das Espécies Eletrogeradas em Meio Aprótico

Para caracterização da presença de reações químicas acopladas ao processo de transferência de elétrons, estudos cinéticos em meio aprótico foram realizados segundo o procedimento de Nicholson (Olmstead *et al.*, 1969), sendo a velocidade varredura variada de 0,1 até 10,0 V s⁻¹. Usando o procedimento teórico de Olmstead *col.*, 1969, os valores de razão $I_{p,a}/I_{p,c}$ medidos experimentalmente foram calculadas segundo a equação (Bard & Faulner, 1990):

$$\frac{I_{p,a}}{I_{p,c}} = \frac{(I_{p,a})_0}{(I_{p,c})_0} + \frac{(0,485) \cdot (I_{p,s})_0}{(I_{p,c})_0} + 0,086 \quad eq. 10$$

Sendo as intensidades de corrente pico anódico, catódico e em potencial de inversão, $(I_{p,a})_0$, $(I_{p,c})_0$ e $(I_{p,s})_0$, respectivamente, consideradas a partir do zero de corrente, conforme indicado na Figura 28.

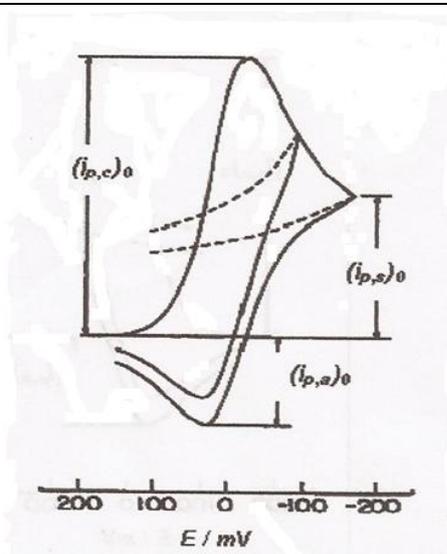
Para a caracterização da reação química acoplada ao processo de transferência de elétrons, utilizaram-se as aproximações teóricas descritas de Olmstead e *col.*, 1969, em que as razões de corrente $I_{p,a}/I_{p,c}$ se relacionam com o parâmetro cinético ω , que incorpora os efeitos da constante reacional, concentração da espécie química eletroativa e a velocidade de varredura, definido como:

$$\log \omega = \log(K_2 \cdot C_0 \cdot \tau) + 0,034 (a\tau - 4) \quad eq. 11$$

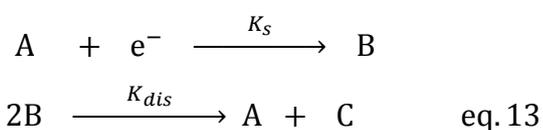
$$\log \omega = \log(K_2 \cdot C_0 \cdot \tau) + 0,047 (a\tau - 4) \quad eq. 12$$

Sendo a equação 11 referente ao modelo matemático descrito para uma reação de dimerização, enquanto que a equação 12 relaciona-se a uma reação de desproporcionamento. Os mecanismos relativos a uma reação química de desproporcionamento é representado pela equação 13 e o mecanismo de dimerização é descrito pela equação 14.

Figura 28. Voltamograma cíclico detalhando as correntes de pico em relação ao zero de corrente.



Fonte: Nicholson & Shain, 1964, adaptado.



A constante de decaimento para uma segunda ordem é representado por k_2 , enquanto que τ é a constante de tempo entre o potencial a meia altura da onda e o potencial de inversão, definida por

$$\tau = \frac{(E_{1/2} - E_\lambda)}{\nu} \quad eq. 15$$

em que, $E_{1/2}$ é obtido,

$$E_{1/2} = \frac{E_{p,a} + E_{p,c}}{2} \quad \text{eq. 16}$$

sendo $E_{1/2}$ o potencial a meia altura da onda, E_λ é o potencial de inversão, v é a velocidade de varredura, $E_{p,a}$ e $E_{p,c}$ são os potenciais de pico catódico e anódico, respectivamente.

O segundo termo das equações 11 e 12 representa o efeito dos potenciais de inversão de varredura (E_λ) sobre o parâmetro cinético, como

$$a \cdot \tau = \frac{nF}{RT} \cdot (E_\lambda - E^0) \quad \text{eq. 17}$$

sendo,

$$a = \frac{nFv}{RT} \quad \text{e} \quad \tau = \frac{(E_\lambda - E^0)}{v} \quad \text{eq. 18}$$

Os valores de E_λ foram ajustados para que o produto $a \cdot \tau$ fosse igual a 4, em todos os experimentos realizados. Desta forma, a partir das equações 12 e 13 se obtém a expressão

$$\omega = k_2 \cdot C_0 \cdot \tau \quad \text{eq. 19}$$

cuja relação linear permite determinar a constante de segunda ordem de decaimento. Por esta razão, as regressões lineares foram feitas para passar pela origem dos eixos cartesianos, sendo k_2 a constante para reação de segunda ordem e C_0 é a concentração inicial do composto.

As curvas descritas por Nicholson & Shain (1964) consideram diversos valores de esfericidade de eletrodo. Para todos os cálculos, foi utilizada a curva de trabalho, para um eletrodo esférico de 100%, que é descrita pelo seguinte polinômio:

$$\begin{aligned}
\omega = & 608,9675272 + 9218,32978906 \cdot \frac{i_{p,a}}{i_{p,c}} - 61731,8318 \cdot \left(\frac{i_{p,a}}{i_{p,c}}\right)^2 \\
& + 144122,1409 \cdot \left(\frac{i_{p,a}}{i_{p,c}}\right)^3 - 163352,9841 \cdot \left(\frac{i_{p,a}}{i_{p,c}}\right)^4 \\
& + 91531,177664 \cdot \left(\frac{i_{p,a}}{i_{p,c}}\right)^5 \\
& - 20395,808563 \cdot \left(\frac{i_{p,a}}{i_{p,c}}\right)^6
\end{aligned} \tag{eq. 20}$$

Obtendo-se o valor de k_2 , pode-se calcular os valores referentes ao tempo de meia vida do radical, segundo a equação:

$$t_{1/2} = \frac{1}{k_2 \cdot C_0} \tag{eq. 21}$$

3.2.1.3 Ressonância do Spin do Elétron Acomplada a Voltametria Cíclica – Espectroeletróquímica

Todas as análises em espectroeletróquímica foram resultado de colaboração com o Prof. Dr. Carlos Frontana, do Departamento de Química, Centro de Investigacion y Estudios Avanzados, México, sendo estas realizadas por seus alunos sob sua supervisão.

Os espectros de ESR foram obtidos em banda de raio X (9,85 GHz), em instrumento ELEXSYS 500 com cavidade retangular TE₁₀₂, e uma cela para espectroeletróquímica comercial (Wilmad). As medidas espectroeletróquímicas foram realizadas com auxílio de potenciostato galvanostato (PGSTAT 30) para a geração dos radicais a serem caracterizados, sendo utilizado platina como eletrodo de trabalho (~ 0,2 cm²) e auxiliar (2,5 cm²) e, como eletrodo de referência Ag/AgNO₃ (0,1 mol L⁻¹).

3.2.1.4 Estudos em Meio Aprótico em Presença de Oxigênio

Estudos eletroquímicos em meio aprótico (DMF + TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹) foram realizados em presença e ausência de oxigênio para averiguar a reatividade, após redução da *nor*-β-lapachona e seus derivados nitrados, frente a oxigênio. Analisaram-se os parâmetros eletroquímicos, como o deslocamento anódico de potencial para a primeira onda de redução e o aumento da corrente de pico. 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 & Faulkner (1990), como segue:

$$I_{pc} = \frac{I_{pR}}{I_{p0}} = \frac{K_{app} \cdot R \cdot T \cdot [O_2]}{n \cdot F \cdot v} \quad \text{eq. 22}$$

sendo,

I_{pc} = corrente catalítica

I_{pc}/I_{p0} = corrente normalizada

K_{app} = constante catalítica aparente (s⁻¹)

v = velocidade de varredura (V s⁻¹)

n = número de elétrons

F = Constante de Faraday (96485 C mol⁻¹)

T = temperatura (298 K)

R = 8,314 J mol⁻¹ K⁻¹

3.3 Estudos em Meio Prótico - Reatividade frente ao ssDNA

Nas análises com ssDNA, foi utilizado como eletrólito suporte, solução tampão acetato (pH 4,5, força iônica $0,2 \text{ mol L}^{-1}$) (Perrin, 1974), preparada com água purificada em um sistema Milli-Q Millipore e fervida, com o intuito de eliminar eventuais microrganismos que pudessem modificar a estrutura do DNA. Para o preparo do tampão foram adicionados aproximadamente 0,717 mL de ácido acético glacial e 0,59 g de acetato de sódio em 100 mL de água fervida.

Nas análises eletroquímicas em meio prótico foi utilizado como eletrólito suporte solução de tampão fosfato (pH 7,0, força iônica 0,2) (Perrin, 1974), preparada com água purificada em um sistema Milli-Q Millipore. Para o preparo do tampão, foram adicionados 0,471 g de fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) e 0,785 g de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) em 100 mL de água. O valor de pH da solução foi determinado em pH-metro modelo Quimis Q400A.

3.3.1 Estudos em Biossensor de dsDNA

As bases púricas do DNA (guanina e adenina) são oxidadas eletroquimicamente em eletrodo de carbono vítreo, em meio ácido pH 4,5, sendo que para o dsDNA (DNA nativo, “double strand” ou dupla fita), devido às ligações de hidrogênio, os picos de oxidação destas bases apresentam menores intensidade de corrente (ou quase nulas) em relação ao ssDNA (DNA desnaturado, “single strand”, ou fita simples) desnaturado por tratamento térmico, em meio ácido (Brett *et al.*, 1998). Quando o dsDNA, imobilizado em superfície eletródica, é incubado em solução de compostos que podem acarretar modificações estruturais ou danos ao mesmo, ocorre exposição das bases púricas na superfície do eletrodo acarretando, então, o aumento ou surgimento de picos referentes à oxidação destas.

Considerando-se o ssDNA em relação ao dsDNA, este apresenta picos de oxidação com alta intensidade de corrente e o diagnóstico de possíveis interações de substâncias com o ssDNA é feito pelo decréscimo dessas correntes.

Como já mencionado em vasta literatura (Brett *et al.*, 2002; Brett *et al.*, 2005; De Abreu *et al.*, 2002; Rauf *et al.*;2005; De Abreu *et al.*, 2008) para estudos com

biossensor de dsDNA, o meio mais adequado é o meio aquoso tamponado (tampão acetato) pH 4,5, sendo este, então, empregado no presente estudo.

3.3.2 Preparação do Gel de dsDNA

O DNA utilizado para preparação do gel foi do tipo I, altamente polimerizado de *calf thymus* (timo de bezerro), que apresentava as seguintes especificações: 6,2 % de Na⁺ e 13% (v/v) de H₂O, dessecado e armazenado à 8°C. Pesaram-se em eppendorf 12 mg de DNA que foram solubilizados em 1 mL de tampão de acetato (pH 4,5). Como o gel não pode ser submetido ao ultra-som para não comprometer a integridade da dupla fita, este foi submetido à refrigeração por 24 h, para completa formação do gel de DNA.

3.3.3 Condicionamento do Eletrodo

O eletrodo de carbono vítreo, utilizado para a preparação do biossensor, foi previamente polido cuidadosamente com alumina (3 µm) para garantir completa limpeza da superfície. Após esse procedimento, o mesmo foi submetido a condicionamento 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 ($E_{ap} = 0$ a +1,4 V) em velocidade de 5 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.

3.3.4 Estudo da Interação das Substâncias Estudadas com dsDNA

Uma vez preparado e secado o biossensor de dsDNA, através da adição de 10 µL do gel no eletrodo condicionado conforme descrito no item 3.2.4, este foi imerso em soluções das substâncias a serem analisadas em concentrações que variaram de 10⁻⁶ a 10⁻⁴ mol L⁻¹ solubilizadas em meio aquoso-etanólico (10% v/v). Transcorrido um tempo mínimo de 15 minutos, fez-se uma única varredura anódica de potencial ($E = 0$ a +1,4 V) em VPD. O mesmo procedimento foi realizado com um biossensor controle imerso apenas em solução tampão-etanol (10% v/v) para

assegurar que toda e qualquer mudança observada na eletrooxidação do dsDNA referia-se apenas a alguma interação deste com as substâncias analisadas.

3.3.5 Preparação da Solução de ssDNA

Para o preparo da solução de ssDNA foram pesadas 3 mg de dsDNA que foi desnaturada pela adição de 1 mL de ácido clorídrico (1 mol L^{-1}) e aquecimento durante 1 h a 100°C até solubilização. Em seguida, para neutralização do meio foi adicionado 1 mL de solução de NaOH (1 mol L^{-1}), completando-se o volume para 10 mL com tampão acetato (pH 4,5), para finalização do procedimento.

3.3.6 Estudo da Interação das Substâncias 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. Foram observados dois picos de alta intensidade de corrente referentes à eletrooxidação das bases guanina e adenina (0,83 V e 1,16 V), respectivamente. Uma característica que torna os estudos com ssDNA relativamente laborioso é a forte adsorção em superfície eletródica após o processo redox das bases púricas. Desta forma, foram realizadas medidas eletroquímicas em triplicata, sendo feito polimento adequado do eletrodo após cada varredura para que não houvesse variações significativas das correntes de pico entre as medidas. 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. Foram adicionadas alíquotas das substâncias em análise a partir de solução estoque em etanol ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), de tal modo que a concentração das mesmas na cela eletroquímica variou de 10^{-5} a $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

3.4 Estudo da Interação da *Nor*- β -lapachona e Derivados com β -ciclodextrina (β -CD)

A avaliação qualitativa da interação da *nor*- β -lapachona e nitroquinonas derivadas (**1**, **2** e **3**) com β -CD foi realizada em experimentos de transferência de fase, em que massas correspondentes a $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de cada substância a ser analisada foram adicionadas à cela eletroquímica contendo tampão fosfato pH 7,4 e, após 5 minutos de agitação e desaeração com argônio, a resposta eletroquímica foi registrada.

Em seguida, foram adicionadas massas de β -CD correspondentes às concentrações de 0,01, 0,1 e 1 mmol L^{-1} , sendo a solução agitada e desaerada, a cada adição de β -CD, por 5 minutos, para então ser realizada a medida eletroquímica. A interação e conseqüentemente formação de complexos de inclusão foi avaliada através das mudanças observadas nos parâmetros eletroquímicos potencial e corrente de pico, em cada procedimento.

3.5 Análise da Citotoxicidade de *o*-, *m*- e *p*-nitroanilinas *in vitro* – Ensaio do MTT

Em busca de informações adicionais sobre as atividades farmacológicas apresentadas pelas nitroquinonas, foi investigada a atividade citotóxica de nitroanilinas substituídas em *o*-, *m*- e *p*- pelo grupo do LOE (Laboratório de Oncologia Experimental da UFC) frente às seguintes linhagens de células tumorais humanas: MDA-MB435 (melanoma), HCT-8 (cólon) e SF-295 (glioblastoma), cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos (penicilina/estreptomicina), mantidas em estufa a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e atmosfera contendo 5% de CO_2 .

A citotoxicidade da amostra foi avaliada pelo método do MTT (Mosman, 1983), que consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H brometo de tetrazolium (MTT) para formazam, pela atividade da enzima succinil desidrogenase presente na mitocôndria de células viáveis, que permite quantificar a porcentagem de células vivas. As células foram

plaqueadas em placas de 96 cavidades nas seguintes densidades: $0,7 \times 10^5$ (HCT-8), $0,6 \times 10^5$ (SF-295) e $0,1 \times 10^6$ (MDAMB-435). As amostras foram adicionadas e as placas foram incubadas por 72 h em estufa a 5% de CO_2 a 37°C . As amostras foram testadas em concentrações que variaram de 0,33 a $173 \mu\text{mol L}^{-1}$.

As substâncias foram analisadas em triplicata, registrando-se gráficos de absorvência X concentração e determinadas suas CI_{50} (concentração inibitória mínima capaz de provocar 50% de efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) realizado a partir da regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 4.0 (GraphPad Software).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O mecanismo de ação de muitos fármacos, como quinonas e/ou nitroaromáticos é dependente de biorredução (Rauf *et al.*, 2005). As quinonas exercem seu maior papel como fármacos biorredutíveis, por promoção do estresse oxidativo e por serem catalisadores redox. Como aceptores de Michael, quinonas podem induzir o dano celular por alquilação de proteínas celulares importantes e/ou o DNA (Hernández *et al.*, 2008). Os nitroaromáticos exercem suas atividades biológicas por um mecanismo similar, por meio dos intermediários formados na redução do grupo nitro (Colón *et al.*, 2008).

Nesse sentido, o estudo sobre o mecanismo de redução eletroquímica, a caracterização dos respectivos produtos eletrogerados e, a análise destes com biomoléculas, como o DNA, são ferramentas relevantes para o entendimento do mecanismo de ação farmacológica de moléculas detentoras de atividade biológica (Núñez-Vergara *et al.*, 2005).

No estudo das reações eletroquímicas, a técnica de voltametria cíclica apresenta papel de destaque, sendo uma das mais empregadas. Parâmetros eletroquímicos importantes (E_{pa} , E_{pc} ou E_{redox} ($E_{pc} + E_{pa}$)/2, ou $E_{pc} - E_{pc/2}$) e sua variação com a velocidade de varredura, com a concentração do analito, entre outros, são empregados para elucidação do mecanismo eletródico, incluindo a obtenção de constantes cinéticas relacionadas às reações químicas acopladas ao processo de transferência heterogênea de elétrons. Outras técnicas, como voltametria de pulso diferencial e de onda quadrada, são também extensivamente empregadas, principalmente para fins analíticos. A maior vantagem inerente a essas duas técnicas consiste na maior sensibilidade apresentada devido à compensação da corrente capacitiva, assim como à rapidez da análise.

Como o ambiente celular pode ser lipofílico e/ou hidrofílico e, os intermediários radicalares gerados a partir da metabolização redutiva de quinonas e nitroaromáticos são determinantes para o mecanismo de ação biológico (De Abreu *et al.*, 2002; Barety *et al.*, 1984; Jaffar *et al.*, 2001), faz-se necessário mimetizar as condições biológicas para assim avaliar a estabilidade desses intermediários. Assim, estudos eletroquímicos para a *nor*- β -lapachona e seus derivados arilaminados (*orto*-nitro (**1**), *meta*-nitro (**2**) e *para*-nitro (**3**)) foram realizados com o objetivo de

caracterizar o mecanismo redox relacionado, a reatividade dos intermediários eletrogerados com oxigênio (ciclagem redox) e prováveis interações com o DNA. Desta forma, espera-se correlacionar os parâmetros termodinâmico-cinéticos encontrados com as respectivas atividades biológicas (Silva Júnior *et al.*, 2007; Silva Júnior *et al.*, 2008) (Tabelas 1 e 2, pag. 67). Assim, a seguir, estudos eletroquímicos em meio não-aquoso e aquoso tamponado são descritos para os compostos supracitados.

4.1 Estudos em Meio Aprótico

Os estudos em meio aprótico foram realizados utilizando os respectivos eletrodos de trabalho: carbono vítreo e eletrodo de gota pendente de mercúrio. No último caso, os ensaios eletroquímicos foram realizados na Universidade do Chile, em Santiago do Chile, no grupo do Prof. Juan-Arturo Squella. A partir destes estudos, informações relevantes sobre o processo de redução eletroquímica foram obtidas, o mecanismo de redução, caracterizado e determinadas as constantes reacionais para as reações químicas subseqüentes ao processo de transferência de elétrons. Buscando-se informações adicionais para o esclarecimento do mecanismo de redução eletroquímica, estudos por espectroeletroquímica foram realizados em colaboração com o Dr. Carlos Frontana (México).

4.1.1 Estudo em Eletrodo de Carbono Vítreo

Os estudos eletroquímicos da *nor*- β -lapachona e seus derivados nitroquinonas (*o*-nitro (**1**), *m*-nitro (**2**) e *p*-nitro (**3**)) evidenciaram um comportamento característico das funções quinona e nitroaromático em meio aprótico. A redução eletroquímica de quinonas em solventes não aquosos ocorre em duas etapas monoelétrônicas individuais via consumo final de dois elétrons (De Abreu *et al.*, 2004). A primeira etapa de redução apresenta características de reversibilidade, onde a inserção de um elétron ao grupo quinonóide gera o ânion radical semiquinônico ($Q^{\bullet-}$), oxidado em varredura reversa. O segundo processo de redução, que envolve mais um elétron, resulta na formação do diânion quinônico, uma espécie de maior basicidade que a semiquinona, sendo, portanto mais reativo e

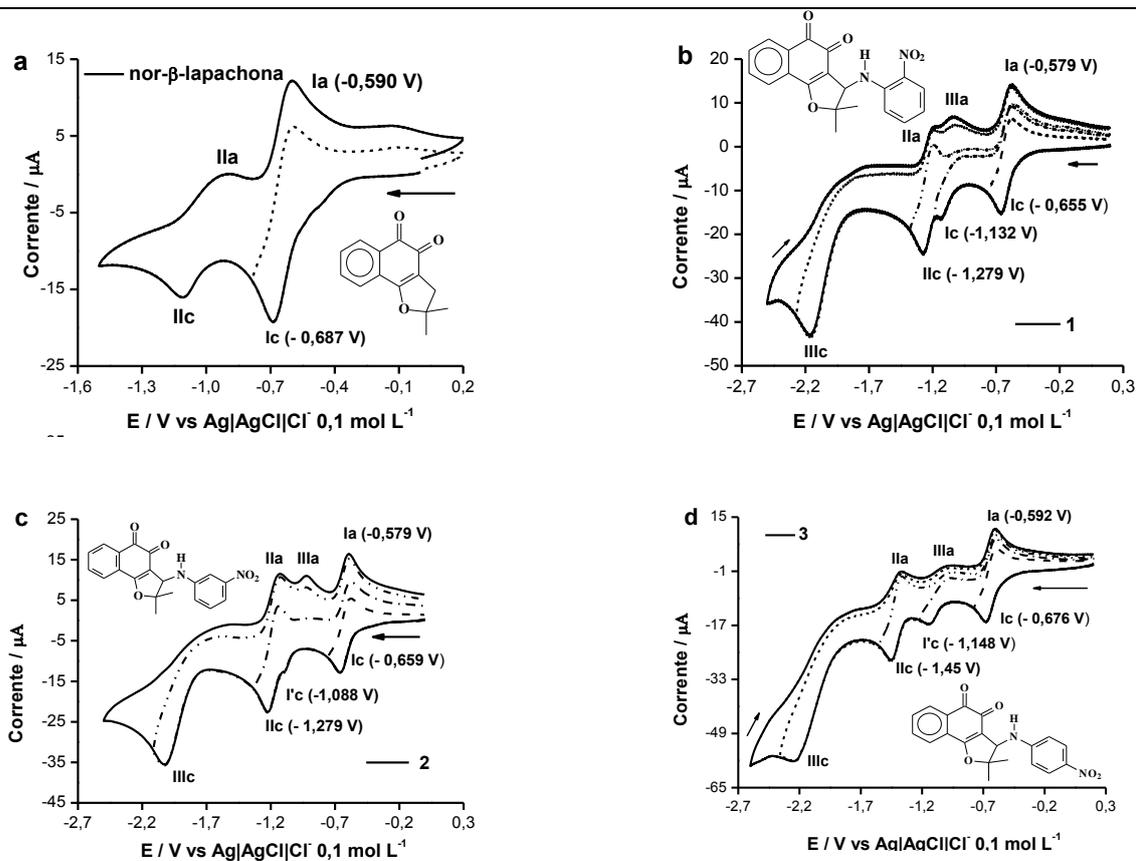
suscetível a reações químicas subseqüentes a sua formação, como desproporcionamento ou protonação (Crawford *et al.* 1996).

No que se refere aos compostos nitroaromáticos, sua redução em meio não aquoso também ocorre em duas etapas individuais. A primeira é relacionada à formação do ânion radical nitro (RNO_2^\ominus), processo reversível que envolve o consumo de um elétron, enquanto no segundo processo redox, o ânion radical é reduzido à hidroxilamina (RNHOH), etapa envolvendo o consumo de mais 3 elétrons/ 4H^+ . A depender da estabilidade da hidroxilamina, uma onda de oxidação relacionada à formação do derivado nitroso (RNO) ou outros intermediários, como azoxi ou azo derivados, é observada em varredura anódica (Goulart *et al.*, 2007).

Os estudos em voltametria cíclica da *nor*- β -lapachona e seus derivados nitroquinonas em meio aprótico são representados na Figura 29. O perfil voltamétrico observado para a *nor*- β -lapachona, Figura 29a, é caracterizado por duas ondas de redução bem definidas, sendo a primeira onda catódica ($I_c = -0,687$ V) com características de reversibilidade, conforme a presença da correspondente onda de oxidação ($I_a = -0,590$ V), de intensidade de corrente correspondente à onda de redução.

De acordo com a diferença entre os potenciais de pico anódico e catódico ($\Delta E = 97$ mV) para o par I_c/I_a , o processo se caracteriza como quasi-reversível, sendo o radical semiquinônico suscetível a reações químicas posteriores a sua formação. O segundo processo de redução ($II_c = -1,110$ V, relacionado à formação do diânion quinônico apresentou menor característica de reversibilidade, sendo observado um sinal largo anódico correspondente (II_a), de baixa intensidade de corrente. A menor reversibilidade deste intermediário, assim como sua menor corrente de pico decorre de sua maior basicidade, tornando-o mais suscetível a reações químicas acopladas a sua eletrogeração, como protonação, dimerização ou desproporcionamento. Por outro lado, a menor intensidade de corrente da onda II_c , metade da corrente observada em I_c , confirma a presença de reações químicas subseqüentes à formação da semiquinona, que tem sua concentração diminuída na dupla camada elétrica da superfície eletródica. Um possível mecanismo seria de desproporcionamento: $2\text{Q}^\ominus \rightarrow \text{Q} + \text{Q}^{2\ominus}$, gerando, a partir da semiquinona, a quinona de partida e o diânion, eletroinativo na redução.

Figura 29. Voltamogramas cíclicos da *nor*- β -lapachona e seus nitroderivados ($C = 1 \text{ mmol L}^{-1}$) em DMF/TBABF₄ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.



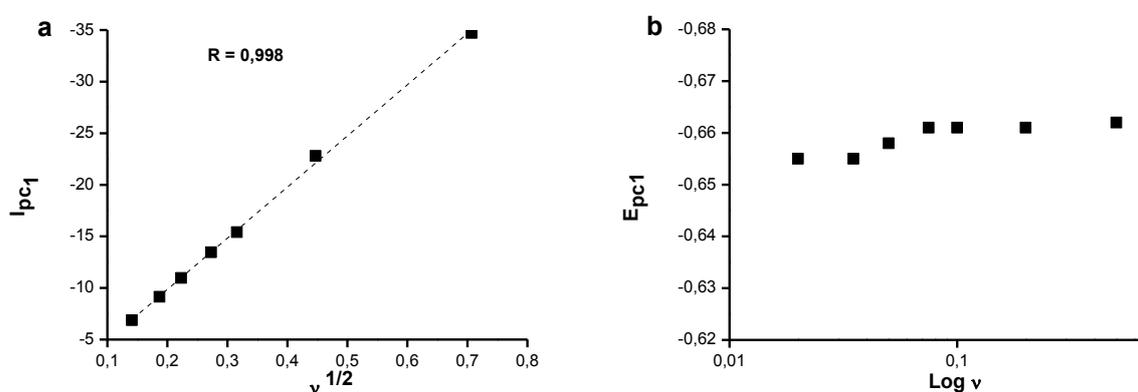
Fonte: Autor, 2011.

Os compostos **1**, **2** e **3**, apresentaram maior facilidade de redução em relação à *nor*- β -lapachona, conseqüência do efeito do grupo nitro eletroatraente, mesmo em ausência de efeito mesomérico, Figura 29b-d, com perfis voltamétricos diferenciados. Os voltamogramas para a redução das nitroquinonas **1** e **2** (QPh-*o*-NO₂) e (QPh-*m*-NO₂), Figura 29b-c, apresentaram três ondas principais, sendo observado também um ombro catódico (I'c) intermediário entre o primeiro e o segundo processo redox. Para o composto **3** (QPh-*p*-NO₂), Figura 29d, o voltamograma cíclico é caracterizado por quatro ondas de redução bem definidas, o que reforça a possibilidade de redução independente dos dois grupos eletroativos. Em todos os casos, a primeira onda de redução apresenta característica de reversibilidade, como observado para o composto padrão, *nor*- β -lapachona.

As análises dos parâmetros eletroquímicos, corrente e potencial de pico catódico, obtidos nos estudos das nitroquinonas mostraram que o transporte de massa até a superfície eletródica é controlado por processo difusional, conforme

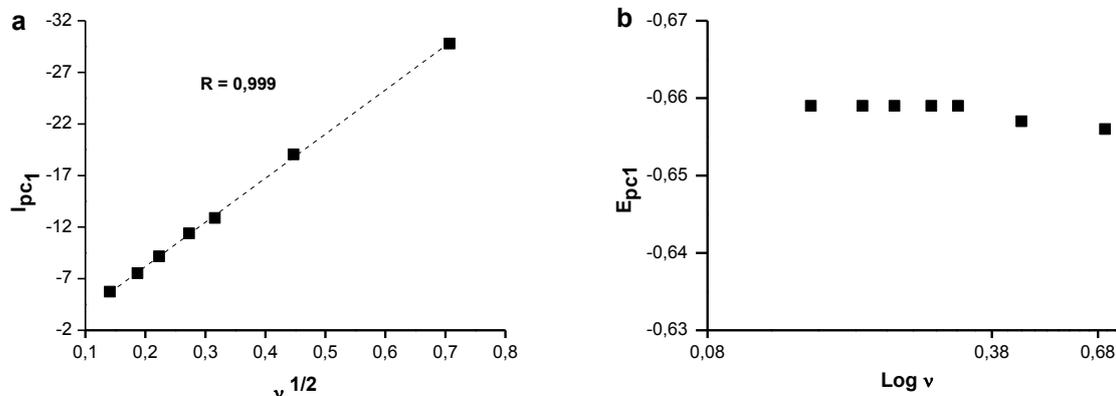
linearidade entre as correntes de pico catódico (I_{pc}) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$), Figuras 30-32a. Quanto aos potenciais de pico catódico, para o primeiro processo de redução (E_{pc1}), dos referidos compostos, Figuras 30-32b, apresentaram leve variação em função do $\log v$. Diante desta relação, juntamente com a presença de onda anódica referente ao primeiro processo de redução, em varredura reversa de potencial, pode-se concluir que o primeiro processo de redução é de natureza quasi-reversível, conforme testes diagnósticos definidos em literatura específica (Southampton Electrochemistry Group, 2001). Análises semelhantes para a onda IIc, também demonstraram que o processo nela ocorrido é de natureza quase-reversível.

Figura 30. a: Análise da corrente de pico (I_{pc1}), para a primeira onda de redução de **1**, em função de $v^{1/2}$, caracterizando o fenômeno de transporte de massa em solução. **b:** Gráfico de potencial de pico de primeira onda de redução em função do $\log v$ (DMF/TBABF₄ 0,100 mol L⁻¹).



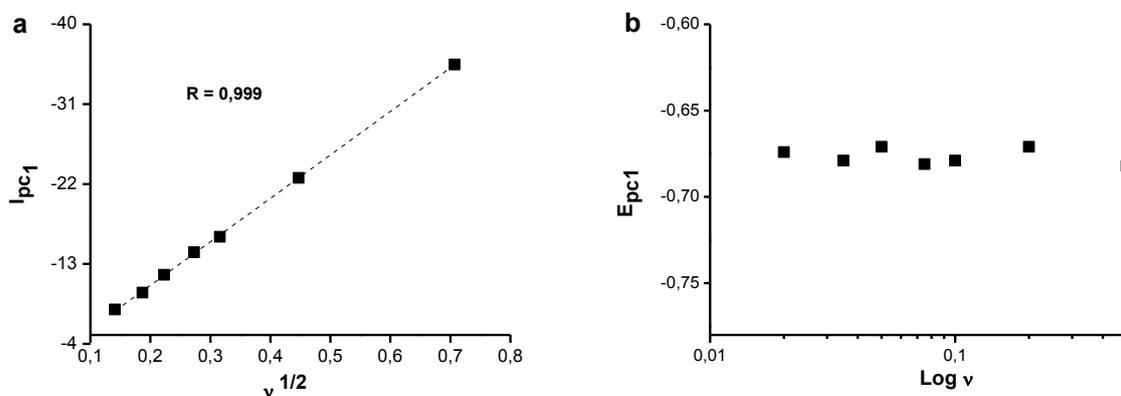
Fonte: Autor, 2011.

Figura 31. a: Análise da corrente de pico (I_{pc1}), para a primeira onda de redução de **2**, em função de $v^{1/2}$, caracterizando o fenômeno de transporte de massa em solução. **b:** Gráfico de potencial de pico de primeira onda de redução em função do $\log v$ (DMF/TBABF₄ 0,100 mol L⁻¹).



Fonte: Autor, 2011.

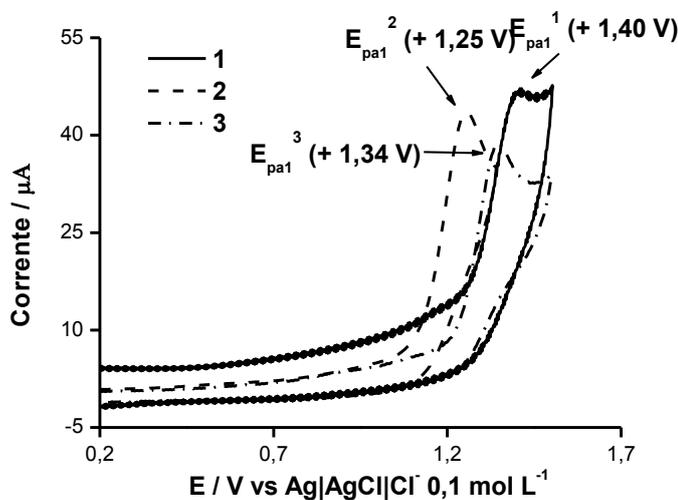
Figura 32: Análise da corrente de pico (I_{pc1}), para a primeira onda de redução de **3**, em função de $v^{1/2}$, caracterizando o fenômeno de transporte de massa em solução. **b:** Gráfico de potencial de pico de primeira onda de redução em função do $\log v$ (DMF/TBABF₄ 0,100 mol L⁻¹).



Fonte: Autor, 2011.

Estudos realizados em varredura anódica para os compostos também foram realizados para avaliar a eletroatividade de grupamento amino presente nestes derivados. A partir desses estudos, constatou-se a presença de uma onda de oxidação para cada composto em valor de potencial anódico elevado, Figura 33. Como observado no voltamograma cíclico desta figura, o derivado **1** (QPh-*o*-NO₂) apresenta maior dificuldade de oxidação, sendo o potencial de oxidação para o mesmo, o mais elevado.

Figura 33. Voltamogramas cíclicos dos nitroderivados da *nor*- β -lapachona, **1**, **2** e **3** ($C = 1 \text{ mmol L}^{-1}$) em DMF/TBABF₄ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2011.

Os maiores valores de potencial anódico para os compostos **1** e **3** (QPh-*o*-NO₂ e QPh-*p*-NO₂), Figura 33, são conseqüência do maior comprometimento do par de elétrons do grupo amino com o sistema aromático. A presença do grupo nitro eletroatrante nestas posições promove a diminuição da densidade eletrônica sobre o átomo de nitrogênio, por efeito indutivo e mesomérico dificultando, portanto, a oxidação para esses derivados.

De maneira geral, foi observado para os três derivados, processos de redução independentes para as respectivas funções quinona e nitroaromático. Esta característica é relevante para os compostos em questão e o entendimento das propriedades eletroquímicas das espécies eletrogeradas, ânions radicais e diânions, que são suscetíveis a reações químicas posteriores ao processo eletroquímico, constitui ferramenta valiosa para o entendimento das atividades biológicas apresentadas. Tal consideração resulta do fato de que a atividade biológica de substâncias detentoras de propriedades farmacofóricas decorre de ativação metabólica *in vivo*, processos de óxido-redução catalisados por sistema enzimático, que geram as espécies aniônicas ou radicalares supracitadas. Um sumário dos parâmetros eletroquímicos mais relevantes para os respectivos compostos é apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros eletroquímicos da *nor*- β -lapachona e seus derivados. Eletrodo de Carbono Vítreo, E_p vs. Ag|AgCl|Cl⁻ 0,1 mol L⁻¹, $v = 100$ mV s⁻¹.

Composto	$-E_{plc}$ (V)	$-E_{pla}$ (V)	ΔE_1 (mV)	$-E_{redox}$ (V)	$-E_{pl'c}$ (V)	$-E_{pllc}$ (V)	$-E_{plla}$ (V)	ΔE_2 (mV)	$-E_{plllc}$ (V)	$-E_{pllla}$ (V)
<i>Nor</i>-β-lapachona	0,687	0,590	97	0,596	----	1,110	----	----	----	----
1 (QPh-<i>o</i>-NO₂)	0,655	0,579	76	0,581	1,132	1,279	1,195	84	2,163	1,012
2 (QPh-<i>m</i>-NO₂)	0,659	0,579	80	0,583	1,088	1,279	1,134	88	2,038	1,012
3 (QPh-<i>p</i>-NO₂)	0,676	0,592	84	0,588	1,148	1,450	1,366	84	2,245	0,985

Fonte: Autor, 2011.

A partir dos dados da Tabela 3, observa-se um deslocamento anódico para o primeiro potencial de redução para os compostos nitrados, sendo a maior facilidade de redução para **1** e **2**, em relação à *nor*- β -lapachona. O composto **3** apresentou menor facilidade de redução em relação a **1** e **2**, contrariamente ao esperado pela presença do grupo nitro em *para*, com efeitos aditivos de campo e mesomeria. 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 lc/la e llc/lla para as três nitroquinonas excederam o valor teórico para uma transferência de um elétron reversível ($\Delta E = 60$ mV), sugerindo a presença de reação química acoplada ao processo eletroquímico, como dimerização, protonação ou desproporcionamento.

Considerando a características de reversibilidade observadas para os processo lc e llc das nitroquinonas e, em analogia ao perfil eletroquímico descrito na literatura para quinonas e nitroaromáticos em meio aprótico (De Abreu *et al.*, 2004; Goulart *et al.*; 2007), estes processos devem estar relacionados à formação do intermediário radical semiquinona ($Q^{\cdot-}$) e ao ânion radical nitro ($ArNO_2^{\cdot-}$). Já o ombro catódico (l'c) intermediário pode estar relacionado ao diânion quinônico. Assim, diante das evidências de reação química acoplada à redução eletroquímica destes compostos, fizeram-se necessários estudos mais detalhados sobre os mecanismos de redução dos mesmos.

Nesse sentido, foram realizados estudos eletroquímicos para caracterizar o processo eletródico e determinar as constantes cinéticas que acompanham tais processos, assim como outros parâmetros termodinâmico-cinéticos relevantes. É sabido que o uso de mercúrio, em vez de carbono vítreo, como eletrodo de trabalho em experimentos por voltametria cíclica permite uma diminuição considerável na corrente capacitiva, permitindo o aumento das velocidades de varredura nas análises. Assim, é possível estudar o par correspondente à redução das nitroquinonas para obtenção de informações sobre a estabilidade, o tempo de vida dos radicais e compreender os mecanismos de decaimento.

A seguir é descrito o comportamento eletroquímico da *nor*- β -lapachona e seus derivados em eletrodo de mercúrio. Nestes estudos, ensaios por voltametria cíclica foram realizados para investigar o mecanismo de redução das nitroquinonas. O objetivo principal destes estudos foi a medida da estabilidade dos intermediários de redução, aplicando a metodologia descrita por Omstead e colaboradores (1969), para análise das reações químicas acopladas ao processo heterogêneo de transferência de elétrons.

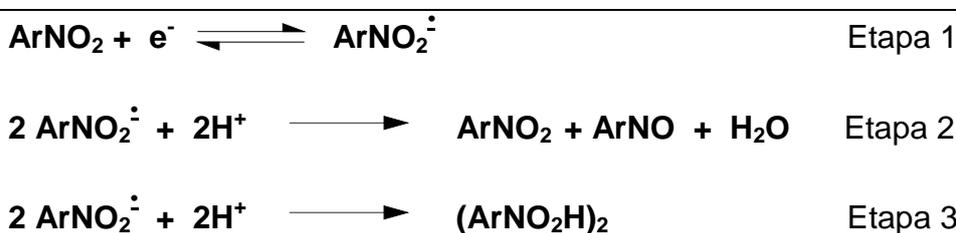
4.1.2 Estudos em Eletrodo de Mercúrio

Os estudos eletroquímicos realizados em eletrodo de mercúrio para a *nor*- β -lapachona e seus derivados foram realizados em uma faixa de potencial mais restrita que os respectivos estudos em eletrodo de carbono vítreo, devido a limitações do eletrólito e à complexidade dos perfis voltamétricos obtidos para as nitroquinonas. Contudo, os estudos por voltametria cíclica permitiram a obtenção de parâmetros eletroquímicos relevantes, que além da informação a respeito da energia requerida para redução das nitroquinonas (E_{pc}), forneceram informações referentes à cinética do processo de transferência de elétrons e estabilidade dos ânions radicais eletrogerados.

No processo de redução eletroquímica de nitroaromáticos em meio aprótico, estudos anteriores (Carbajo *et al.*, 2002; Argüello *et al.*; 2006; Goulart *et al.*, 2007) descrevem a suscetibilidade do ânion radical nitro sofrer reações químicas posteriores a sua geração, um mecanismo EC (Eletroquímico-Químico). As possíveis reações químicas acopladas ao processo de transferências de elétrons

relatadas são desproporcionamento (Etapa 2) e/ou dimerização (Etapa 3), Figura 34. Uma vez que quinonas e nitroaromáticos apresentam similaridades, pois catalisam reações de transferência de elétrons biológicas, principalmente por meio de reações de redução para gerar ânions radicais (semiquinonas e ânions radicais nitro), que a depender de sua estabilidade, podem transferir seus elétrons livres a moléculas aceptoras, como oxigênio molecular e assim gerar o estresse oxidativo celular, fez-se necessário a análise da estabilidade das espécies derivadas da redução eletroquímica das nitroquinonas.

Figura 34. Mecanismo proposto para reação química acoplada ao processo de formação ânion radical nitro.

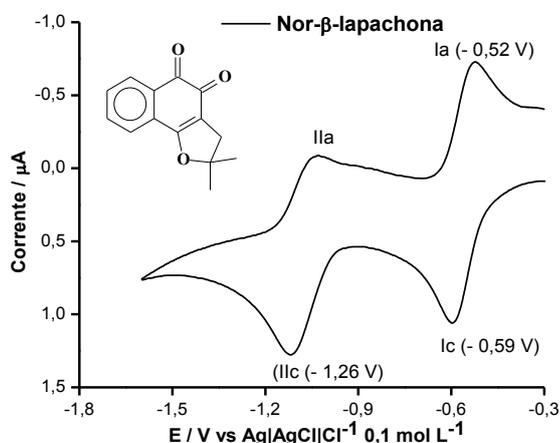


Fonte: Autor, 2011.

Nos estudos utilizando eletrodo de mercúrio, a *nor*- β -lapachona apresentou um perfil voltamétrico muito similar ao observado em carbono vítreo, Figura 35, caracterizado por duas ondas de redução (Ic e IIc), sendo a primeira onda com característica de reversibilidade ($\Delta E = 70$ mV), conforme a presença de onda anódica correspondente (Ia) em varredura reversa de potencial, referente à formação do ânion radical semiquinônico. Já o diânion gerado em IIc se mostra menos estável, conforme baixa intensidade de corrente referente a onda de oxidação relacionada ao mesmo (IIa), em varredura reversa.

Contudo, vale ressaltar que o perfil voltamétrico observado para a *nor*- β -lapachona em eletrodo de mercúrio, contrariamente ao obtido em eletrodo de carbono vítreo, Figura 29a, não fornece indícios de reação química acoplada ao processo eletroquímico, sendo a diferença de potencial de pico catódico e anódico ($\Delta E = 70$ mV) próximo do valor teórico (60 mV) para uma transferência reversível de um elétron, um comportamento padrão para a eletroredução de quinonas em meio aprótico.

Figura 35. Voltamograma cíclico da *nor*- β -lapachona ($C = 1 \text{ mmol L}^{-1}$) em DMSO/TBAP ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), eletrodo Hg, $v = 100 \text{ mV s}$.



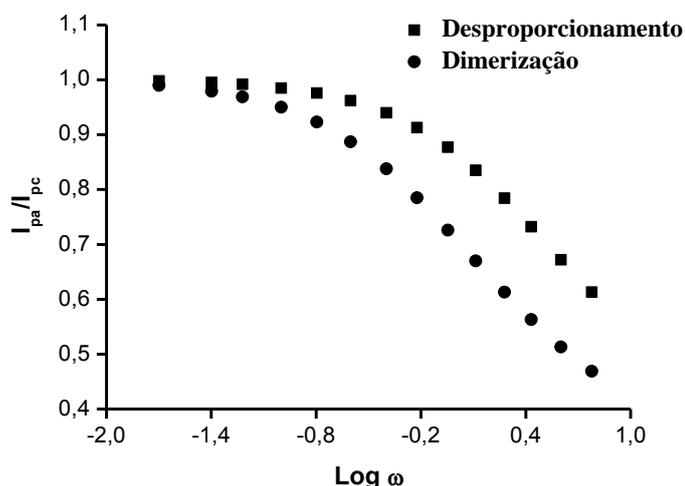
Fonte: Autor, 2011.

Nos estudos eletroquímicos das nitroquinonas **1**, **2** e **3**, o potencial referente ao primeiro processo de redução é situado em valor similar àquele da quinona. No entanto, em função da presença do grupo nitro substituinte, características bem peculiares foram observadas para o segundo processo de redução. Na faixa de potencial de trabalho, os compostos **1** e **2** apresentaram um comportamento similar, porém o perfil voltamétrico do nitroderivado **3** diferiu consideravelmente. Assim, diante da complexidade relacionada ao segundo processo de redução, os estudos foram voltados para caracterização do intermediário formado na primeira onda catódica, o ânion radical semiquinônico e, assim os parâmetros cinéticos relacionados a essa espécie eletrogerada foram determinados.

A literatura apresenta vários estudos voltados à caracterização dos intermediários de redução do grupo nitroaromático (Carbajo *et al.*, 2002; Bollo *et al.*, 2005; Bollo *et al.*, 2011). Nesses trabalhos, o tipo de reação química posterior ao processo eletroquímico, assim como a taxa reacional referentes a estas foram determinadas seguindo metodologia de Olmstead e colaboradores (1969). Esses autores fornecem um modelo matemático útil para reação química de dimerização ou desproporcionamento acoplada à etapa eletroquímica, utilizando a técnica de voltametria cíclica (Olmstead *et al.*, 1969). A partir dos parâmetros eletroquímicos obtidos por voltametria, é possível determinar a razão I_{pa}/I_{pc} , o parâmetro cinético ω ,

mencionado no procedimento experimental, e assim construir uma curva de trabalho para caracterizar o tipo de reação posterior à etapa eletroquímica, Figura 36.

Figura 36. Curva teórica desenvolvida para mecanismo de desproporcionamento e dimerização.

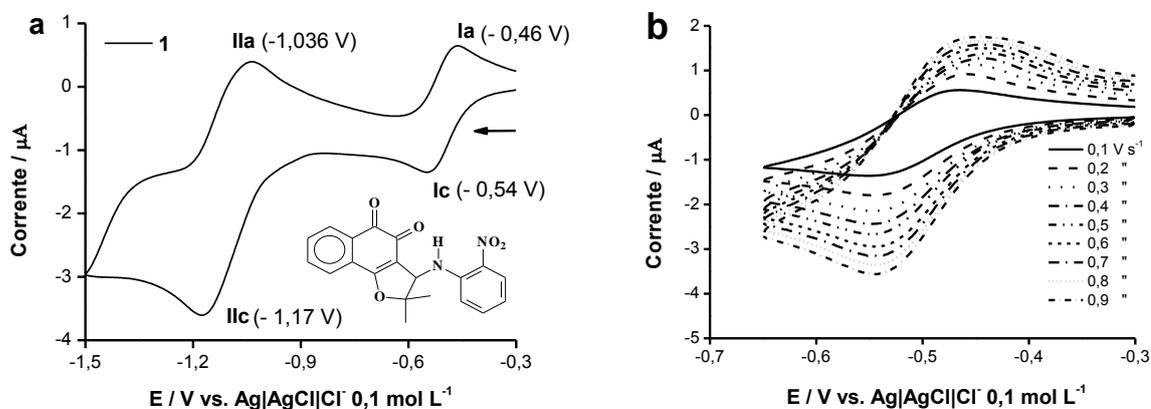


Fonte: Olmstead *et al.*, 1969, adaptado.

De acordo com a Figura 36, construída a partir dos valores teóricos descritos na literatura (Olmstead *et al.*, 1969), observa-se que a diferença entre um mecanismo de dimerização e desproporcionamento é o decaimento da razão I_{pa}/I_{pc} em função do $\text{log } \omega$, o qual é mais acentuado para uma reação de dimerização. Assim, seguindo este modelo, estudos eletroquímicos das nitroquinonas foram realizados para caracterização do mecanismo de reação subsequente à etapa eletroquímica e, avaliada a estabilidade dos intermediários de redução.

O perfil voltamétrico do nitroderivado **1** (QPh-*o*-NO₂) é representado na Figura 37a, o qual apresentou duas ondas de redução bem definidas (Ic e IIc) e duas ondas de oxidação correspondentes (Ia e IIa). Observa-se que a corrente de pico da segunda onda catódica é pouco mais que o dobro da corrente relacionada à primeira e, como já mencionado, pode se referir tanto à formação do ânion radical nitro quanto à etapa final de redução da quinona ao seu diânion. Esta consideração é reforçada pelo potencial correspondente ao processo, muito similar ao observado para a *nor*-β-lapachona.

Figura 37. Voltamograma cíclico de **1** ($C_1 = 1 \text{ mmol L}^{-1}$) em DMSO/TBAP ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), eletrodo de Hg. **a:** Voltamograma em 100 mV s^{-1} . **b:** Dependência da corrente de pico para a primeira onda de redução em função da velocidade a velocidade varredura.

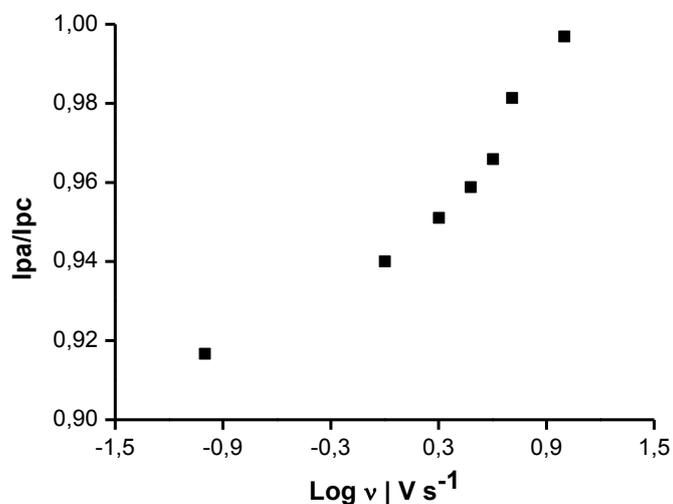


Fonte: Autor, 2011.

A estabilidade do ânion radical semiquinônico, gerado na primeira onda de redução de **1** foi avaliada pela variação da velocidade de varredura, Figura 37b. Diante da diferença entre os potenciais de pico anódico e catódico ($\Delta E = 80 \text{ mV}$), analogamente aos estudos em carbono vítreo, que excederam o valor esperado para um sistema de transferência reversível de um elétron (60 mV) em meio aprótico, característico de processo quasi-reversível, a presença de reação química subsequente à formação deste intermediário foi confirmada.

A partir deste estudo, foi determinada a razão I_{pa}/I_{pc} , conforme procedimento teórico descrito por Omstead e colaboradores (1969), sendo a velocidade de varredura variada de 0,1 a $10,0 \text{ V s}^{-1}$, a qual aumentou até a unidade, o valor teórico para um processo totalmente reversível, em função deste parâmetro. A estabilidade do ânion radical depende fundamentalmente do meio reacional, o que é refletido no decaimento da corrente de pico da correspondente onda de oxidação (Ia). Assim, o melhor parâmetro para análise da estabilidade de espécies radicalares é a razão I_{pa}/I_{pc} , que revela a tendência de espécies eletrogeradas sofrerem reação química. Desta forma, a partir da curva observada na Figura 38, a presença de reação química após o processo de transferência de elétrons, um mecanismo eletroquímico-químico (EC_i), foi caracterizada.

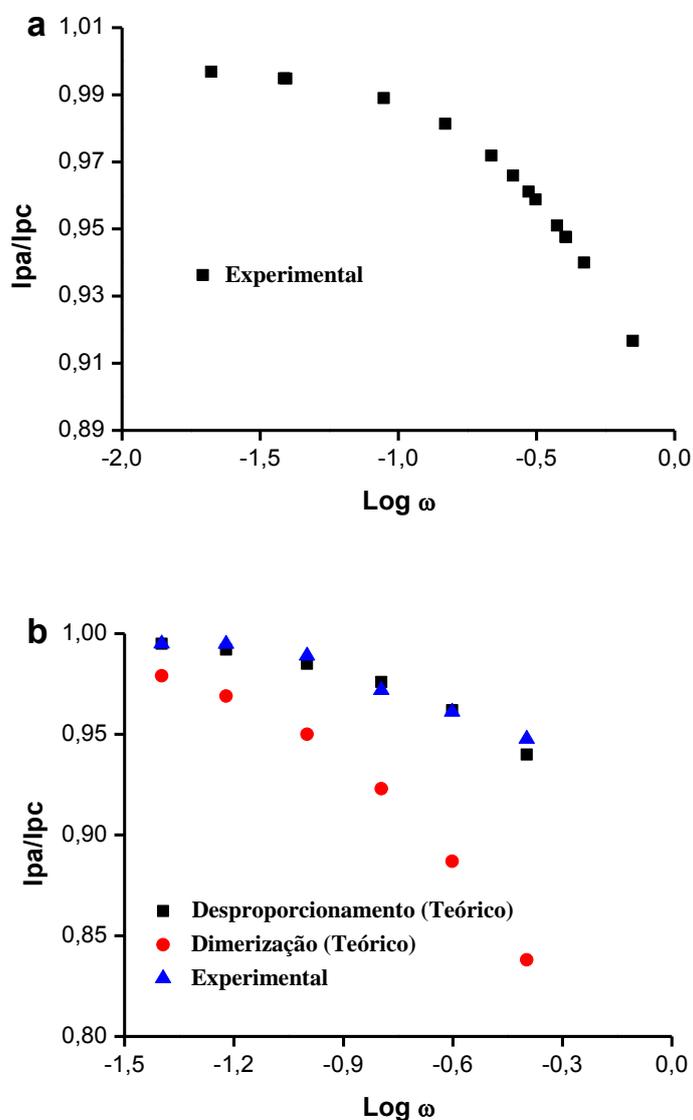
Figura 38. Dependência da razão I_{pa}/I_{pc} em relação à velocidade de varredura. DMSO/TBAP ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).



Fonte: Autor, 2011.

Adicionalmente, foi calculado o parâmetro cinético ω , que incorpora os efeitos da constante reacional, concentração do composto e velocidade de varredura e, construída a curva de trabalho para caracterização do tipo de reação química posterior à etapa eletroquímica, Figura 39a. O perfil desta curva de trabalho foi comparado com as curvas teóricas de dimerização e desproporcionamento (Olmstead *et al.*, 1969), havendo coincidência com o perfil para uma reação de desproporcionamento, Figura 39b. Por conseqüência, concluiu-se que o decaimento do ânion radical semiquinônico se dá por desproporcionamento. A partir do parâmetro ω , a constante para reação química de segunda ordem pôde ser obtida por meio da curva ω vs. τ , Figura 40, resultando numa relação linear descrita pela equação 19 (pg. 74).

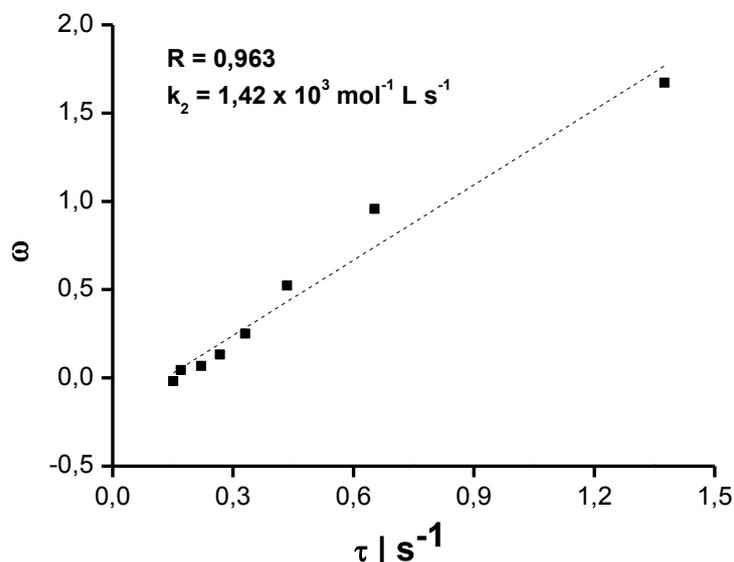
Figura 39a: Curva experimental da razão I_{pa}/I_{pc} em função do log de ω obtida para **1**. **b:** (■) Curva teórica para desproporcionamento; (●) Curva teórica de dimerização (Olmstead *et al.* 1969); (▲) Curva experimental de **1**.



Fonte: Autor, 2011.

Assim, a constante da reação química de segunda ordem foi calculada ($k_2 = 1420 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$), que se refere a um decaimento do ânion radical semiquinônico por reação de desproporcionamento. Determinada a constante de decaimento, o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) do ânion radical foi calculado por meio da equação 21 (página 75), sendo o mesmo igual a 0,70 s.

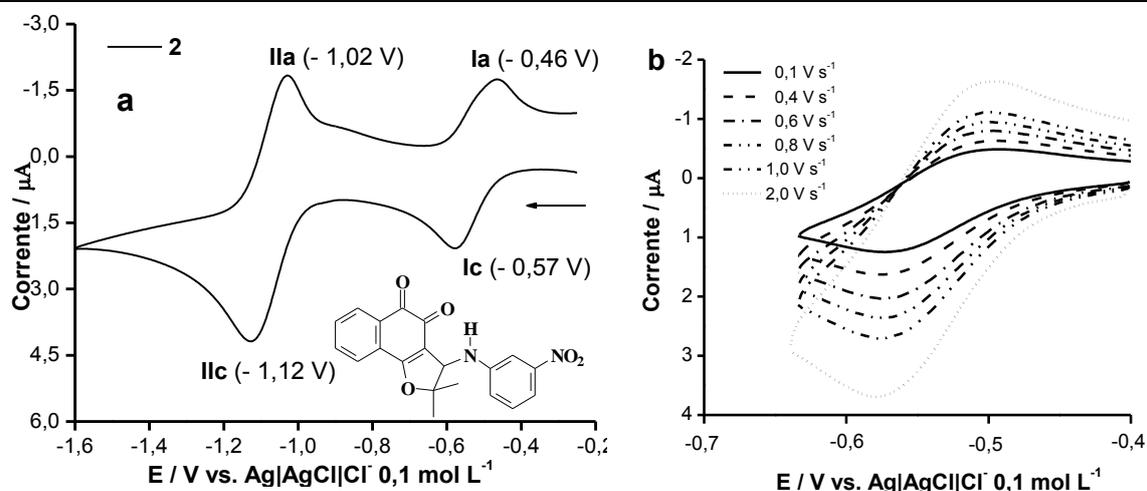
Figura 40. Curva ω vs τ , DMSO/TBAP (0,1 mol L⁻¹), de acordo com o procedimento teórico para a reação de desproporcionamento.



Fonte: Autor, 2011.

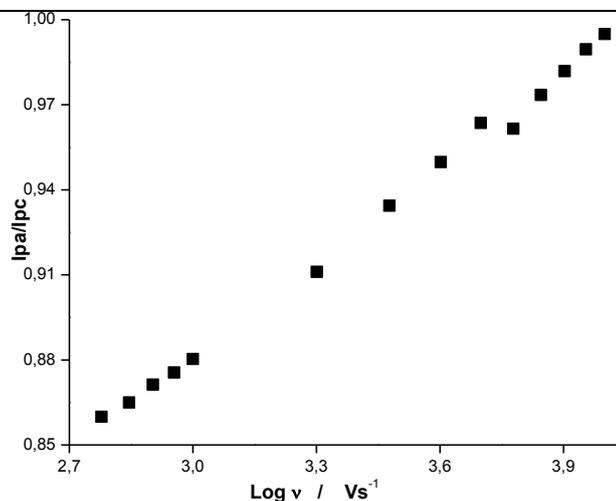
O mesmo procedimento descrito para **1** foi realizado para as nitroquinonas **2** e **3**, para então quantificar as estabilidades dos intermediários radicalares. Para o derivado **2** (QPh-*m*-NO₂), em eletrodo de mercúrio, as duas ondas catódicas (Ic e IIc) presentes no voltamograma, Figura 41a, também apresentaram características de reversibilidade, como pode ser observado pela presença de suas correspondentes ondas anódicas (Ia e IIa). Uma maior diferença, em relação à nitroquinona **1**, para os valores de pico anódico e catódico ($\Delta E = 110$ mV), foram obtidos, descartando a possibilidade de um mecanismo totalmente reversível governar o processo eletródico. Desta forma, a análise da razão I_{pa}/I_{pc} para a primeira onda de redução, obtida pelo estudo em função da velocidade de varredura, Figura 40b, aumentou em função deste parâmetro até valores de uma unidade, em altas velocidades de varredura, Figura 42, caracterizando a presença de reação química posterior ao processo eletroquímico (ECi).

Figura 41. Voltamogramas cíclicos de **2** ($C_2 = 1 \text{ mmol L}^{-1}$) em DMSO/TBAP ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de Hg. **a:** Voltamograma a 100 mV s^{-1} . **b:** Dependência da corrente de pico para a primeira onda de redução em função da velocidade a velocidade varredura.



Fonte: Autor, 2011.

Figura 42. Dependência da razão I_{pa}/I_{pc} em relação à velocidade de varredura. DMSO/TBAP ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

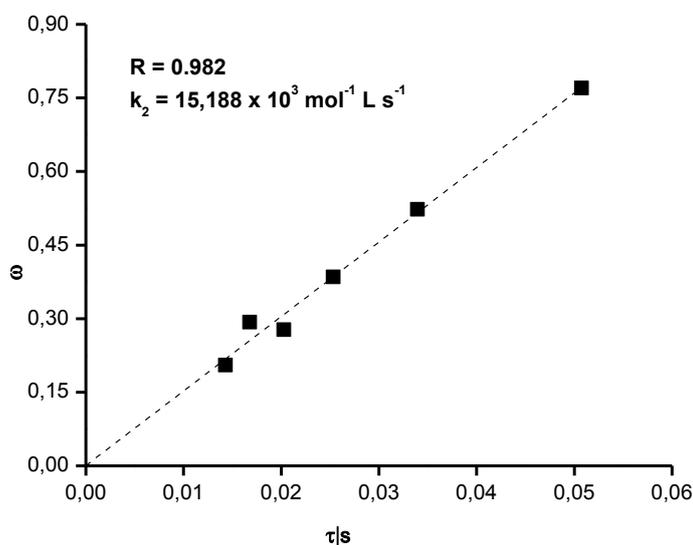


Fonte: Autor, 2011.

Assim como realizado para **1** (Figura 39), foi construída a curva de trabalho entre a razão I_{pa}/I_{pc} e o $\log \omega$, que de acordo com o perfil observado, caracterizou o decaimento do ânion radical por desproporcionamento. Em seguida, os procedimentos realizados a partir dos dados experimentais de **2** permitiram determinar a taxa reacional para o decaimento do ânion radical semiquinônico. A curva de trabalho de ω versus τ foi construída, Figura 43, obtendo-se uma relação

linear que permitiu a determinação da constante de decaimento ($k_2 = 15.188 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$), e de posse deste valor, determinou-se o tempo de meia vida do ânion radical ($t_{1/2} = 0,06 \text{ s}$).

Figura 43. Curva ω vs τ , DMSO/TBAP ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) para **2**, de acordo com o procedimento teórico para reação de desproporcionamento.



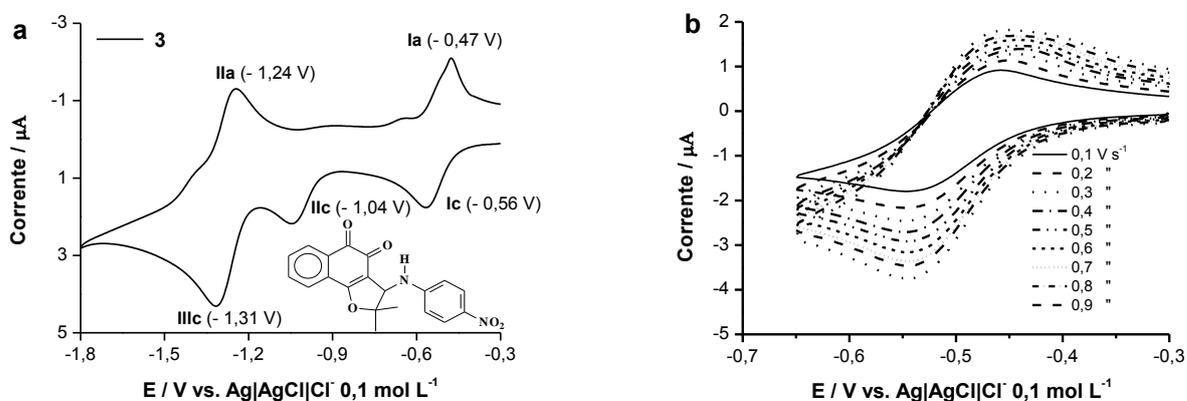
Fonte: Autor, 2011.

Os estudos com **3** (QPh-*p*-NO₂) apresentaram um perfil voltamétrico distinto em relação aos dois outros compostos, sendo observado, nesse caso, três ondas de redução (Ic, IIc e IIIc) na faixa de potencial analisada, Figura 44a. Neste caso, considerando que as duas primeiras ondas se encontram em potenciais similares àqueles referentes à redução da *nor*- β -lapachona (Figura 35), é possível sugerir que o quinona reduz primeiro que o grupo nitro, que começa a ser reduzido apenas em IIIc. Contudo, as moléculas apresentam um próton ácido (grupo amino), e a onda IIc pode ser relacionada a auto-protonação.

De acordo com o perfil voltamétrico de **3**, Figura 44a, o primeiro par de ondas de redução (Ic), e oxidação (Ia), é de natureza quasi-reversível ($\Delta E = 90 \text{ mV}$). A segunda onda redução (IIc = -1,04 V) não apresenta correspondente anódica, sendo portanto um processo irreversível ou reversível com reação química acoplada. Este perfil se assemelha bastante ao precursor *nor*- β -lapachona, podendo estar relacionado ao processo final de redução da quinona ao diânion, porém como já mencionado, pode ser consequência do efeito do próton ácido em sua molécula. Já

para terceira onda catódica (IIIc) é observado a presença de onda de oxidação (IIa) correspondente, com característica de processo reversível ($\Delta E = 70$ mV), sendo esta, possivelmente relacionada à redução do grupo nitro. Para caracterização do primeiro processo de redução, que apresentou menor característica de reversibilidade, realizou-se estudo detalhado do mesmo, como demonstrado na Figura 44b.

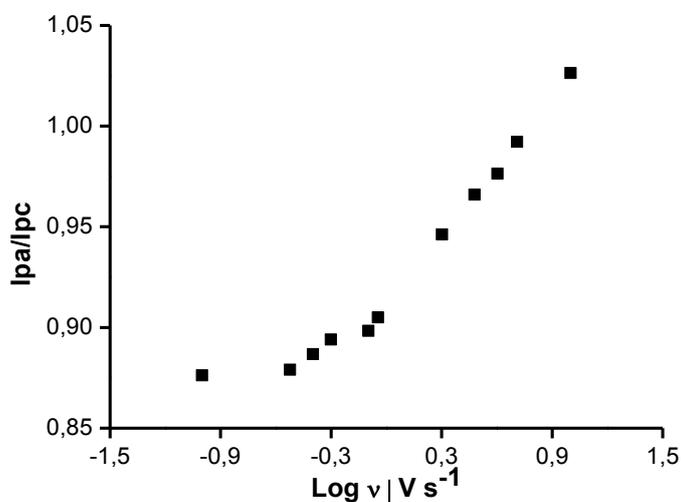
Figura 44. Voltamogramas cíclicos de **3** ($C = 1$ mmol L⁻¹) em DMSO/TBAP (0,1 mol L⁻¹). Eletrodo de Hg. **a:** Voltamograma a 100 mV s⁻¹. **b:** Estudo da primeira onda de redução em função da velocidade a velocidade varredura.



Fonte: Autor, 2011.

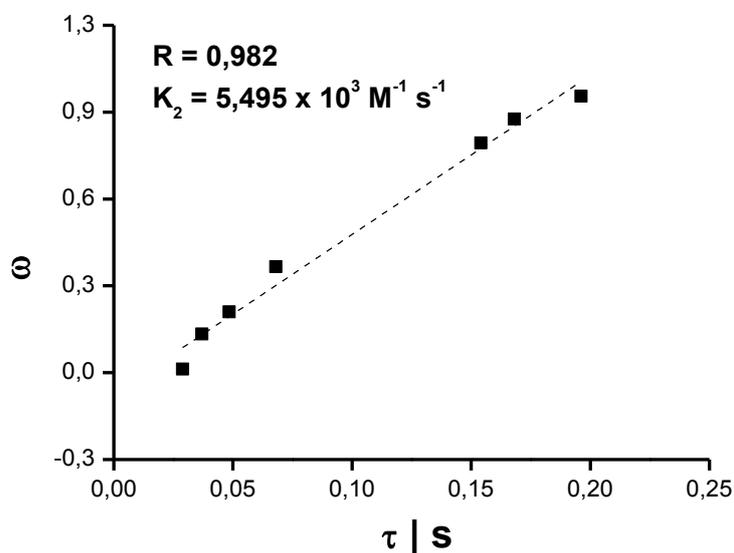
Seguindo a mesma tendência já observada para as nitroquinonas, a razão I_{pa}/I_{pc} para **3** aumentou gradativamente com a velocidade de varredura, até a unidade, confirmando a presença de reação química acoplada à redução eletroquímica (ECi), Figura 45. A constante cinética ($k_2 = 5.495$ mol⁻¹ L s⁻¹) associada a este processo foi determinado a partir da curva de trabalho ω versus τ , Figura 46, bem como o tempo de meia vida para o radical formado a partir de **3** ($t_{1/2} = 0,18$ s) foram determinados.

Figura 45. Dependência da razão I_{pa}/I_{pc} em relação à velocidade de varredura. DMSO/TBAP ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).



Fonte: Autor, 2011.

Figura 46. Curva ω vs τ , DMSO/TBAP ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) para **3**, de acordo com o procedimento teórico para reação de desproporcionamento.



Fonte: Autor, 2011.

Diante dos parâmetros cinéticos determinados a partir dos estudos por voltametria cíclica em eletrodo de mercúrio, Tabela 4, é observada maior estabilidade para o produto da redução em primeira etapa eletroquímica da nitroquinona **1** (*orto*-nitro), sendo obtida a menor taxa reacional para este derivado e

o maior tempo de meia-vida. Em seguida, aparece o *para*-nitro derivado, com estabilidade 3x menor. O composto *meta*-nitrado é o menos estável, com estabilidade cerca de 10x menor.

Tabela 4. Parâmetros eletroquímicos obtidos para os derivados da *nor*- β -lapachona. Análise da estabilidade do intermediário gerado no primeiro processo de redução. Eletrodo de Mercúrio, E_p vs. Ag|AgCl|Cl⁻ 0,1 mol L⁻¹, meio DMSO/TBAP (0,1 mol L⁻¹).

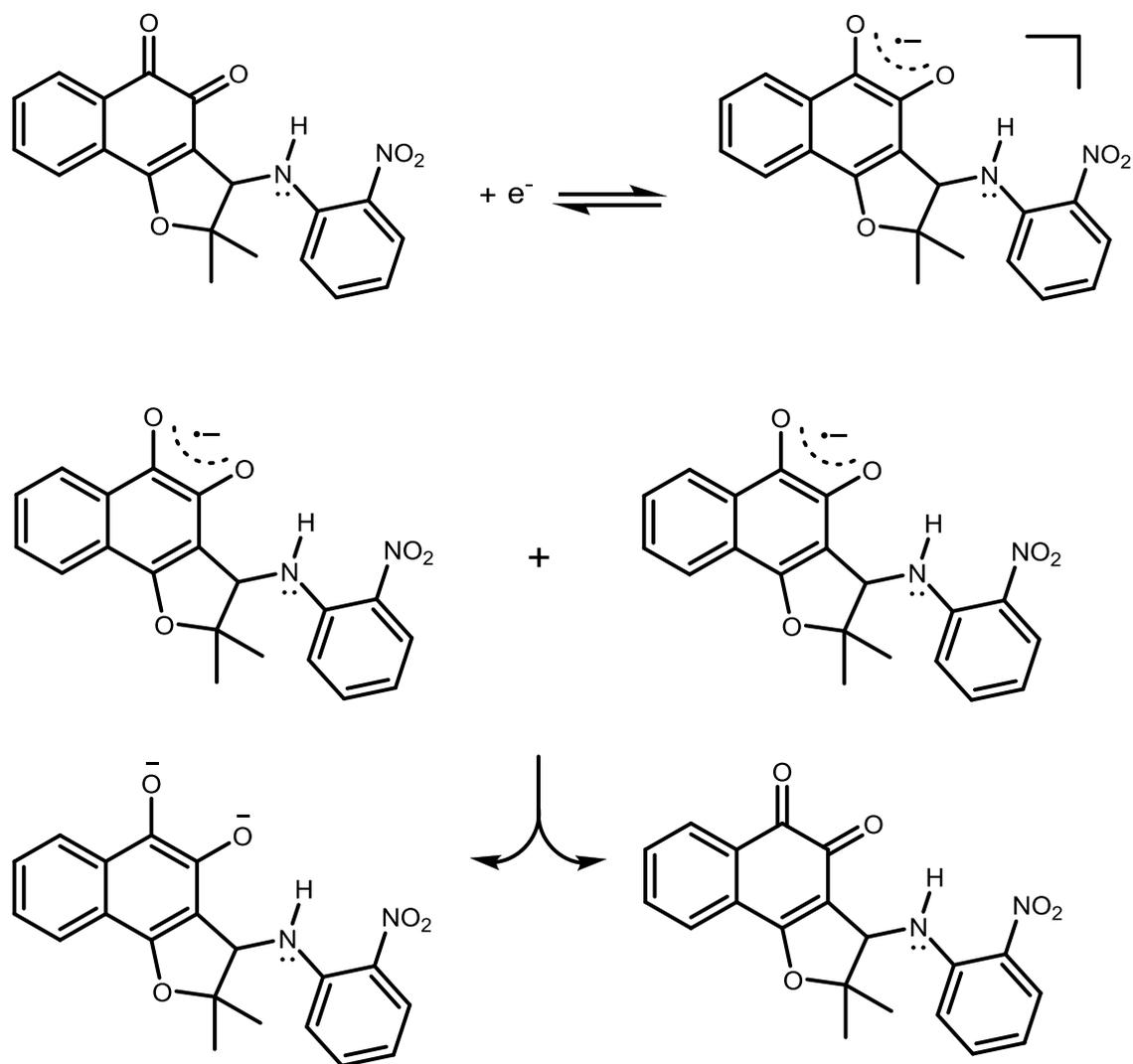
Composto	$-E_{pc1}$ (V)	ΔE (V)	k_2 (mol ⁻¹ L s ⁻¹)	$t_{1/2}$ (s)
<i>Nor</i>-β-lapachona	0,59	0,07	----	----
1 (QPh-<i>o</i>-NO₂)	0,54	0,08	1420	0,70
2 (QPh-<i>m</i>-NO₂)	0,57	0,07	15188	0,06
3 (QPh-<i>p</i>-NO₂)	0,56	0,09	5495	0,18

Fonte: Autor, 2011.

Os estudos por voltametria cíclica realizados em eletrodo de mercúrio, empregando o modelo matemático descrito por Olmstead e colaboradores para reação química de segunda ordem, desproporcionamento e dimerização, permitiram caracterizar a reação química posterior a redução eletroquímica das nitroquinonas. Assim, semiquinonas geradas na primeira onda de redução reagem entre si, em uma reação de ordem 2, regenerando a quinona e formando um diânion quinônico, como demonstrado na Figura 47 para o composto **1**.

Diante do comportamento eletroquímico distinto observado para cada nitroquinona, estudos por polarografia foram realizados no intuito de obter informações adicionais sobre a redução eletroquímica das mesmas. Os estudos por voltametria cíclica, considerando os respectivos potenciais para a *nor*- β -lapachona, sugerem que a função quinona de **3** se reduz completamente antes do grupo nitro, enquanto que para **1** e **2**, a segunda e terceira ondas de redução são muito próximas, e se referem tanto à redução do ânion radical semiquinônico quanto do grupo nitro.

Figura 47. Mecanismo de redução eletroquímica do nitroderivado **1** ao ânion radical semiquinona e subsequente reação química de desproporcionamento.

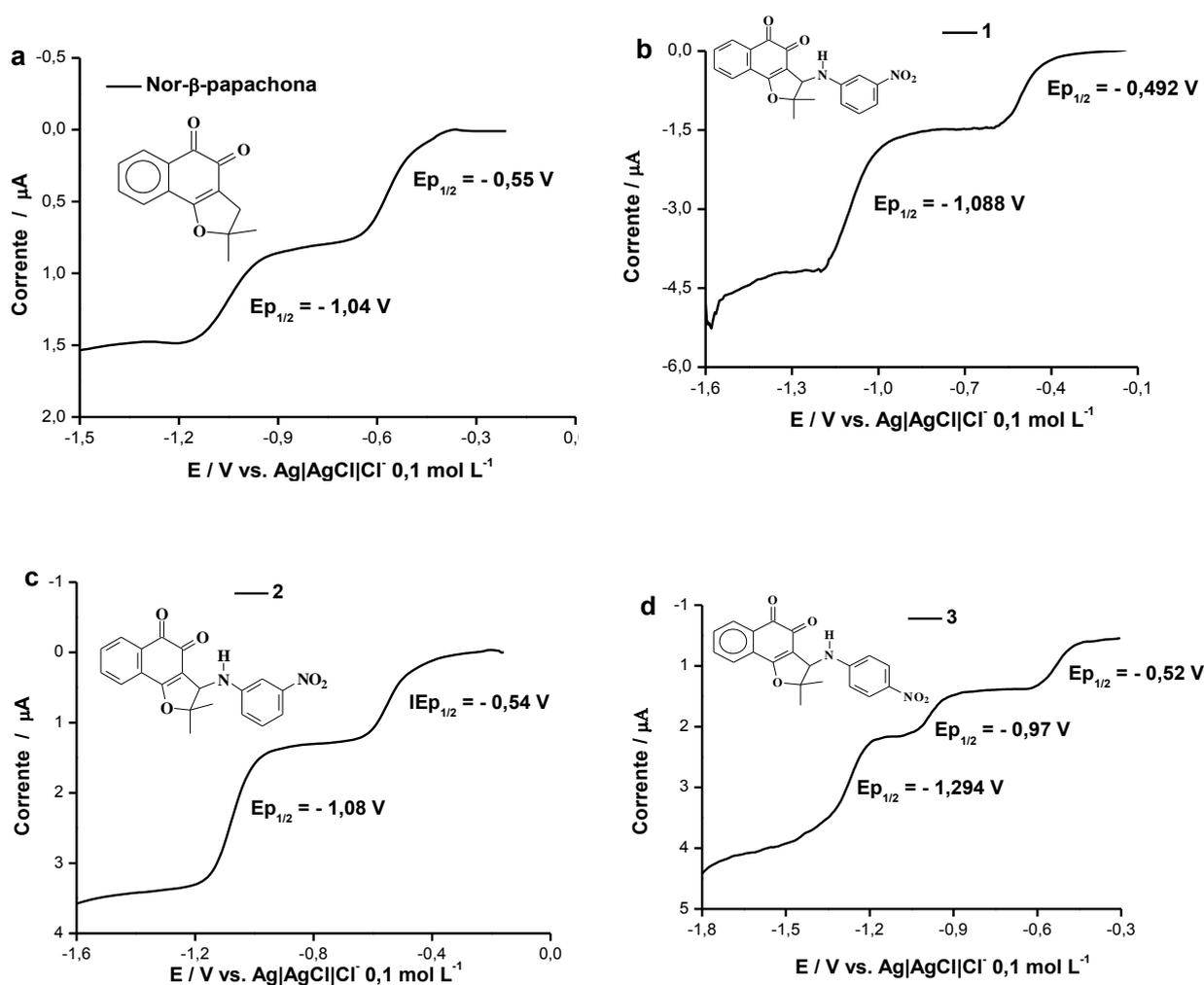


Fote: Autor, 2011.

Nesse sentido, o comportamento eletroquímico da quinona e seus derivados em eletrodo de mercúrio foi investigado, por estudos polarográficos, Figura 48. Os estudos em eletrodo de mercúrio fornecem medidas com alta precisão, uma vez que a superfície eletródica é continuamente renovada. Em polarografia, tem-se que a altura da corrente de pico é diretamente relacionada com o número de elétrons envolvidos no processo. Assim, polarogramas da *nor*- β -lapachona e derivados foram obtidos para que o mecanismo de redução eletroquímica fosse caracterizado. Na Figura 48a-c, são representados os polarogramas dos compostos mencionados.

Observou-se a partir destes estudos, similaridades nos perfis de redução entre a *nor*- β -lapachona e as nitroquinonas. Para os compostos **1** e **2**, figura 48b-c, as correntes faradaicas relativas ao segundo processo de redução apresentam uma relação de 2:1 para primeiro pico, evidenciando o envolvimento de dois elétrons nesse processo. Desta forma, a partir do estudo realizado, é possível concluir que o segundo processo redox refere-se tanto à redução do grupo nitro quanto à redução da semiquinona formada no primeiro processo eletroquímico.

Figura 48. Polarografia TAST para *nor*- β -lapachona (a) e os derivados nitroquinonas, **1** (b), **2** (c) e **3** (d), ($C = 1 \text{ mmol L}^{-1}$) em DMSO/TBAP ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de Hg.



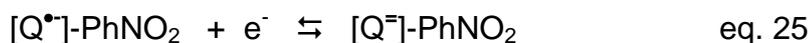
Fonte: Autor, 2011.

A partir destes resultados, é possível racionalizar que o mecanismo de redução das nitroquinonas **1** e **2**, em eletrodo de mercúrio, envolve primeiramente a

redução da função *o*-quinona ao radical semiquinônico, um processo que envolve a transferência de um elétron (eq. 23), enquanto o segundo pico de redução se refere à redução desta espécie a diânion radical nitroquinona (eq. 24). Para facilitar o entendimento, as nitroquinonas serão representadas como [Q]-PhNO₂.



Quanto a nitroquinona **3** (QPh-*p*-NO₂), seu polarograma difere consideravelmente daqueles obtidos para **1** e **2**, sendo que os dois primeiros picos catódicos apresentam a mesma intensidade de corrente faradaica, Figura 48c. Este perfil peculiar permite deduzir que neste derivado a função quinona pode ser reduzida completamente antes da função nitro, conforme expressado pela equação 25, porém a possibilidade de auto-protonação para a onda IIc não é descartada. Em potenciais superiores, mais negativos que IIc, inicia-se a redução do grupo nitro que resulta na formação do derivado hidroxilamínico, equação 26 (Viodé *et al.*, 1999).



Os parâmetros eletroquímicos referentes aos estudos polarográficos são apresentados na Tabela 5. Uma vez que em polarografia, o potencial de pico a meia altura de onda corresponde ao potencial de redução de uma espécie eletroativa, a maior tendência de redução das nitroquinonas em relação ao precursor é confirmada, sendo esta referente ao derivado **1**.

Tabela 5. Parâmetros eletroquímicos obtidos para *nor*-β-lapachona e seus derivados. Eletrodo de Hg, E_p vs. Ag|AgCl|Cl⁻ 0,1 mol L⁻¹ meio DMSO/TBAP (0,1 mol L⁻¹).

Composto	- E _{p/2} (V)	I _d (μA)	- E _{p/2} (V)	I _d (μA)
<i>Nor</i> -β-lapachona	0,550	0,73	1,040	0,65
1 (QPh- <i>o</i> -NO ₂)	0,492	1,46	1,080	2,70
2 (QPh- <i>m</i> -NO ₂)	0,540	1,25	1,080	2,13
3 (QPh- <i>p</i> -NO ₂)	0,520	0,82	0,970	0,84

Fonte: Autor, 2011.

Assim, diante das considerações realizadas até então, fundamentadas nos perfis polarográficos apresentados por cada composto, Figura 48a-c, aliado aos estudos cinéticos realizados seguindo o procedimento matemático descrito por Olmstead e colaboradores, foi demonstrado que o primeiro processo de redução das nitroquinonas é acompanhado por reação química de segunda ordem (desproporcionamento). O mecanismo eletroquímico-químico (EC) é representado na Figura 46 para o composto **1**.

4.2 Estudos em Espectroeletroquímica

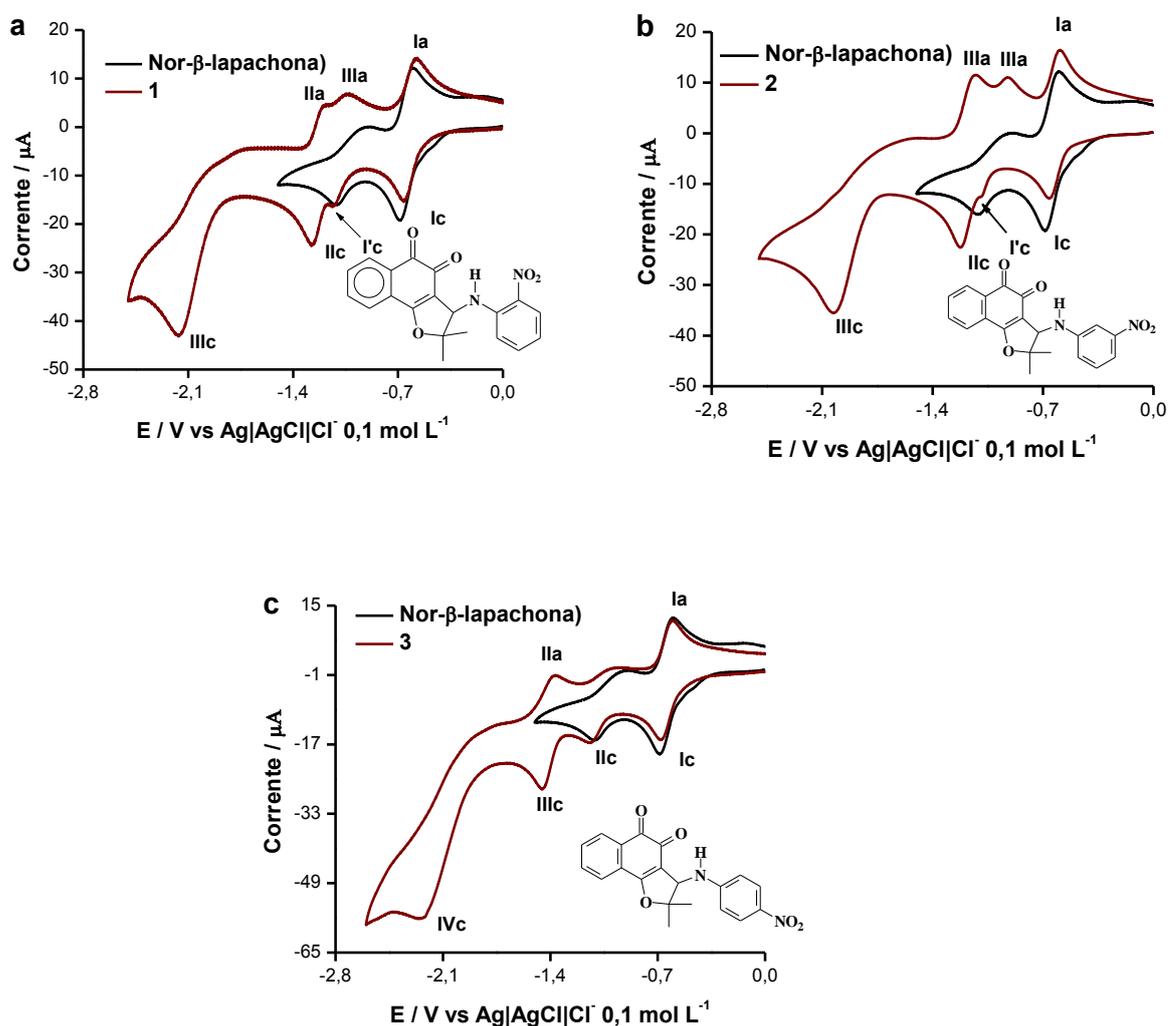
Diante da dificuldade de caracterização dos potenciais de pico posteriores à formação da semiquinona, estudos espectroeletroquímicos foram realizados buscando-se informações adicionais que pudessem caracterizar o mecanismo de redução das nitroquinonas. Os perfis voltamétricos de **1**, **2** e **3**, em eletrodo de carbono vítreo, para efeito de comparação, são rerepresentados na Figura 49a-c. Esses voltamogramas sugerem que a função quinona é reduzida anteriormente ao grupo nitro, porém a segunda onda de redução não é tão nitidamente observada em todos os derivados. Para o composto **3**, seu perfil voltamétrico sugere que a quinona é reduzida antes do nitro, Figura 49c, conforme semelhança entre o voltamograma deste com seu precursor *nor*- β -lapachona. Contudo, vale ressaltar que nos respectivos estudos em eletrodo de mercúrio, em **1** e **2**, a segunda onda de redução se relaciona à redução tanto do grupo nitro quanto da semiquinona, como já mencionado. Nestes estudos, apenas **3** manteve o perfil em eletrodo de carbono vítreo, caracterizado por quatro ondas de redução bem definidas.

Assim, dúvidas quanto ao mecanismo de redução das nitroquinonas, principalmente após a primeira etapa de redução, persistem. O primeiro pico se refere apenas à geração do intermediário radicalar semiquinona ($[Q^{\bullet-}]$ -PhNO₂). Considerando o nitroderivado **3**, o segundo processo de redução estaria realmente relacionado ao diânion a partir do grupo quinonóide ou seria relativo ao radical resultante da redução do nitro ($[Q^{\bullet-}]$ -PhNO₂^{•-}), conforme trabalhos já registrados?

Nesse sentido, no intuito de esclarecer o mecanismo de redução das nitroquinonas, estudos espectroeletroquímicos, empregando-se Ressonância do Spin do Elétron acoplado à voltametria cíclica, foram realizados para verificar a natureza dos radicais eletrogerados. Estes mesmos estudos (Hernández *et al.*, 2008) já foram

realizados com o composto **2** (*meta*-nitroquinona), onde foi verificado um comportamento eletroquímico caracterizado por três ondas de redução, sendo as duas primeiras ondas catódicas de natureza quasi-reversível, a primeira referente à formação do ânion radical semiquinona e a segunda, relativa á formação do ânion radical nitro, gerando um diânion diradical (Hernández *et al.*, 2008).

Figura 49. Voltamogramas cíclicos comparativos da *nor*- β -lapachona e seus derivados nitrados **1**, **2** e **3** ($C = 1 \text{ mmol L}^{-1}$) em DMF/TBABF₄ (0,1 mol L⁻¹). Eletrodo de carbono vítreo, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.



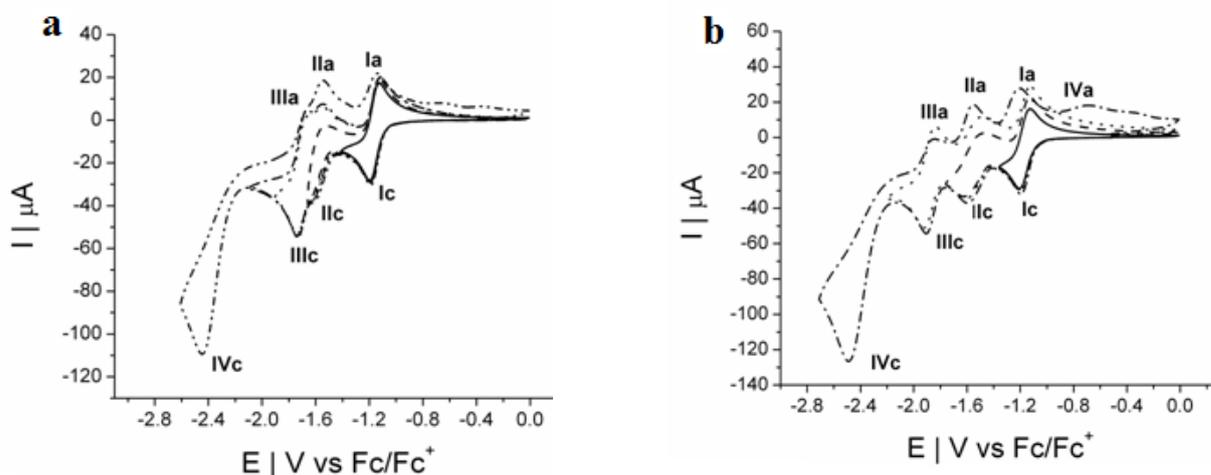
Fonte: Autor, 2011.

Desta forma, mesmo que alguns estudos (reatividade com oxigênio e DNA) tenham sido realizados para o composto **2**, em continuidade ao trabalho do grupo (De Moura, 2008), estudos em espectroeletroquímica deste não foram mais

realizados, uma vez já terem sido conduzidos, para caracterização do seu mecanismo de redução. Portanto, aqui será descrito o estudo por espectroeletrólise para caracterização das espécies de redução relacionadas aos derivados **1** e **3**.

Para os estudos em espectroeletrólise (México), foram realizados estudos prévios por voltametria cíclica em acetonitrila/TBABF₆. A Figura 50a-b apresenta os perfis voltamétricos obtidos para os compostos **1** e **3**, respectivamente. A partir destes voltamogramas, é possível observar similaridades com os perfis voltamétricos obtidos em DMF/TBABF₄, Figuras 49a e c. Em **1**, as mesmas três ondas de redução bem definidas se apresentam, Figura 50a, além do ombro intermediário entre o primeiro e o segundo processo redox. Para **3**, Figura 50b, as quatro ondas de redução bem definidas presentes em DMF se confirmam.

Figura 50. Voltamogramas cíclicos de **1** (a) e **3** (b), $c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$, em CH₃CN/TBABF₆ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), eletrodo de carbono vítreo. Voltamogramas obtidos em vários E_{λ} (potenciais de inversão), $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2011.

Os potenciais de pico catódico e anódico referentes aos estudos com as nitroquinonas **1** e **3** em acetonitrila são representados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores de potencial para os compostos **1** e **3**, em eletrodo de carbono vítreo, E_p vs. vs Fc/Fc⁺.

Composto	-E _{plc} (V)	-E _{pla} (V)	-E _{pllc} (V)	-E _{plla} (V)	-E _{plllc} (V)	-E _{pllla} (V)	-E _{plvc} (V)
1	1,200	1,120	1,610	1,520	1,730	1,670	2,450
3	1,200	1,120	1,600	1,840	1,900	1,550	2,500

Fonte: Autor, 2011.

Nos estudos em acetonitrila, Figura 50a-b, é observada relação entre as ondas I_c e I_a das nitroquinonas, situadas em mesmo valor de potencial, em um processo quase-reversível ($\Delta E = 80$ mV). Características de reversibilidade também são observadas para os pares I_{lc}/I_{la}, I_{llc}/I_{lla}. Contudo, a onda I_{la} não é tão definida quanto as outras. As intensidades nas correntes de pico referentes a I_{la} e I_{lla} aumentam após aplicação de potencial de inversão superior a I_{vc}, que provavelmente se refere à geração da hidroxilamina, oxidada em I_{va}.

A nitroquinona **3**, como mencionado nos estudos anteriores, apresentou o perfil voltamétrico mais definido. Neste caso, a relação entre as ondas I_{llc} e I_{lla} apresenta uma diferença entre os potenciais de pico anódico e catódico ($\Delta E = 60$ mV), igual ao valor teórico para uma transferência reversível de um elétron. Após a redução em I_{llc}, a corrente de pico de I_{la} se acentua, sugerindo relação desta com I_{llc}. Uma quarta onda de oxidação (I_{va}) aparece após varredura de potencial mais negativo que I_{vc}, sendo então relacionada à I_{vc}, referente provavelmente à oxidação da hidroxilamina gerada ao derivado nitroso.

De acordo com estudo prévio realizado para o composto **2** (Hernández *et al.*, 2008), que evidenciou a geração de um diânion biradical [Q^{•-}]-PhNO₂^{•-}] e, considerando as características de reversibilidade dos três primeiros processos redox de **1** e **3**, um intermediário de mesma natureza pode estar relacionado à redução destes nitroderivados. Uma vez caracterizada a presença de reação química de desproporcionamento para estes compostos e, diante das características de reversibilidade do segundo processo de redução, Figura 50, este perfil pode ser consequência tanto da maior estabilidade do diânion quinônico em acetonitrila, quanto da redução da quinona regenerada na reação química mencionada (Figura 47).

O composto **1** ($C = 1 \text{ mmol L}^{-1}$) foi reduzido em potencial constante entre os picos Ic e IIc ($E_{\text{ap.}} = -1,30 \text{ V vs Fc}^+/\text{Fc}$) e um espectro de EPR *in situ* foi obtido, Figura 50. Este espectro é caracterizado por seis diferentes valores de HFCC (Constante de Acoplamento Hiperfina), os quais são relacionados à interação entre o spin nuclear dos átomos de H com o elétron desemparelhado do ânion radical eletrogerado. Considerando a multiplicidade de sinais correspondentes a essas interações, constantes de acoplamento hiperfino (HFCC) e a literatura (De Abreu *et al.*, 1999) relacionada à redução de nitroquinona em meio aprótico, a estrutura radicalar observada refere-se à geração da semiquinona a partir da redução da função o-quinona, Figura 51, um comportamento similar ao estudo anterior realizado com o composto **2** (Hernández *et al.*, 2008). A estrutura numerada para as três nitroquinonas é representada na Figura 52 para melhor visualização das possíveis interações entre o spin do elétron do radical e spin nuclear dos átomos de hidrogênio do sistema aromático. Nesse sentido, o primeiro processo de redução pode ser representado como se segue:



Figura 51. Espectro de EPR para a espécie eletrogerada a partir do composto **1** ($C = 1 \text{ mmol L}^{-1}$), $\text{CH}_3\text{CN}/\text{TBABF}_6$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), em banda de raio X (9,85 GHz), após eletrólise em potencial constante ($E_{\text{ap.}} = -1,30 \text{ V vs Fc}^+/\text{Fc}$) e estrutura do radical semiquinona gerado. Espectro experimental (●). Espectro teórico simulado (●).

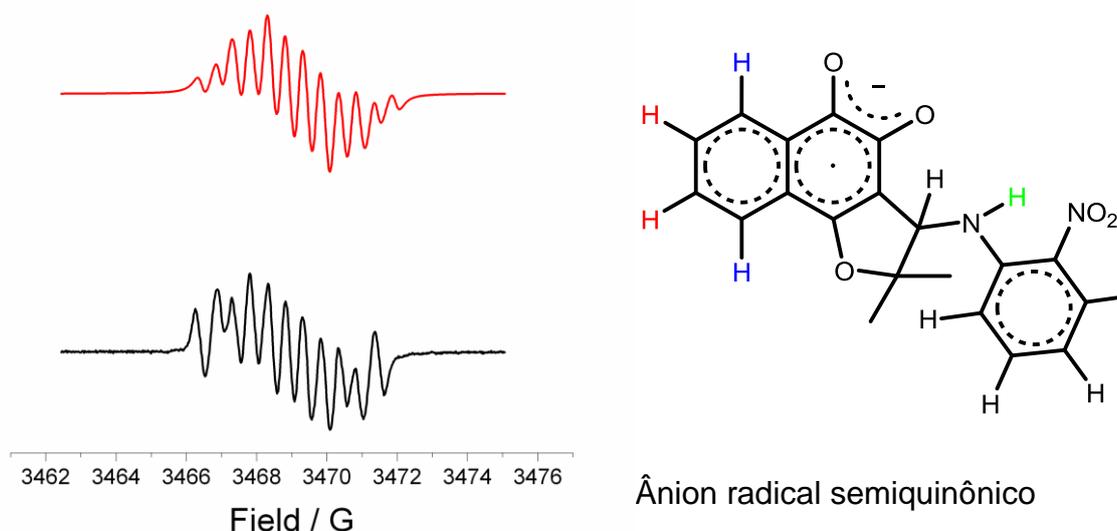
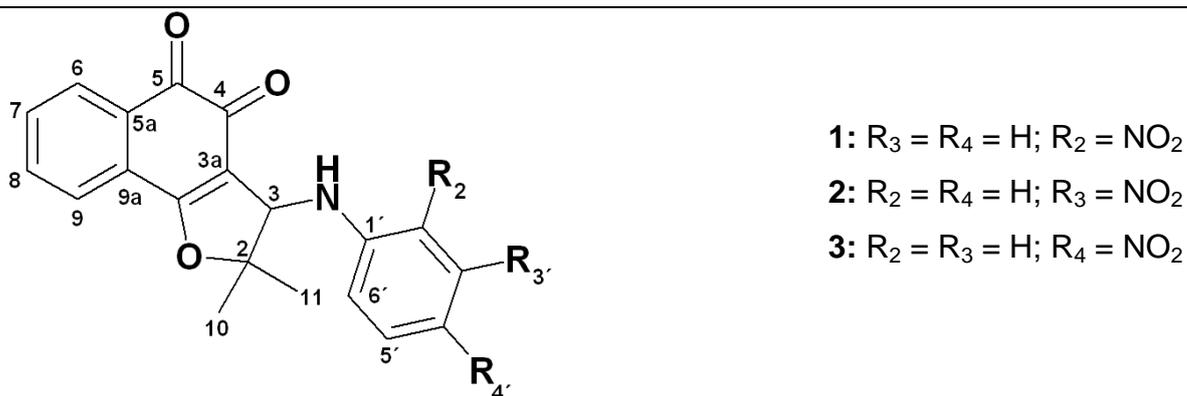
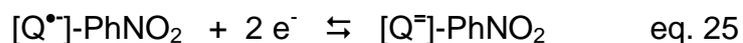


Figura 52. Estrutura numerada dos nitroderivados da *nor*- β -lapachona (**1**, **2** e **3**).



Fonte: Autor, 2011.

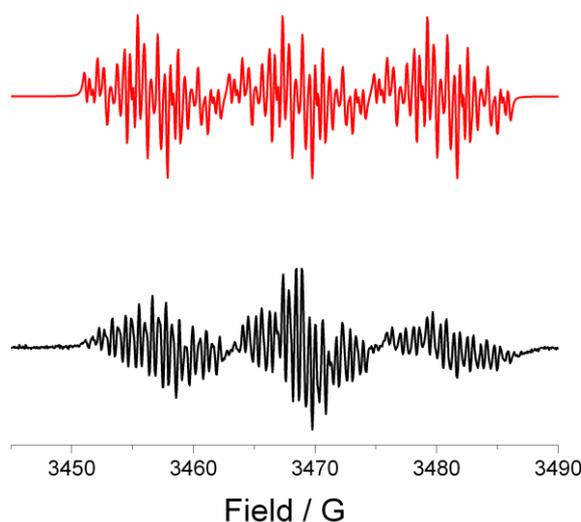
Como discutido nos estudos anteriores, a caracterização do segundo processo de redução (IIc) se mostrou complexa em virtude da presença de dois grupos eletroativos, quinona e nitroaromático, que, em meio aprótico, são reduzidos em duas etapas, uma destas com características de reversibilidade. Assim, uma vez confirmado que o primeiro processo de redução está relacionado à geração do intermediário semiquinônico, é esperada a geração do segundo ânion radical em potencial mais negativo. Neste caso, a maior característica de reversibilidade foi observada para o par IIIc/IIIa, sendo este possivelmente relacionado ao intermediário mencionado, enquanto o par IIc/IIa, com característica de reversibilidade, pode se referir tanto à formação do diânion a partir da semiquinona, equação 25, ou de um intermediário diânion biradicalar, equação 27, conforme registrado na literatura (Hernández et al., 2008).



Análises por espectroeletróquímica foram realizadas, sendo agora aplicado um valor de potencial mais negativo, entre os picos IIIc e IVc ($E_{ap.} = -1,80 \text{ V vs. Fc}^+/\text{Fc}$). De posse do espectro referente a esta análise, Figura 53 (preto), uma segunda estrutura radicalar foi detectada. O espectro apresentou um tripleto de sinais correspondente aos valores de HFCC, em concordância com espectro teórico simulado, Figura 53 (vermelho), resultante da interação de um elétron desemparelhado com o átomo de hidrogênio do anel aromático ligado ao grupo nitro

(C-3', C-4', C-5', e C-6') e o sinal intenso de HFCC a partir da interação do elétron desemparelhado com o átomo de N da função nitroaromático, indicando que a estrutura secundária está associada à formação de um ânion radical a partir da função -NO₂ na posição C-2'. Desta forma, é observado que o processo Ic está relacionado ao ânion radical semiquinônico, enquanto que IIIc refere-se à geração do ânion radical nitro.

Figura 53. Espectro de EPR para espécies eletrogeradas a partir do composto **1** ($c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$), CH₃CN/TBABF₆ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), em banda de raio X (9,85 GHz), após eletrólise em potencial constante ($E_{\text{ap.}} = -1,80 \text{ V vs Fc}^+/\text{Fc}$). Espectro teórico simulado (●). Espectro experimental (●).

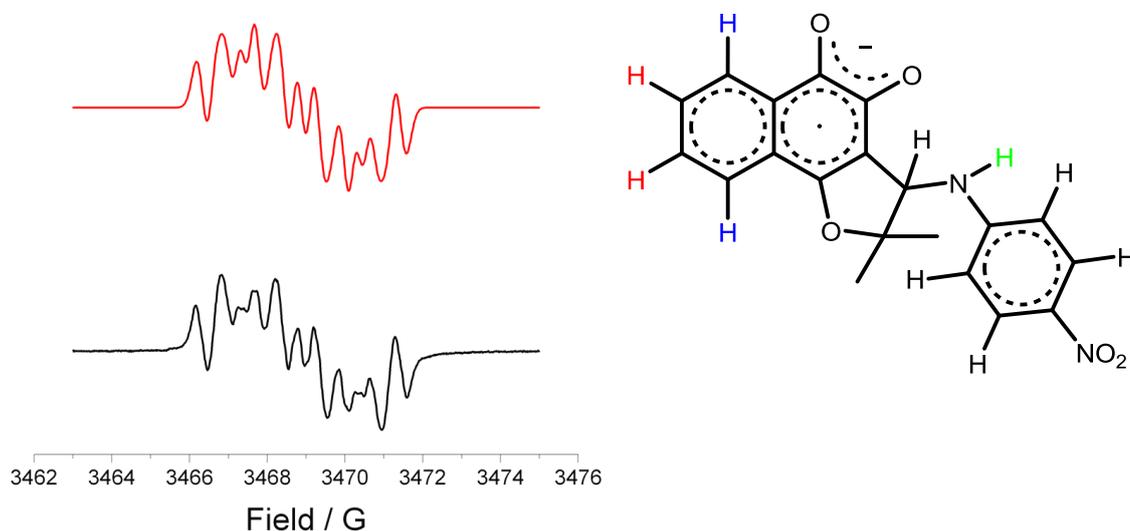


Fonte: Autor, 2011.

Estudos para definir a natureza do segundo processo de redução ainda se encontram em realização. Contudo, diante do mecanismo de desproporcionamento caracterizado nos estudos em eletrodo de mercúrio, este pode estar relacionado à redução completa da semiquinona (Figura 47).

Os estudos por espectroeletróquímica do composto **3** também confirmaram a geração de espécies radicalares no processo de redução deste derivado. A partir do espectro experimental de **3**, Figura 54 (vermelho), em concordância com o espectro teórico simulado, Figura 54 (preto), observa-se a multiplicidade de sinais relativos aos seis acoplamentos hiperfinos do elétron desemparelhado no radical semiquinônico, equação 23, com os spins nucleares dos átomos de hidrogênio do sistema aromático.

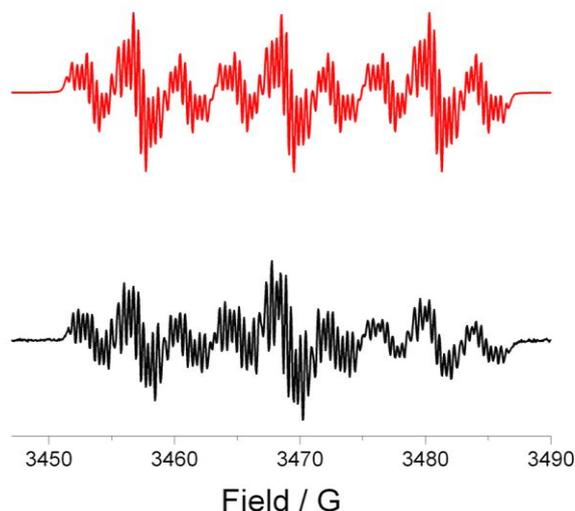
Figura 54. Espectro de EPR para espécies eletrogeradas a partir do composto **3** ($c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$), $\text{CH}_3\text{CN/TBABF}_6$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), em banda de raio X (9,85 GHz), após eletrólise em potencial constante ($E_{\text{ap.}} = -1,30 \text{ V vs Fc}^+/\text{Fc}$) e estrutura do radical semiquinona. Espectro experimental (●). Espectro teórico simulado (●).



Fonte: Autor, 2011.

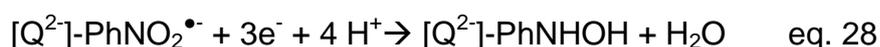
No mesmo estudo realizado com aplicação de um potencial mais negativo ($E_{\text{ap}} = -1,80 \text{ V}$), entre os picos IIIc e IVc, um espectro de ressonância mais complexo para **3**, com sinais de acoplamento hiperfinos sobrepostos, foi obtido, Figura 55 (preto). Contudo este espectro está de acordo com o espectro teórico simulado, Figura 55 (vermelho), para o ânion radical gerado a partir do grupo nitro. Assim, pode-se concluir que a redução de **3** envolve a geração do ânion radical semiquinônico no primeiro processo de redução eletroquímica, enquanto que o ânion radical nitro é formado no processo IIIc. Quanto à natureza do segundo processo de redução (IIc), este deve estar relacionado à redução da quinona regenerada por desproporcionamento como sugerido para o composto **1**, aliada à redução da semiquinona, uma vez que sinais de EPR são obtidos.

Figura 55. Espectro de EPR para espécies eletrogeradas a partir do composto **3** ($c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$), $\text{CH}_3\text{CN/TBABF}_6$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), em banda de raio X (9,85 GHz), após eletrólise em potencial constante ($E_{\text{ap.}} = -1,80 \text{ V vs Fc}^+/\text{Fc}$). Espectro teórico simulado (●). Espectro experimental (●).



Fonte: Autor, 2011.

Desta forma, os estudos por espectroeletróquímica permitiram confirmar a geração dos ânions radicais semiquinona e nitro nos processos Ic e IIIc, respectivamente. Quanto ao processo de redução IIc, situado em potencial similar ao observado para a redução da semiquinona no precursor *nor*- β -lapachona (Figura 49), este pode estar relacionado à etapa final de redução da quinona, processo que envolve adição de mais um elétron ao ânion radical semiquinona. Por outro lado, este processo também pode ser relativo à redução de um elétron do grupo quinona, regenerada em reação de desproporcionamento, como caracterizada para estes compostos. Em relação ao processo IVc, relaciona-se a etapa final de redução do grupo nitroanilina ao composto hidroxilamina como representado na equação 28.



4.3 Racionalização dos Resultados em Meio Aprótico

Os estudos eletroquímicos referentes à redução da *nor*- β -lapachona nitroderivados, realizados em diferentes meios em eletrodo de carbono vítreo e eletrodo de mercúrio, evidenciaram um comportamento redox similar e, confirmaram um perfil voltamétrico distinto para a redução da nitroquinona **3**. Como já discutido, este derivado apresentou duas ondas de redução bem definidas com características de reversibilidade, e uma onda intermediária entre estas caracterizando um sistema quasi-reversível. Para facilitar as considerações que se seguem, os potenciais de redução nos estudos das nitroquinonas, tanto em eletrodo de mercúrio (**Hg**) quanto carbono vítreo (**ECV**), são representados na Tabela 7.

Em analogia ao comportamento eletroquímico observado para o precursor *nor*- β -lapachona, em eletrodo de carbono vítreo, as duas primeiras ondas de redução (E_{p1c} e E_{p1lc}) das nitroquinonas são situadas em potenciais de redução similares aos observados para a *nor*- β -lapachona, sendo assim relacionadas à redução do grupo quinona, enquanto que o terceiro processo (E_{p3lc}) deve referir-se à redução do grupo nitro ao respectivo ânion radical. Contudo, ressalta-se que apenas para **3** (QPh-*p*-NO₂), houve separação nítida dos três processos (E_{p1c} , E_{p1lc} e E_{p3lc}), sendo a segunda onda com características de processo quasi-reversível, ao passo que para os derivados **1** (QPh-*o*-NO₂) e **2** (QPh-*m*-NO₂), o segundo pico de redução (E_{p1lc}) se apresentou como um ombro catódico entre o primeiro e segundo processo, respectivamente.

Tabela 7. Valores potenciais de pico catódico para a *nor*- β -lapachona e nitroquinonas em eletrodos de carbono vítreo (**ECV**) e mercúrio (**Hg**).

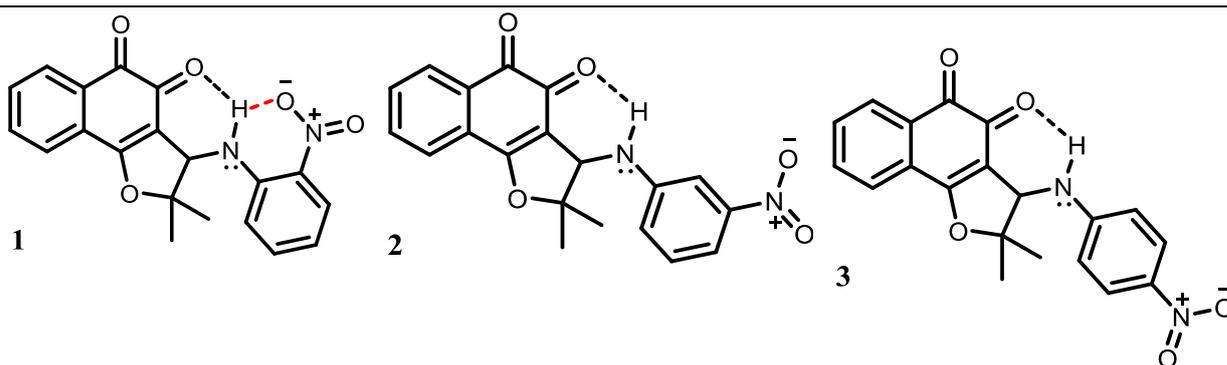
Composto	E_{p1c} (V) em	E_{p1lc} (V) em	E_{p3lc} (V) em	E_{p1c} (V)	E_{p1lc} (V)	E_{p3lc} (V)
	ECV	ECV	ECV	em Hg	em Hg	em Hg
<i>Nor</i> - β -lapachona	-0,687	-1,110	----	-0,590	-1,260	----
1 (QPh- <i>o</i> -NO ₂)	-0,655	-1,132	-1,279	-0,540	-1,170	----
2 (QPh- <i>m</i> -NO ₂)	-0,659	-1,088	-1,279	-0,570	-1,120	----
3 (QPh- <i>p</i> -NO ₂)	-0,676	-1,148	-1,450	-0,560	-1,040	-1,310

Fonte: Autor, 2011.

Quanto aos estudos em eletrodo de mercúrio, como já discutido, o comportamento eletroquímico de **3** (QPh-*p*-NO₂) é caracterizado por três ondas de

redução, destoando mais uma vez do comportamento observado para **1** (QPh-*o*-NO₂) e **2** (QPh-*m*-NO₂), que apresentaram duas ondas de redução da faixa de potencial estudado, Tabela 7. Assim, argumenta-se que razões para um comportamento eletroquímico tão distinto em **3**. Uma análise da estrutura das moléculas permite observar a possibilidade de formação de ligações de hidrogênio intramoleculares, Figura 56, para os três compostos. Porém, a nitroquinona **1** (QPh-*o*-NO₂), em decorrência da posição do grupo nitro em C-2', apresenta a possibilidade de estabelecimento de ligação de hidrogênio intramolecular com o hidrogênio do grupo amina vizinho tanto a quinona, quanto ao nitro. A presença de ligação de hidrogênio intramolecular influencia os potenciais de redução, principalmente para o processo de redução do grupo nitro.

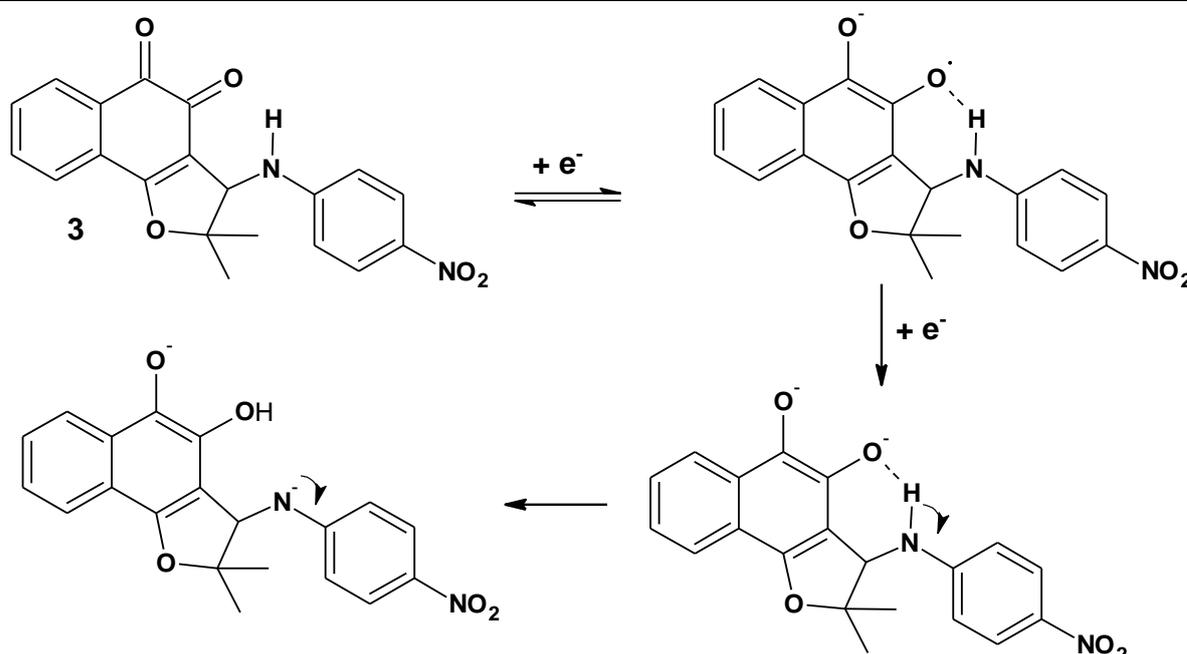
Figura 56. Possibilidade de ligação de hidrogênio intramolecular com o próton amino das nitroquinonas.



Fonte: Autor, 2011.

O comportamento eletroquímico diferenciado de **3** (QPh-*p*-NO₂) em relação a **1** (QPh-*o*-NO₂) e **2** (QPh-*m*-NO₂) pode ser uma consequência direta da acidez do próton amino. De acordo com dados da literatura (Bordwell *et al.*, 1977), em solvente aprótico, meio DMSO, a nitroanilina com grupo nitro em posição *p*-, apresenta *p*K_a 20,9. Assim, considerando a nitroanilina **3** (QPh-*p*-NO₂), um valor de *p*K_a similar é esperado, uma vez da ausência de conjugação do sistema nitrofenilamina com a quinona, sendo a acidez do próton amino pronunciadamente influenciado pela ligação de hidrogênio intramolecular em **3**, Figura 56. A partir destas considerações um provável mecanismo de redução da função quinona de **3** seguido por um mecanismo de auto-protonação é proposto na Figura 57.

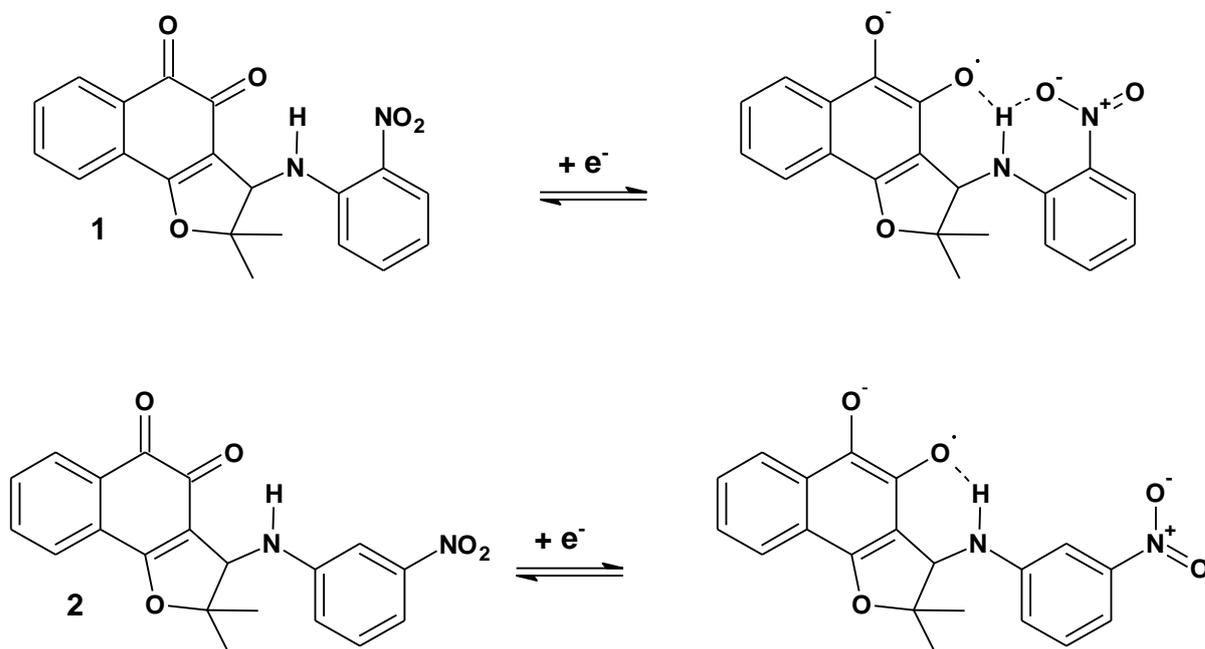
Figura 57. Provável de mecanismo de redução da função quinona de **3** (QPh-*p*-NO₂) seguida por mecanismo de auto-protonação em meio aprótico.



Fonte: Autor, 2011.

Como pode ser observado na Figura 57, após a adição de dois elétrons a função quinona, aliado ao efeito do substituinte em *p*- que acentua o caráter ácido do próton amino, o diânion quinônico resultante abstrai o próton amino, que leva a formação de uma espécie com carga negativa centrada no nitrogênio, diminuindo então o caráter eletrofílico do grupo nitro. Este efeito exerce influência direta sobre o potencial de redução do grupo nitro eletroatraente em **3**, promovendo um deslocamento de potencial para valores mais negativos (200 mV). Quanto aos derivados **1** (QPh-*o*-NO₂) e **2** (QPh-*m*-NO₂), a mesma tendência de perda de próton após redução da quinona gerando uma carga negativa no nitrogênio não é observada, Figura 58. Em **1**, tal consideração é justificada por efeitos estéricos que promovem uma disputa por estabelecimento de ligação de hidrogênio com o próton amino tanto por parte da quinona quanto do grupo nitro. No tocante a **2**, os efeito indutivo da presença do grupo nitro em *m*- não é capaz de acentuar a acidez do próton, permitindo ao mesmo permanecer em ligação de hidrogênio intramolecular com o diânion quinônico.

Figura 58. Provável de mecanismo de redução da função quinona de **1** (QPh-*o*-NO₂) e **2** (QPh-*o*-NO₂) em meio aprótico.



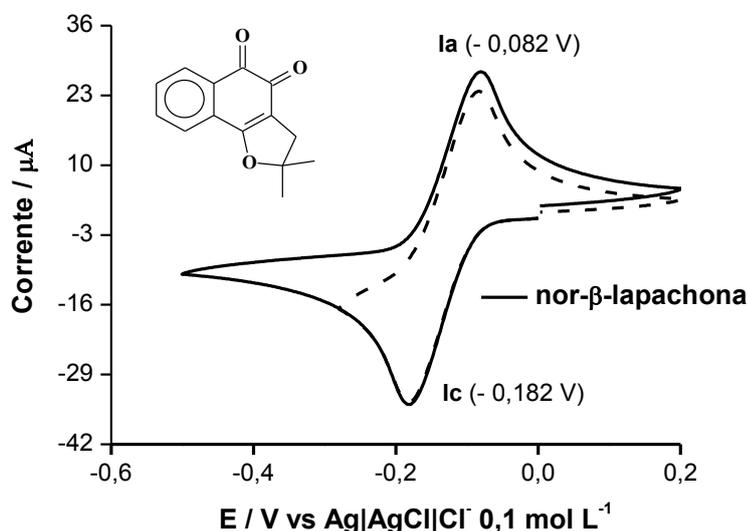
Fonte: Autor, 2011.

Nesse sentido, as considerações acima justificam a maior facilidade de redução do grupo nitro em **1** e **2**, um processo que ocorre com um deslocamento anódico de potencial de 200 mV.

4.4 Estudos em Meio Prótico

Para os estudos em meio prótico foi escolhido o tampão acetato, pH 4,5, em virtude da posterior realização das análises em biossensor eletroquímico de DNA. 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 nitroquinonas. Já a *nor*- β -lapachona não apresentou as mesmas dificuldades de solubilização, sendo possível o estudo em concentração 10x maior que para as nitroquinonas. O perfil voltamétrico para a *nor*- β -lapachona em meio aquoso-etanólico é representado na Figura 59. Um par redox I_c/I_a é observado, característico de processo quasi-reversível ($\Delta E = 50$ mV), envolvendo o consumo de $2e^-/2H^+$ referente à formação da hidroquinona (De Abreu *et al.*, 2005).

Figura 59. Voltamograma Cíclico da *nor*- β -lapachona ($c = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$) em meio aquoso etanólico (30%), tampão acetato pH 4,5. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

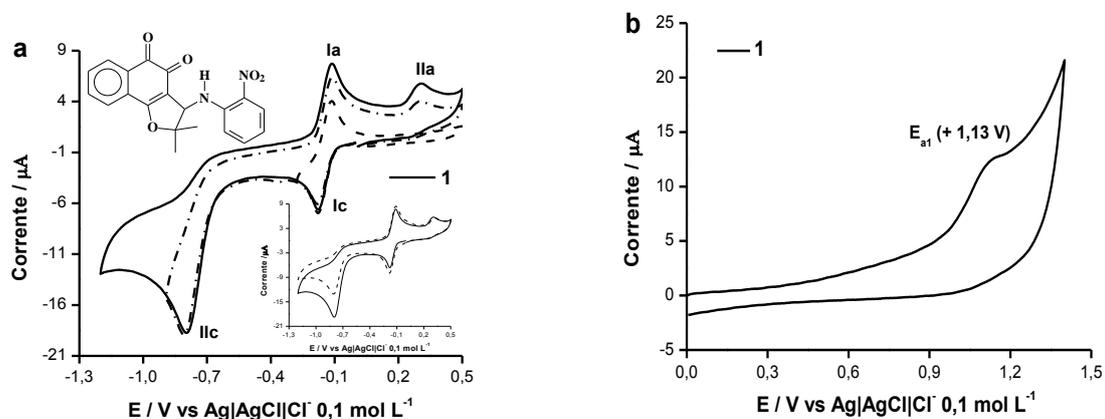


Fonte: Autor, 2011.

Os estudos relacionados às nitroquinonas são representados nas Figuras 60-62, que apresentam um perfil eletroquímico caracterizado por duas ondas de redução e duas ondas de oxidação correlatas na varredura reversa de potencial. No meio em questão, quinonas e nitroaromáticos, são reduzidos em duas etapas consecutivas. O processo de redução das quinonas se dá pelo consumo de $2e^-/2H^+$, com característica de reversibilidade (De Abreu *et al.*, 2005), enquanto que a etapa referente ao grupo nitroaromático envolve o consumo de $4e^-/4H^+$, um processo irreversível (Goulart *et al.*, 2007). Diante desta consideração, o comportamento eletroquímico dos compostos mencionados é típico das funções eletroativas presentes em suas moléculas.

Nos estudos por voltametria cíclica, o composto **1** apresentou duas ondas de redução bem definidas nos estudos por voltametria cíclica, Figura 60a. A primeira onda de redução e sua correspondente onda anódica caracterizam o processo como reversível ($\Delta E = 31 \text{ mV}$), como esperado em uma redução bieletrônica, sendo esta relacionada à redução da quinona, como já mencionado.

Figura 60. Voltamogramas Cíclicos de **1** ($c = 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) em meio aquoso etanólico (30%) no sentido da redução (a) e oxidação (b), tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), pH 4,5. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

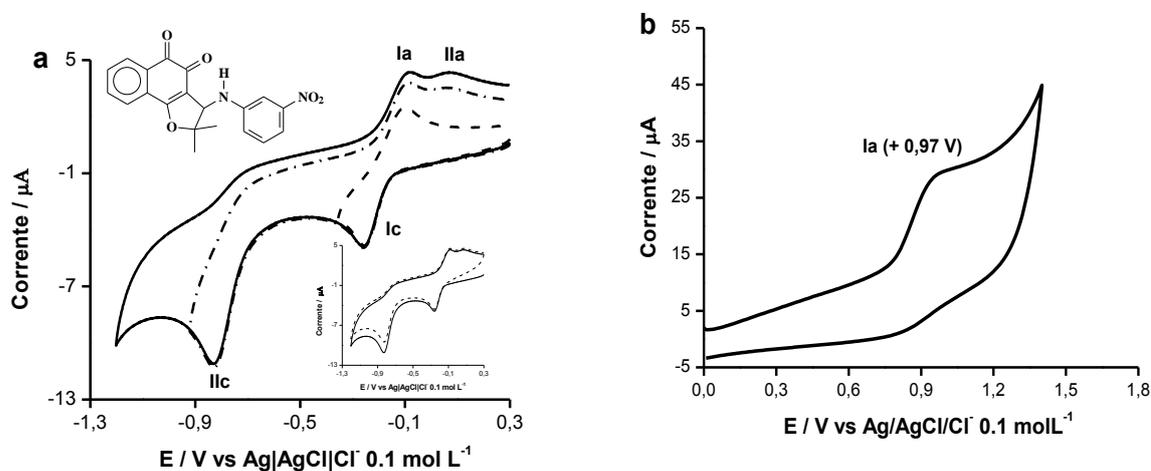


Fonte: Autor, 2011.

A segunda onda de redução (IIc) é observada em potencial mais negativo (-0,809 V), cuja intensidade de corrente de pico é o dobro da primeira (Ic), evidenciado que o número de elétrons envolvido neste processo também é o dobro do anterior. Assim, a onda IIc está relacionada à redução do grupo nitro à hidroxilamina, que é oxidada no ciclo reverso (IIa), gerando o derivado nitroso. Nos estudos em varredura de potencial anódico, uma onda de oxidação ($E_{a1} = +1,13 \text{ V}$), Figura 60b, é observada, sendo esta relativa à oxidação do grupo amina aromático presente na molécula, conforme registrado na oxidação de 4-nitroanilina em meio aprótico (Oztekin *et al.*, 2010). A varredura em dois ciclos sucessivos é inserida na Figura 60a, mostrando a ausência de onda de redução referente a IIa, relativa ao processo quase-reversível hidroxilamina/nitroso, comum no processo de redução eletroquímica de nitroaromáticos (De Abreu *et al.*, 1999; Goulart *et al.*; 2007).

Um comportamento eletroquímico muito similar foi apresentado pelo composto **2**, Figura 61a. O par redox Ic/Ia apresentou menor característica de reversibilidade ($\Delta E = 79 \text{ mV}$), enquanto que a segunda onda de oxidação (IIa) aparece quando o potencial aplicado é superior a IIc. Neste composto, o processo de oxidação do grupo amino ocorreu com maior facilidade, situando-se em valor menos anódico, Figura 61b. A varredura em dois ciclos sucessivos, inserida na Figura 61a, também evidenciou a ausência de onda de redução referente à IIa.

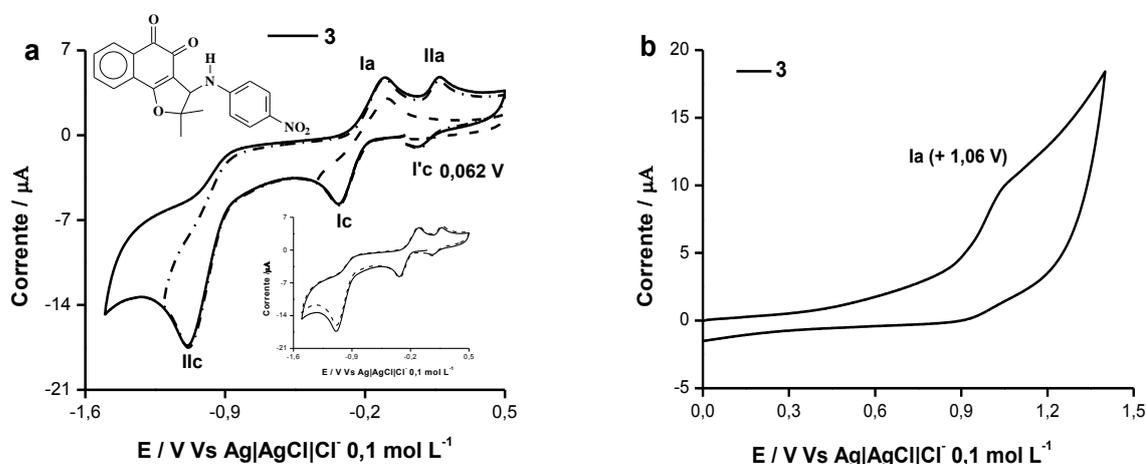
Figura 61. a: Voltamogramas Cíclicos de **2** ($c = 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) em meio aquoso etanólico (30%), tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), pH 4,5. **b:** Voltamogramas Cíclicos de **2** ($c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$) em meio aquoso etanólico (30%), tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), pH 4,5. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2011.

A mesma tendência foi observada nos estudos eletroquímicos de **3**, tanto na redução, Figura 62a, quanto no processo referente à oxidação da amina, Figura 62b. Em relação aos dois outros compostos, o par Ic/Ia ($\Delta E = 123 \text{ mV}$) apresentou menor característica de reversibilidade. Para este derivado, a hidroxilamina formada em IIc, oxidada em IIa ao nitroso, é regenerada em segunda varredura de redução, conforme presença do par IIa/I'c, característica esta não apresentada pelas duas outras nitroquinonas, curva inserida da Figura 62a. Os potenciais de pico catódico e anódico referentes a estes compostos em meio prótico, para varreduras catódica e anódica, são sumarizados na Tabela 8. A partir destes resultados, constata-se a maior facilidade de redução de **1**, derivado cujo grupo nitro está localizado em posição *o*-, seguida pelo compostos *m*-substituído, enquanto o composto *p*-apresentou menor facilidade de redução.

Figura 62. Voltamogramas Cíclicos de **3** ($C = 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) em meio aquoso etanólico (30 %), no sentido da redução (a) e oxidação (b), tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), pH 4,5. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2011.

Tabela 8. Potencias de pico para as nitroquinonas em meio aquoso/etanólico, eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Composto	$-E_{\text{pIC}} \text{ (V)}$	$-E_{\text{pIIC}} \text{ (V)}$	$-E_{\text{pIa}} \text{ (V)}$	$+E_{\text{pIIa}} \text{ (V)}$	$+E_{\text{pa1}} \text{ (V)}$
Nor- β -lapachona	0,182	---	0,082	---	
1 (QPh-<i>o</i>-NO₂)	0,173	0,809	112	0,303	1,130
2 (QPh-<i>m</i>-NO₂)	0,256	0,826	98	0,072	0,970
3 (QPh-<i>p</i>-NO₂)	0,336	1,080	89	0,172	1,060

Fonte: Autor, 2011.

Diante dos valores de potencial de pico catódico e anódico apresentados na Tabela 8, é possível perceber o efeito direto da posição do grupo nitro na arilamina. Os resultados demonstram que o processo de redução do derivado **1** (QPh-*o*-NO₂) requer menos energia em relação às nitroquinonas **2** (QPh-*m*-NO₂) e **3** (QPh-*p*-NO₂). Neste derivado, além dos efeitos mesomérico e indutivo do grupo nitro, observam-se também efeitos estéricos, como já discutido. Somente nesse caso, os resultados seguem ao esperado para o grupo nitro em *o*-, pois o potencial de redução é mais

alto do que na quinona precursora. Nos outros casos, a redução ocorre em potenciais mais negativos que *nor*- β -lapachona.

Nesse sentido, a possibilidade de estabelecer ligações de hidrogênio em **1**, tanto com o grupo quinona quanto com o grupo nitro (Figura 56, pg. 116), provavelmente é mais favorável por efeitos de volume, tendo como consequência maior comprometimento do par de elétrons do grupo amino com o anel aromático e, aumento da eletrofilia do grupo quinonóide por efeitos indutivos. Embora esta consideração seja feita para um meio ácido (pH 4,5), nessa situação, a amina não se encontra protonada devido à pequena basicidade de nitroanilinas, em analogia aos pK_a s das formas protonadas de nitroanilinas (*o*-nitroanilina: $pK_a = -0,20$; *m*-nitroanilina: $pK_a = 2,47$; *p*-nitroanilina: $pK_a = 1,11$) (Constatino, 2005; March, 2007). Desta forma, é esperada maior acidez para **1**, justificando a facilidade de redução observada: $\text{QPh-}o\text{-NO}_2 > \text{QPh-}m\text{-NO}_2 > \text{QPh-}p\text{-NO}_2$.

Para os compostos **2** e **3** (*para*- NO_2), observa-se a possibilidade de formação do mesmo anel de seis membros ao grupo quinona por ligação de hidrogênio, mas efeito ressonante adicional é apresentado por **3**. Contudo, este efeito não foi suficiente para o abaixamento da energia relativa à redução do grupo quinona em **3**. Assim, o efeito indutivo do grupo nitro em posição *meta* para o composto **2** provavelmente justifica sua maior facilidade de redução em relação **3**, que apresentam maior efeito de campo. Quanto ao potencial de oxidação (E_{pa1}) para estes dois compostos, **2** apresentou maior facilidade de oxidação em relação **3**, Tabela 8, confirmando sua maior basicidade consequente do menor comprometimento dos elétrons do grupo amino com o sistema aromático.

4.5 Estudos em Presença de Oxigênio

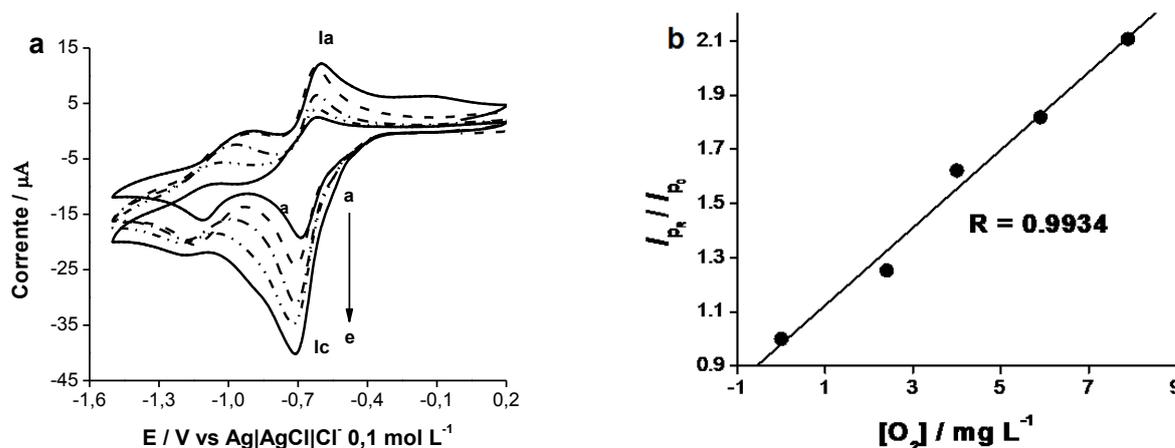
Como já mencionado, quinonas e nitroaromáticos possuem a habilidade de gerar estresse oxidativo, resultante de ciclagem redox com oxigênio, após transferência de elétrons por sistema enzimático (TE-EO), sendo este um dos mecanismos responsáveis por suas atividades biológicas. Assim, a redução em presença de oxigênio induz a uma cascata de reações que geram espécies deletérias, sendo este mecanismo, por exemplo, aceito para atividade

tripanossomicida de quinonas e nitroaromáticos (Silva *et al.*, 2003). Nesse sentido, estudos foram realizados para avaliar a reatividade das nitroquinonas após transferência heterogênea de elétrons com oxigênio.

Estudo realizado com a β -lapachona (De Abreu *et al.*, 2007), demonstrou a reatividade das espécies eletrogeradas com oxigênio, comprovada pela onda catalítica observada em estudos por voltametria cíclica, em meio aquoso, pH 7,0. Assim, como detentora do grupo quinonóide, um mecanismo similar para a *nor*- β -lapachona pode ser observado. Quanto aos derivados nitroquinonas, o experimento nos indicará similaridade ou não.

Devido à estabilidade dos ânions radicais gerados no processo de redução de quinonas, os estudos foram realizados em solvente não aquoso, meio aprótico, que constitui o melhor modelo para o ambiente da membrana celular, onde ocorre o processo de peroxidação lipídica. Primeiramente, foi investigada a reatividade das espécies eletrogeradas no processo de redução da *nor*- β -lapachona com oxigênio. Como observado na Figura 63a, o perfil eletroquímico apresentado em ausência de oxigênio é pronunciadamente alterado quando da adição de oxigênio à cela eletroquímica. Neste meio, a redução do oxigênio ao ânion radical superóxido ocorre em potencial de -0,894 V.

Figura 63. a: Voltamograma Cíclico da *nor*- β -lapachona em DMF/TBABF₄ (0,1 mol L⁻¹), eletrodo de carbono vítreo, em presença de diferentes concentrações de oxigênio: (a) 0, (b) 0,075, (c) 0,125, (d) 0,84, (e) 0,246, $\beta = 100$ mV s⁻¹. **b:** Curva de I_{p1c} / I_{p1a} em função da concentração de oxigênio.



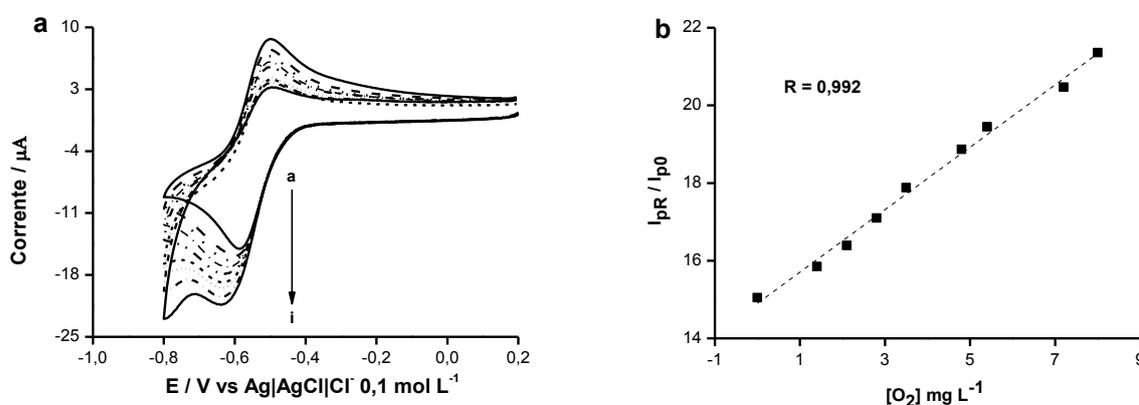
Fonte: Autor, 2011.

Em presença de oxigênio, o potencial de redução da quinona ($E_{pc1} = -0,685$ V) sofre um deslocamento de 30 mV para valores mais negativos ($E_{pc1} = -0,715$ V). O aumento da concentração de oxigênio promoveu um aumento na corrente de pico da primeira onda de redução (I_c) e desaparecimento da onda de oxidação (I_a), perfil característico de processo catalítico. O efeito sobre a corrente de redução foi analisado em função da concentração de oxigênio, Figura 63b.

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, a curva de I_{pR1} / I_{pO1} vs. $k_{app}[O_2]RT / nFv$, Figura 63b, permitiu determinar a constante de associação aparente entre o radical semiquinona (Q^{\bullet}), eletrogerado na redução da *nor*- β -lapachona com oxigênio, sendo a mesma igual a 0,55 s⁻¹.

Estudos semelhantes foram realizados para os nitroderivados. O perfil voltamétrico obtido para **1** (QPh-*o*-NO₂) em presença de oxigênio é representado na Figura 64a, o qual evidenciou reatividade dos produtos da eletrorredução em primeira onda deste composto. O processo de redução variou para valores mais catódicos, havendo um deslocamento de 50 mV em concentração de oxigênio igual 0,070 mmol L⁻¹ e, a partir desta concentração também não mais foi observado aumento da intensidade de corrente de pico para o processo redox.

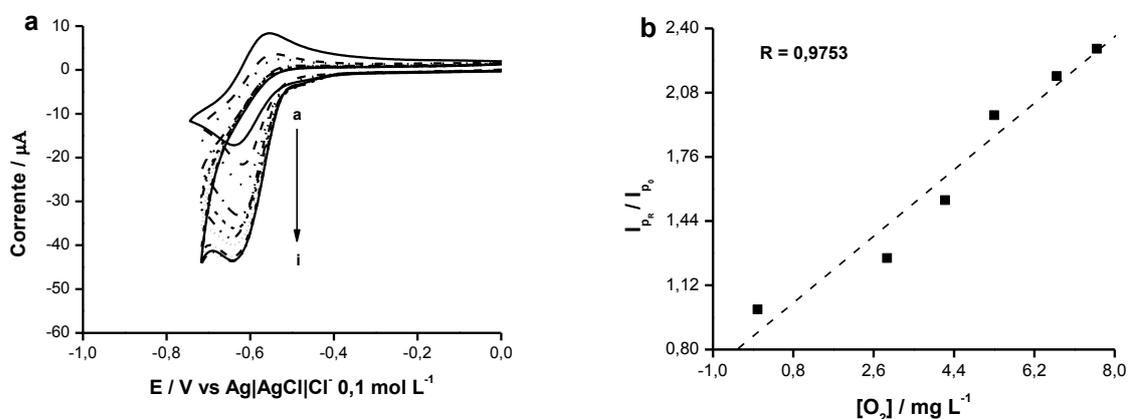
Figura 64. a: Voltamograma Cíclico de **1** em DMF/TBABF₄ (0,1 mol L⁻¹), eletrodo de carbono vítreo, em presença de diferentes concentrações de oxigênio: (a) 0, (b) 0,004, (c) 0,006, (d) 0,008, (e) 0,109, (f) 0,150, (g) 0,168, (h) 0,250 e (i) 0,340 mmol L⁻¹, $v = 100$ mV s⁻¹. **b:** Curva de I_{pR1} / I_{pO1} em função da concentração de oxigênio.



Os valores de corrente obtidos em diferentes concentrações de oxigênio, foram inseridos na curva de I_{pR1} / I_{pO1} vs. $k_{ap}[O_2]RT / nFv$ Figura 64b, e então determinada constante de associação aparente entre o radical semiquinona (Q^{\bullet}) eletrogerado na redução de **1** com oxigênio ($k_{ap} = 0,20 \text{ s}^{-1}$).

Para a nitroquinona **2** (QPh-*m*-NO₂), um efeito mais pronunciado sobre a corrente de pico foi observado, em função da concentração de oxigênio, Figura 65a. Em presença de oxigênio, a corrente de redução de **2** sofreu um aumento de 28% em baixas concentrações de oxigênio, como em 0,096 mmol L⁻¹, atingindo um acréscimo máximo de 162% em mais elevadas, $[O_2] = 0,806 \text{ mmol L}^{-1}$. Já o potencial de pico catódico de **2** sofreu um deslocamento anódico de potencial de 32 mV em baixas concentrações de oxigênio.

Figura 65. a: Voltamogramas cíclicos de **2** ($C_2 = 1 \text{ mmol L}^{-1}$) em DMF + TBABF₄ (0,1 mol L⁻¹), eletrodo de carbono vítreo, em presença de diferentes concentrações de oxigênio: (a) 0, (b) 0,096, (c) 0,131, (d) 0,165, (e) 0,200, (f) 0,237, (g) 0,318, (h) 0,806, (i) 1,42 mmol L⁻¹. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. **b:** Curva de I_{pR1} / I_{pO1} em função da concentração de oxigênio.



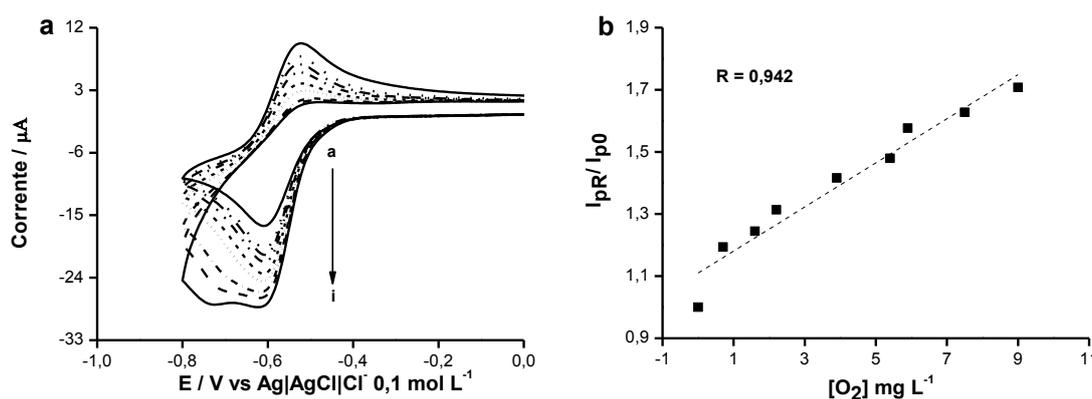
Fonte: Autor, 2011.

A partir da curva de trabalho, Figura 65b, para as correntes de pico em várias concentrações de oxigênio, a constante de associação entre as espécies eletrogeradas após redução de **2** em presença de O₂ foi obtida, sendo esta igual a $0,72 \text{ s}^{-1}$.

De modo similar aos estudos realizados com as nitroquinonas **1** e **2**, foi evidenciada a reatividade dos produtos da eletrorredução da nitroquinona **3** (QPh-*p*-NO₂) com oxigênio, Figura 66a. Para este nitroderivado, não houve variação do potencial de redução do grupo quinona, sendo observada saturação do efeito sobre

a corrente de pico em concentração de oxigênio igual a 0,234 mmol L⁻¹. A partir da curva de corrente de pico em função da concentração de oxigênio, Figura 66b, constante de associação foi determinada ($k_{ap} = 0,27 \text{ s}^{-1}$).

Figura 66. a: Voltamogramas cíclicos de **3** ($C_3 = 1 \text{ mmol L}^{-1}$) em DMF + TBABF₄ (0,1 mol L⁻¹), eletrodo de carbono vítreo, em presença de diferentes concentrações de oxigênio: (a) 0, (b) 0,0006, (c) 0,002, (d) 0,005, (e) 0,006, (f) 0,128, (g) 0,168, (h) 0,184, (i) 0,234 mmol L⁻¹. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. **b:** Curva de i_{pR1}/i_{pO1} em função da concentração de oxigênio.



Fonte: Autor, 2011.

De acordo com os resultados obtidos por método eletroquímico, fica evidenciado que os ânions radicais formados a partir da *nor*- β -lapachona e de seus derivados nitroquinonas, interagem com oxigênio em mecanismo eletroquímico-químico (EC) regenerando o grupo quinona, equação 29.



Diante destes resultados, evidenciou-se a capacidade de geração de espécies reativas de oxigênio com conseqüente indução do estresse oxidativo para a *nor*- β -lapachona e seus derivados nitroquinonas. Em acordo com as constantes de associação entre os ânions radicais e o oxigênio ($k_{ap} = 0,72$ (**2**), 0,55 (*nor*- β -lapachona), 0,27 (**3**) e 0,20 (**1**) s⁻¹) a seguinte ordem de reatividade **2** (QPh-*m*-NO₂) > *nor*- β -lapachona > **3** (QPh-*p*-NO₂) > **1** (QPh-*o*-NO₂), foi observada. Estes estudos corroboram ensaios biológicos realizados para estes compostos (Cavalcanti, 2010), em que a morte celular de linhagens de células cancerosas foi induzida por meio da geração de ERO.

4.6 Estudos em Biossensor de dsDNA

A ativação de fármacos através de biorredução é uma modalidade farmacoterapêutica visando à morte de células com limitada concentração de oxigênio (células hipóxicas). Nesse sentido, compostos nitroaromáticos, como o nitroimidazóis e nitrofuranos, são fármacos biorredutíveis com inúmeras aplicações em química medicinal. A redução do grupo nitro é o mecanismo chave desta atividade, sendo a ciclagem redox outro caminho pelo qual nitroaromáticos exercem sua atividade (Colón *et al.*, 2008). Inúmeras atividades biológicas também são observadas para os compostos quinoídicos. Quinonas como as antraciclinas, daunorrubicina, doxorrubicina, entre outras, são muito utilizadas clinicamente para o tratamento de várias linhagens de câncer (Valderrama *et al.*, 2008).

A atividade farmacológica de quinonas é decorrente da inibição de enzimas importantes ao DNA, como as topoisomerasas, ou através de intercalação a este, e, ciclagem redox com oxigênio após processo de biorredução como mencionado. Assim, é esperado para compostos detentores destas duas funcionalidades farmacofóricas (quinona e nitroaromático), com propriedades eletrofílicas e oxidantes, apresentem reatividade frente ao DNA. Desta forma, uma vez confirmada a geração de estresse reativo por parte dos produtos de reação da *nor*- β -lapachona e seus derivados nitroquinonas, a reatividade frente à biomolécula do DNA foi investigada.

Os estudos dos compostos **1**, **2** e **3** com o DNA foram realizados, utilizando um filme espesso de dsDNA, preparado pela solubilização do DNA dupla fita em tampão acetato, pH 4,5, depositado sobre superfície de um eletrodo de carbono vítreo - um biossensor de dsDNA. Este biossensor foi imerso em solução de cada composto e, transcorrido o tempo de contato estabelecido, efetuaram-se as medidas eletroquímicas, para averiguar possíveis modificações no perfil eletroquímico do DNA.

Em estudos descritos na literatura (Brett *et al.*, 1999; De-los-Santos-Álvarez *et al.*, 2004), a oxidação eletroquímica do DNA em meio ácido, pH 4,5, refere-se às bases guanina e adenina. Como as bases do DNA dupla fita (dsDNA) efetuam ligação de hidrogênio, as intensidades das correntes de pico de oxidação são inferiores àquelas observadas em estudo realizado com o DNA fita simples, desnaturado em meio ácido. Quando o biossensor de dsDNA é estudado em

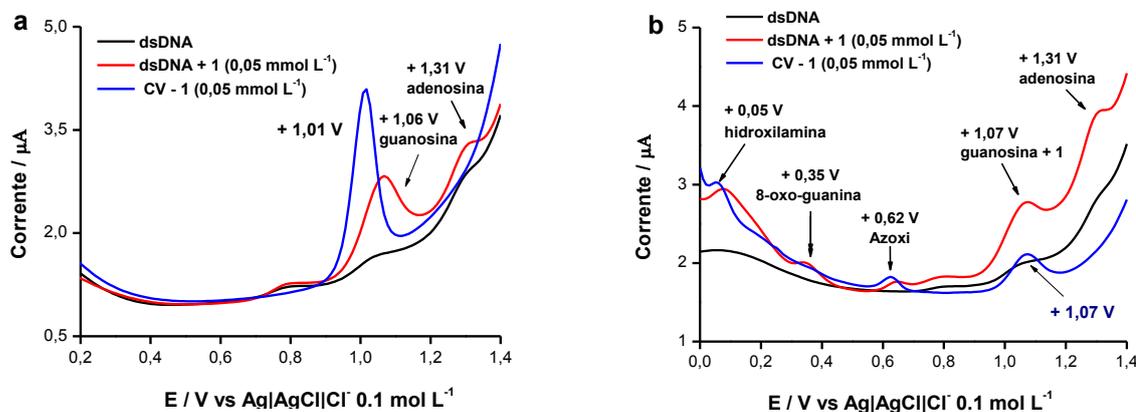
presença de um fármaco que tem como alvo biológico de ação o DNA, observa-se um aumento nas intensidades das correntes de oxidação, caracterizando interação positiva, devido à exposição das bases (guanina e adenina) a processo redox em superfície eletródica. Estudos da interação de quinonas e nitroaromáticos, de maneira direta ou após processo redox (redução/oxidação) são relatados na literatura (Vyskocil *et al.*, 2010).

A seguir, são descritos os resultados referentes aos estudos de **1**, **2** e **3**, em biossensor eletroquímico de dsDNA. Para o composto padrão, *nor*- β -lapachona, em ensaios prévios, não houve evidência de interação, um comportamento análogo ao observado para a β -lapachona (Brett *et al.*, 2002).

Os estudos por voltametria de pulso diferencial do dsDNA, em presença do composto **1** são representados na Figura 67a-b, realizados seguindo duas metodologias. Na primeira, o biossensor de dsDNA foi imerso em solução de **1** e, transcorrido um tempo de contato de 15 minutos, medidas eletroquímicas foram realizadas, Figura 67a. O segundo método consistiu na aplicação de potencial de redução correspondente à redução dos grupos eletroativos, sendo borbulhado na cela eletroquímica, argônio, para eliminar a interferência de oxigênio e, logo em seguida, a varredura em potencial anódico foi realizada, Figura 67b.

A interação de **1** com dsDNA é evidenciada tanto diretamente, quando o biossensor de dsDNA é imerso em solução do mesmo, quanto após uma pré-eletrólise para redução deste, realizada na matriz de DNA. O voltamograma de pulso diferencial da Figura 67a (vermelho), para o biossensor em presença de **1** apresenta dois picos de oxidação ($E_{pa1} = +1,06$ V e $E_{pa2} = +1,31$ V). O primeiro pico apresenta-se alargado e, em analogia ao estudo de **1**, em eletrodo de carbono vítreo, da Figura 67a (azul), deve ser relativo a dois processos redox, a oxidação do grupo amino e oxidação de base do guanosina. Considerando o voltamograma apenas do biossensor, Figura 67a (preto), que apresentou sinais de oxidação, o pico observado em potencial mais anódico (+ 1,31 V) está relacionado à oxidação da guanosina.

Figura 67. a: VPD do biossensor de dsDNA, em ausência (●) e presença de **1** (●). VPD de **1**, em eletrodo de carbono vítreo (●). **b:** VPD do biossensor de dsDNA, em ausência de **1** (●) e presença de **1** (●). VPD de **1** em eletrodo de carbono vítreo (●) ($E_{ap} = -0,8$ V). Todas as análises foram realizadas em meio aquoso etanólico (10%), tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5, $C = 0,05 \text{ mmol L}^{-1}$. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2011.

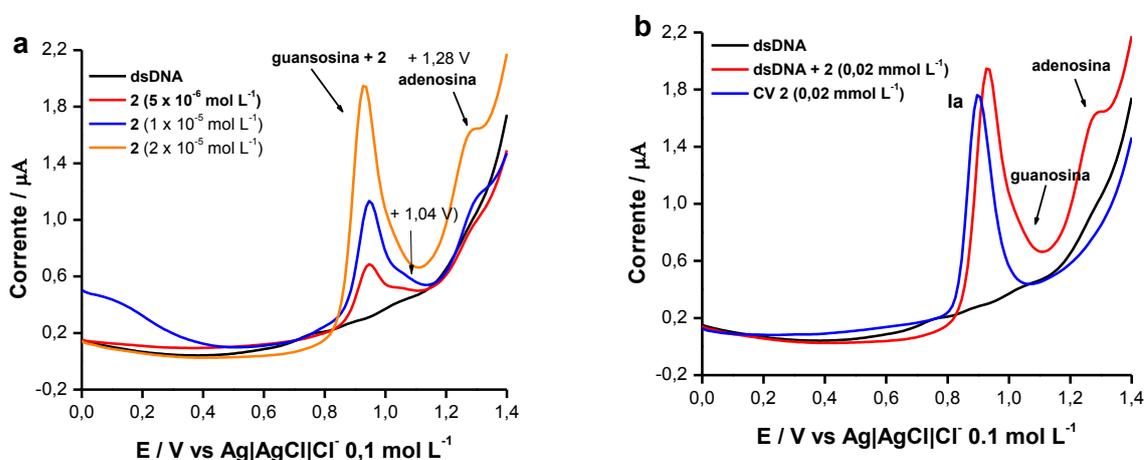
Os estudos realizados com aplicação de potencial de redução ($E_{ap} = -0,80$ V) evidenciaram que os produtos da eletrorredução **1** são DNA-reativos, Figura 67b. Em eletrodo de carbono vítreo, Figura 67b (azul), após aplicação de potencial de redução, três picos de oxidação são observados. O primeiro destes, em + 0,05 V, está relacionado à formação do derivado nitroso pela oxidação da hidroxilamina, gerada a partir do potencial aplicado. Já o segundo pico de oxidação, em +0,62 V, refere-se à oxidação do azoxi derivado, formado pela condensação dos produtos de redução do grupo nitro, o intermediário nitroso e hidroxilamina (Lund, 2001). O terceiro potencial de oxidação (+ 1,07 V) corresponde à oxidação do grupo amino aromático, como já discutido anteriormente. Quando o mesmo tratamento foi aplicado ao biossensor de dsDNA em presença de **1** (Figura 67b, vermelho), foram observados os picos referentes aos derivados nitroso e azoxi, contudo, o pico de oxidação do grupo amino em +1,07 V, apresentou-se mais alargado e de maior intensidade de corrente, caracterizando a presença de um processo redox adicional.

Nesse estudo, Figura 67b, o dano ao DNA foi verificado pela presença de três ondas de oxidação, duas relacionadas à guanosina (+1,07 V) e adenosina (+1,31 V) e, uma onda anterior ($E_{pa1} = +0,35$ V) que, em comparação com estudos realizados (De Abreu *et al.*, 2002; Brett *et al.*, 2002) para niclosamida e doxorrubicina em

biossensor de dsDNA, está relacionado à 8-oxoguanina, produto da oxidação da guanina pelo intermediários de redução da nitroquinona.

Os estudos realizados em biossensor de dsDNA para **2** apresentaram interação positiva frente ao DNA. Nesse caso, foram realizados estudos em baixas concentrações, pois o mesmo se apresentou mais insolúvel que as nitroquinonas **1** e **3**. Nos voltamogramas de pulso diferencial representados na Figura 68a (vermelho, azul, amarelo), determinou-se a concentração mínima a partir da qual **2** causa dano ao DNA, sendo o maior dano observado na concentração de 20 μM . Estudos em concentração superiores a esta não se mostraram satisfatórios, pois havia precipitação do composto.

Figura 68. a: VPD do biossensor de dsDNA em ausência (\bullet) e após exposição (15 minutos) a **2** em 0,006 mmol L^{-1} (\bullet), 0,05 mmol L^{-1} (\bullet) e 0,02 mmol L^{-1} (\bullet). **b:** VPD do biossensor de dsDNA em ausência (\bullet), e após exposição (15 minutos) a **2** em 0,02 mmol L^{-1} (\bullet) e VPD de **2** em eletrodo de carbono vítreo (\bullet) na mesma concentração. Todas as análises foram realizadas em meio aquoso etanólico (10 %), (tampão acetato (0,1 mol L^{-1}), pH 4,5. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

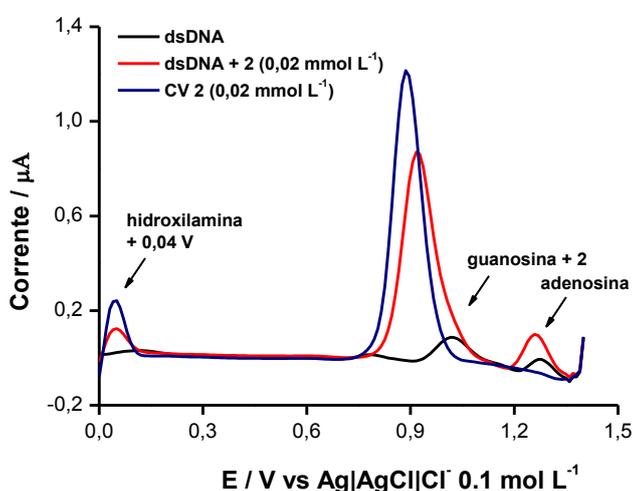


Fonte: Autor, 2011.

A alta intensidade de corrente observada para o pico la, se deve mais uma vez à mistura de processos de oxidação para anilina e guanosina. Esta consideração é confirmada pela comparação entre o voltamograma de pulso diferencial da Figura 68b, para o biossensor de dsDNA em ausência (preto) e presença de **2** (vermelho), o estudo de **2** em eletrodo de carbono vítreo (azul) que apresentou uma corrente de pico proporcional à corrente do biossensor em presença de **2**.

O dano ao DNA também foi observado quando aplicado potencial de redução, como observado para o estudo em biossensor de dsDNA, Figura 69. Contudo, ao contrário do observado para o composto **1**, os produtos de redução de **2** não se mostraram tão reativos, observando-se um comportamento similar ao obtido para medida eletroquímica direta, biossensor em contato por tempo determinado com solução de **2**, seguida de medida eletroquímica.

Figura 69. VPD do biossensor de dsDNA, em ausência de **2** (●), em presença de **2** (●). VPD de **2** em eletrodo de carbono vítreo (●), com aplicação de potencial de redução ($E_{ap} = -0,8$ V), $c = 0,02$ mmol L⁻¹. Todas as análises foram realizadas em meio aquoso etanólico (10%), tampão acetato (0,1 mol L⁻¹) pH 4,5. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 5$ mV s⁻¹.



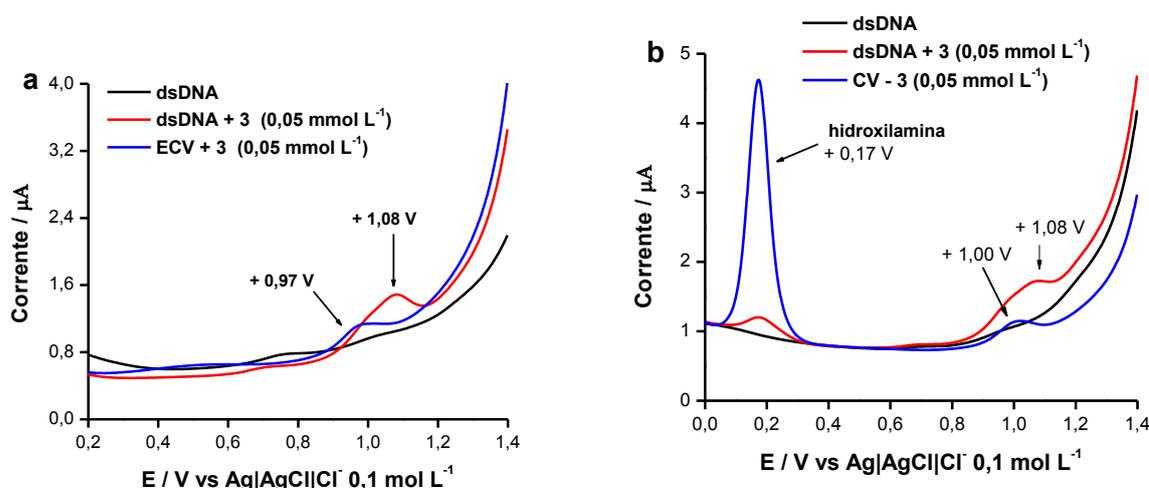
Fonte: Autor, 2011.

A nitroquinona **3** também apresentou reatividade positiva frente ao DNA, Figura 70, contudo em menor proporção que os compostos **1** e **2**. Em presença de **3**, o voltamograma do biossensor de dsDNA apresentou uma onda alargada, Figura 70a (vermelho), relacionada tanto à oxidação de **3**, em comparação à oxidação em eletrodo de carbono vítreo (+ 0,97 V), Figura 70a (azul), e de guanósina (+ 1,08 V).

Nos estudos realizados através da aplicação de potencial de redução, Figura 70b, um perfil voltamétrico muito semelhante foi observado. Em eletrodo de carbono vítreo, Figura 70b (azul), com aplicação de potencial em $-0,80$ V, observou-se para **2** um pico de alta intensidade de corrente em + 0,17 V, referente à formação do derivado nitroso, por oxidação da hidroxilamina gerada, e uma onda em +1,00 V relativa a oxidação do grupo anilina substituído. Em biossensor de dsDNA, houve redução drástica da corrente de oxidação da hidroxilamina, Figura 70b (vermelho), e

o surgimento de onda alargada em +1,08 V que, de acordo com seu perfil e intensidade de corrente corresponde à soma dos processos de oxidação da anilina e da guanosina.

Figura 70. a: VPD do biossensor de DNA, em ausência (●) e presença de **3** (●). VPD de **3** em eletrodo de carbono vítreo (●). **b:** VPD do biossensor de DNA, em ausência de **3** (●), em presença de **3** (●). VPD de **3** em eletrodo de carbono vítreo (●), com aplicação de potencial de redução ($E_{ap} = -0,8$ V), $c = 0,05$ mmol L⁻¹. Todas as análises foram realizadas em meio aquoso etanólico (10%), tampão acetato (0,1 mol L⁻¹) pH 4,5.. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 5$ mV s⁻¹.

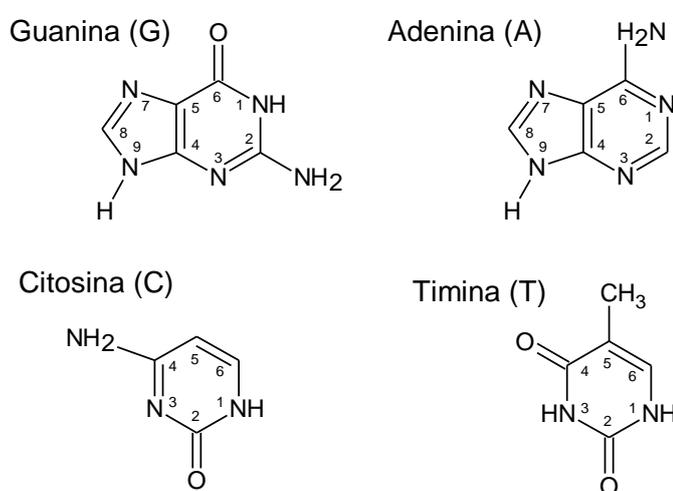


Fonte: Autor, 2011.

A partir dos estudos eletroquímicos, utilizando biossensor de dsDNA, seja por método direto, onde o biossensor foi mantido em contato em solução dos compostos, ou por meio da redução dos grupos eletroativos no filme de dsDNA, evidenciou-se que as nitroquinonas são DNA-reativas, diferentemente da quinona precursora. As interações de moléculas eletrofílicas ao DNA são dependentes da nucleofilia das bases do DNA e fatores estéricos. Um maior caráter nucleofílico é observado para os átomos de nitrogênio endocíclicos N-3 e N-7 das bases guanina e adenina, enquanto menor nucleofilia é observada para os átomos de oxigênio exocíclicos, Figura 71. O átomo N-7 da guanina encontra-se mais acessível na fenda maior do DNA e, portanto mais suscetível a ataque eletrofílico que o N-3 da adenina, orientada na fenda menor do DNA. Por razões estéricas, os sítios N-1 da adenina e N-3 da citosina não reagem em grande extensão, assim como os átomos de nitrogênio, nas bases timina e citosina (Benigni & Bossa, 2011).

Diante dos dados referentes aos estudos em biossensor eletroquímico de DNA e, considerando que a *nor*- β -lapachona não interage diretamente com o DNA (Cavalcanti, 2010), a reatividade observada para as nitroquinonas decorre diretamente da presença do grupo nitro substituinte no anel arilamino. Os nitroaromáticos pertencem a uma classe de compostos que após biorredução geram espécies altamente eletrofílicas capazes de reagir com os sítios nucleófilos das bases do DNA, Figura 70, produzindo derivados anilínicos (Benigni & Bossa, 2011).

Figura 71. Estrutura química das bases nitrogenadas do DNA.



Fonte: Autor, 2011.

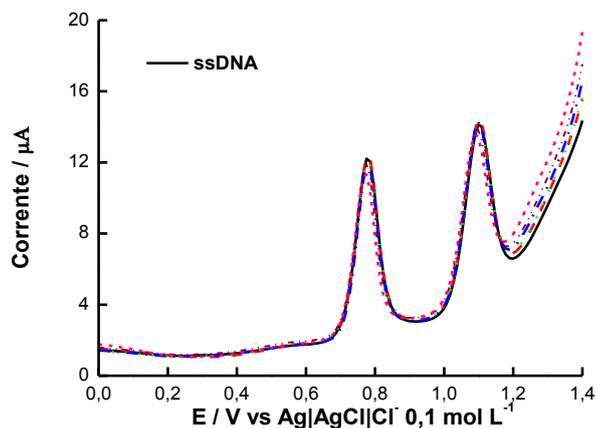
Em busca de informações adicionais que pudessem corroborar a reatividade das nitroquinonas com o DNA, foram realizados estudos empregando-se o DNA em fita simples, DNA desnaturado em meio ácido, como descrito a seguir.

4.7 Estudos em ssDNA

Ao contrário do dsDNA, em meio aquoso tamponado, pH 4,5, o espectro eletroquímico do ssDNA é caracterizada por duas ondas anódicas bem definidas de alta intensidade de corrente, referentes à oxidação das bases púricas, guanina e adenina, em potenciais de +0,83 V e +1,17 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.

Embora estudos anteriores já tenham evidenciado que a *nor*- β -lapachona não interage diretamente com o DNA, o comportamento eletroquímico do ssDNA em presença desta quinona foi investigado, Figura 72. A partir desta Figura, observa-se que sinais de oxidação das bases guanina e adenina não sofreram decréscimo significativo de suas intensidades de corrente, mesmo em concentrações de *nor*- β -lapachona relativamente altas. Estes resultados são indicativos de ausência de interação com o DNA, similar a estudos já realizados para a β -lapachona (Brett *et al.*, 2002).

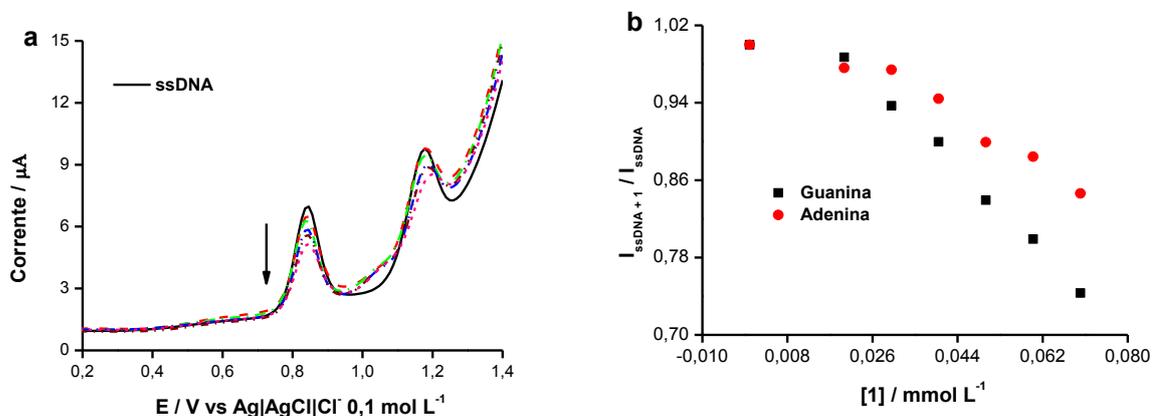
Figura 72. VPD do ssDNA em função da concentração de *nor*- β -lapachona (●) 0,01; (●) 0,02, (●) 0,06, (●) 0,10 e (●) 0,20 mmol L⁻¹. Meio aquoso etanólico (27%), tampão acetato (0,1 mol L⁻¹), pH 4,5. Eletrodo de carbono vítreo, $\nu = 10$ mV s⁻¹.



Fonte: Autor, 2011.

No estudo realizado para o ssDNA em função da concentração da nitroquinona **1**, um comportamento acentuadamente diferente foi observado para eletrooxidação do ssDNA, Figura 73a. Os potenciais de pico anódico para oxidação do ssDNA sofrem um leve deslocamento para valores mais positivos, sendo de 10 mV para onda anódica Ia e de 20 mV para a onda IIa. A partir desses estudos, um decréscimo gradativo das correntes de oxidação também é observado, figura 73b, cujo decaimento de corrente de oxidação da guanina atinge 27 % e 16 % para adenina em concentração de **2**, em cela eletroquímica igual a 0,07 mmol L⁻¹.

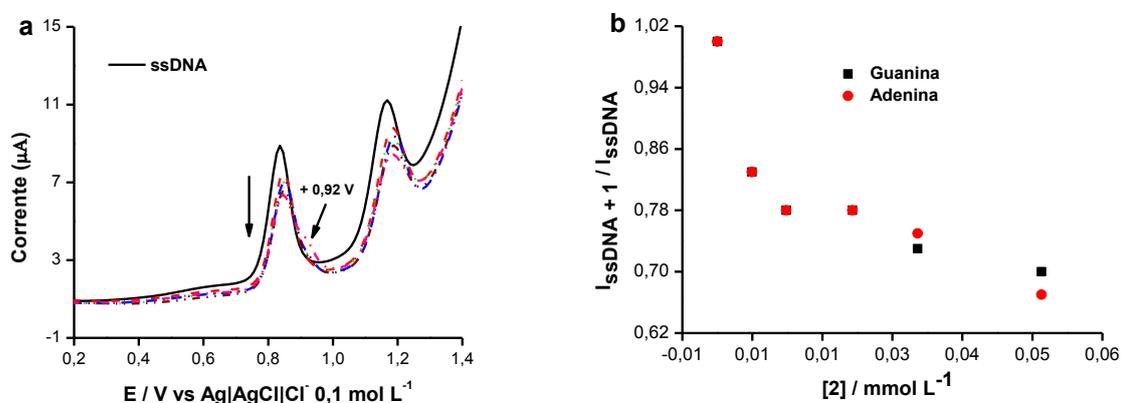
Figura 73. a: VPD do ssDNA em função da concentração de **1** (●) 0, (●) 0,01; (●) 0,02, (●) 0,05, (●) 0,06 e (●) 0,07 mmol L⁻¹. b: Gráfico de corrente de pico de oxidação do ssDNA em função da concentração de **1**. Meio aquoso etanólico (27%), tampão acetato (0,1 mol L⁻¹), pH 4,5. Eletrodo de carbono vítreo, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2011.

Os estudos realizados com a nitroquinona **2** mostraram a mesma tendência, Figura 74a, sendo observado para este composto o surgimento de uma onda de oxidação em + 0,92 V, entre os picos da guanina e adenina. Em função da concentração de **2**, houve deslocamento (10 e 20 mV) dos potenciais de oxidação das bases.

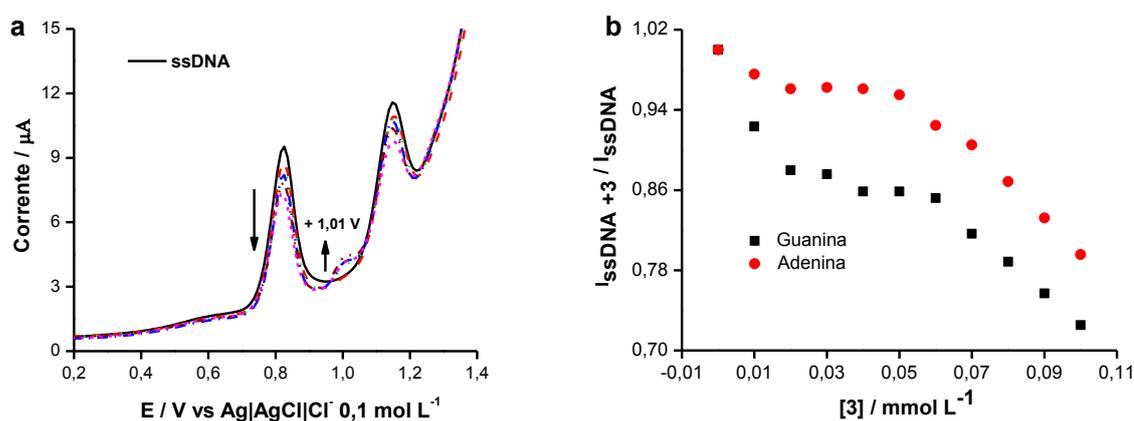
Figura 74. a: VPD do ssDNA em função da concentração de **2** (●) 0, (●) 0,005; (●) 0,01, (●) 0,02, (●) 0,03 e (●) 0,05 mmol L⁻¹. b: Gráfico de corrente de pico de oxidação de guanina e adenina em função da concentração de **2**. Meio aquoso etanólico (27%), tampão acetato (0,1 mol L⁻¹), pH 4,5. Eletrodo de carbono vítreo, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2011.

Um decréscimo de 30% foi observado para a primeira onda de oxidação, enquanto que a segunda onda anódica decaiu 24%, Figura 74b. Para o composto **3**, Figura 75a, os potenciais de oxidação não sofreram deslocamento significativo, contudo, as correntes de pico, Figura 75b, sofreram decréscimo de suas intensidades, 28% para onda referente a guanina e 21% para adenina, em função da concentração de **3**. A intensidade de corrente de pico para o processo de oxidação do grupo amino (+1,01 V) também acompanhou o aumento da concentração do composto.

Figura 75. a: VPD do ssDNA em função da concentração de **3** (●) 0, (●) 0,01; (●) 0,03, (●) 0,05, (●) 0,07 e (●) 0,1 mmol L⁻¹. **b:** Gráfico de corrente de pico de oxidação de guanina e adenina em função da concentração de **2**. Meio aquoso etanólico (27%), tampão acetato (0,1 mol L⁻¹), pH 4,5. Eletrodo de carbono vítreo, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2011.

A partir dos estudos com ssDNA, confirmou-se que a *nor*- β -lapachona não interage diretamente com o DNA. Contudo, seus derivados nitrados atuam por este caminho, evidenciado nos estudos das nitroquinonas em biossensor de dsDNA e sensor de ssDNA. Embora as características eletrofílicas e oxidantes de quinonas, a não reatividade direta frente ao DNA da *nor*- β -lapachona sugere que seu mecanismo não envolve alquilação direta do DNA. Assim, o mecanismo de ação deste composto frente às células tumorais analisadas (Cavalcanti, 2010) envolve outro mecanismo, como a geração do estresse oxidativo, confirmada nos estudos por método eletroquímico e/ou, alquilação de biomoléculas de relevância celular, como proteínas e compostos tiólicos, GSH ou resíduos de cisteína em proteínas, promovendo a

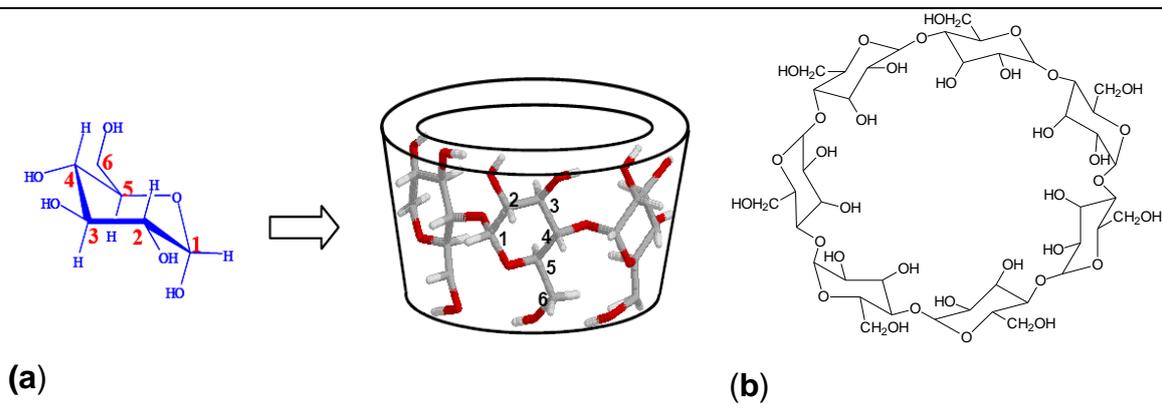
depleção nos níveis de GSH celular e alquilação de proteínas (Benigni & Bossa, 2011).

Nesse sentido, para as nitroquinonas, o dano ao DNA é uma consequência direta da presença do grupo nitro através da formação de adutos covalentes entre o grupo nitroaromático com o DNA. O metabolismo destes compostos envolve a geração de vários intermediários tóxicos, sendo o primeiro destes o ânion radical nitro, que em condições aeróbias transfere elétrons ao oxigênio molecular para formar o ânion radical superóxido, estresse oxidativo, com formação de vários intermediários tóxicos ao DNA. Em condições anaeróbias, etapas subseqüentes geram como produtos, nitroso, hidroxilamina e amina, com potencial toxicidade ao DNA (Benigni & Bossa, 2011)

4.8 Comportamento Eletroquímico das Nitroquinonas em Presença de β -ciclodextrina

Ciclodextrinas têm sido amplamente utilizadas devido a sua especial habilidade em formar complexos de inclusão com uma variedade de moléculas, permitindo aumento de solubilidade, biodisponibilidade e estabilidade (Ferreira *et al.*, 2010). As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos de ocorrência natural formadas por unidades de *D*(+)-glicopirranose, em ligações α -1,4 (Raj & Ramaraj, 1996) e, diferenciadas principalmente quanto ao número de unidades de glicopirranose (6, 7 e 8 para α -, β -, e γ -ciclodextrinas, respectivamente) (Wang *et al.*, 2008). As unidades de *D*-glicose formam uma estrutura na forma de um cone, Figura 76, que apresenta uma cavidade relativamente hidrofóbica, enquanto seu exterior é hidrofílico em consequência da presença dos grupos hidroxila (Dang *et al.*, 1998). Devido à cavidade central hidrofóbica, ciclodextrinas são adequadas para inclusão de várias moléculas orgânicas lipofílicas, desde que possuam volume e estrutura química, adequados (Wang *et al.*, 2008).

Figura 76. (a) Estrutura funcional da β -ciclodextrina (Budal, 2003). (b) Estrutura química da β -ciclodextrina.



Fonte: Autor, 2011.

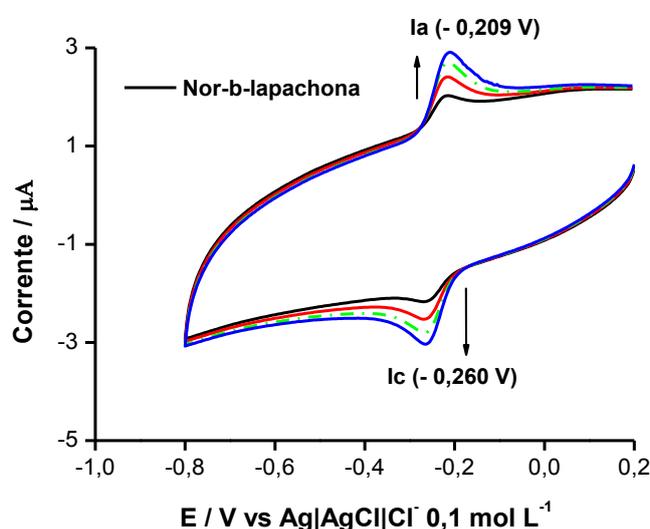
Na expressão da atividade biológica de fármacos, um parâmetro muito importante a ser considerado é a lipofilicidade, expresso como $\log P$, coeficiente de partição (Valderrama *et al.*, 2009). Assim, a insolubilidade pode acarretar limitações às aplicações farmacêuticas. Desta forma, considerando o caráter lipofílico apresentado pelos compostos, a *nor*- β -lapachona e seus derivados nitrados **1**, **2** e **3**, fator que se mostrou inconveniente para os estudos em meio aquoso, a formação de complexo de inclusão com β -ciclodextrina foi investigada.

Nesse sentido, é bem relatada (Yang *et al.*, 2004; Venturini *et al.*, 2008) a capacidade apresentada por ciclodextrinas em formar complexos de inclusão via interação não covalente em sua cavidade hidrofóbica com uma variedade de moléculas, entre estas, compostos orgânicos, inorgânicos e organometálicos. Do ponto de vista químico, tal característica confere às ciclodextrinas (CD) inúmeras aplicações, sejam no campo ambiental, processos industriais e, principalmente em química medicinal devido à possibilidade de aumentar a biodisponibilidade de fármacos, em meio aquoso e liberação *in loco* da molécula bioativa (Brewster & Loftsson, 2007).

As análises da *nor*- β -lapachona e nitroquinonas com β -ciclodextrina (β -CD) foram realizadas por voltametria cíclica em tampão fosfato (pH 7,4), com e sem utilização de etanol como co-solvente. Em todos os casos, quando β -CD foi adicionada à cela eletroquímica, transcorrido o tempo de cinco minutos que antecedeu cada análise, houve perda de turbidez das soluções, em consequência da transferência de fase, promovendo maior solubilização dos compostos. Mudanças consideráveis nos perfis voltamétricos de cada composto foram

observadas, como descritas individualmente a seguir. As análises realizadas para a *nor*- β -lapachona, tampão fosfato pH 7,4, com adição de β -CD, Figura 77, apresentou um 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 o grupo eletroativo de sofrer processo redox.

Figura 77. Voltamogramas Cíclicos da *nor*- β -lapachona ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) em diferentes concentrações de β -CD, (\bullet) 0, ($\color{red}\bullet$) 0,01, ($\color{green}\bullet$) 0,1 e ($\color{blue}\bullet$) 1 mmol L^{-1} , respectivamente), eletrodo de carbono vítreo, tampão fosfato pH 7,4, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



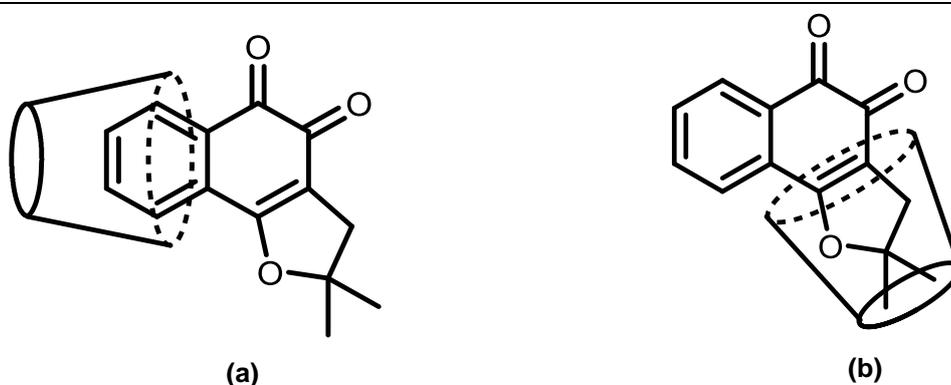
Fonte: Autor, 2011.

A formação de complexos de inclusão entre benzoquinona- β -CD e antraquinona- β -CD foi investigada por métodos eletroquímicos e espectroscópicos, sendo proposta estrutura para os respectivos complexos. Por ser menos volumosa, a benzoquinona pode ser completamente encapsulada na cavidade da β -CD, porém, para a antraquinona que é mais volumosa, apenas uma porção da molécula pode ser encapsulada no oligossacarídeo (Dang *et al.*, 1998). Assim, diante da similaridade estrutural entre a *nor*- β -lapachona e a antraquinona, a estrutura do complexo *nor*- β -lapachona- β -CD, Figura 78a, é proposto.

No entanto, em trabalho realizado para a β -lapachona (De Abreu *et. al.* 2007) é descrito que a complexação desta quinona com β -ciclodextrina ocorre no anel pirano, sendo observado um decréscimo na corrente de oxidação da hidroquinona

devido as ligação de hidrogênio entre esta hidroxila externa (C-6), Figura 76, da β -ciclodextrina. No presente estudo, houve um aumento gradativo das correntes de redução e oxidação da *nor*- β -lapachona em função da concentração de β -ciclodextrina. Assim, mesmo a inclusão ocorrendo a partir do anel diidrofurânico da *nor*- β -lapachona, Figura 78b, a distribuição espacial das hidroxilas externas da β -ciclodextrina não permitem esta interação e, portanto, as correntes de pico dos processos aumentam à medida que o complexo *nor*- β -lapachona- β -CD é formado.

Figura 78. Estrutura proposta para o complexo *nor*- β -lapachona- β -CD: (a) inclusão a partir do anel aromático e (b) inclusão a partir da do anel diidrofurano.



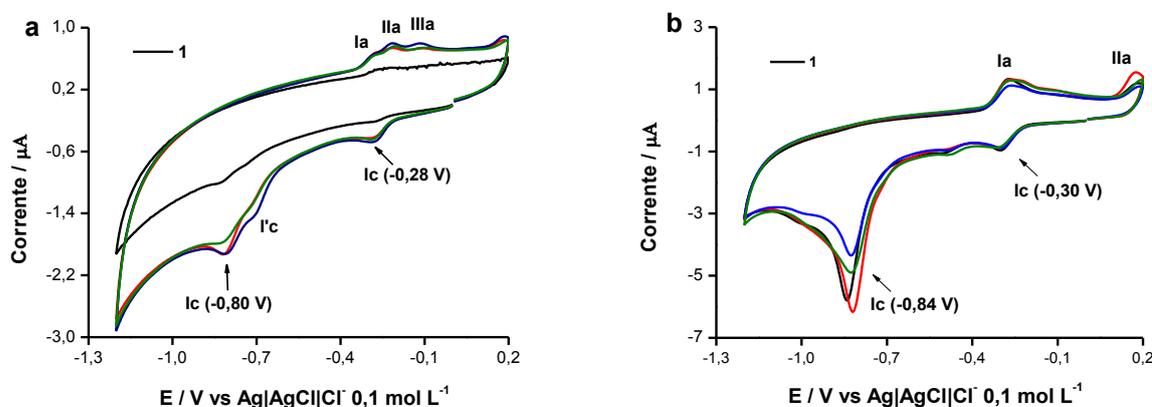
Fonte: Autor, 2011.

O comportamento eletroquímico em eletrodo de carbono vítreo, em função da concentração de β -ciclodextrina para a nitroquinona **1** é representado na Figura 79a-b. Devido à solubilidade parcial de **1** em tampão fosfato, Figura 79a (preto), em baixa concentração ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$), picos redox referentes aos grupos eletroativos não são observados. Contudo, ocorre acentuado acréscimo nas correntes de pico referentes à redução tanto da quinona quanto do nitro, quando uma massa de β -CD, em concentração 10x menor ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) que **1**, Figura 79a (vermelho), é adicionada à cela eletroquímica. As duas ondas redox se tornam evidentes também em concentração de β -ciclodextrina igual a **1** ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$), não havendo alteração nas correntes de pico. No entanto, nesta concentração, observa-se uma onda de redução adicional (*I*'c), que provavelmente está relacionado ao nitroso, intermediário no processo de redução do grupo nitro, Figura 79a (azul), evidenciado maior estabilidade dos produtos de redução de **1** no complexo **1**- β -CD. Em concentração de β -CD 10x maior (1 mmol L^{-1}) que **1**, Figura 79a (verde), um leve decréscimo das

correntes de pico relacionadas aos processos mencionados é observado, em consequência a um maior encapsulamento de **1** em β -CD.

Adicionalmente aos efeitos mencionados, três ondas de oxidação são também observadas nos voltamogramas de **1** em presença de β -CD, Figura 79a, referentes à oxidação da hidroquinona gerada na primeira redução (I_c/I_a) e dos produtos de redução do grupo nitro em I'_c e I_{IIc} , evidenciando maior estabilidade dos intermediários de redução da nitroquinona no complexo **1**- β -ciclodextrina. Modificações nos picos de redução também foram observadas quando o mesmo estudo foi realizado para **1**, utilizando etanol como co-solvente (5%), exceto pelo fato da maior solubilidade do composto neste meio, caracterizado pelos picos de redução (I_c e I_{IIc}) presentes no voltamograma, Figura 79b (preto).

Figura 79. a: Voltamogramas Cíclicos de **1** ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) em diferentes concentrações de β -CD, (●) 0, (●) 0,01, (●) 0,1 e (●) 1 mmol L^{-1} , tampão fosfato pH 7,4. **b:** Voltamogramas Cíclicos de **1** ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) com adição de diferentes concentrações de β -CD, (●) 0, (●) 0,01, (●) 0,1 e (●) 1 mmol L^{-1} , tampão fosfato pH 7,4 + EtOH (5%). Eletrodo de carbono vítreo, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

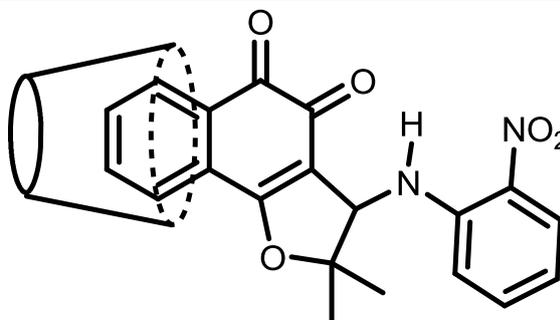


Fonte: Autor, 2011.

As correntes de pico sofreram efeito similar ao observado no estudo utilizando apenas tampão como solvente. Em concentração de β -ciclodextrina 10x menor, Figura 79b (vermelho), houve aumento de pico para a segunda onda (I_{IIc}), referente à formação da hidroxilamina, ao passo que um decréscimo foi observado em concentração de β -ciclodextrina igual, Figura 79b (verde), e 10x maior, Figura 79b (azul), que **1**. Diante destes estudos, a estrutura do composto **1**- β -CD, Figura 80, é

proposta, ocorrendo a partir do anel aromático em consequência do impedimento estéreo.

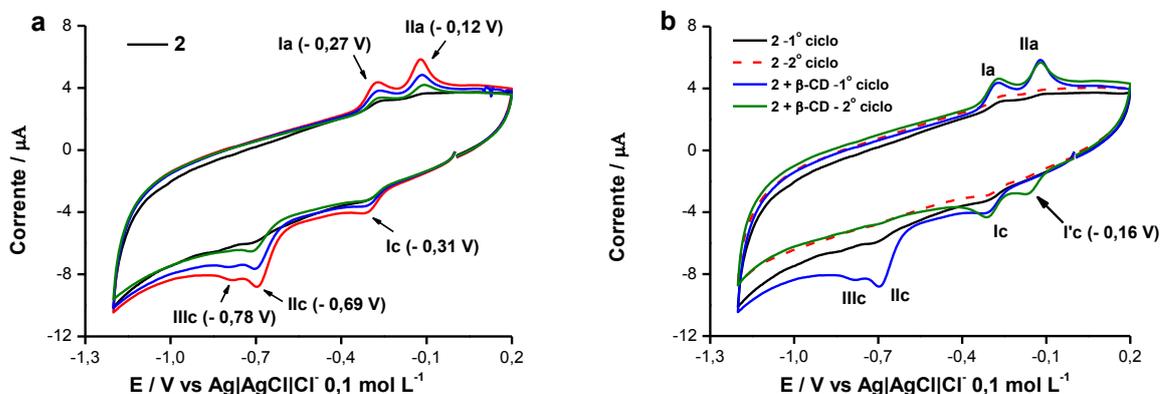
Figura 80. Estrutura proposta para o complexo de inclusão 1- β -CD.



Fonte: Autor, 2011.

Um comportamento similar, quanto ao aumento das correntes dos processos, para os estudos de **2** com β -CD foram obtidos, em que, devido à baixa solubilidade em meio aquoso, o voltamograma cíclico de **2** não apresentou ondas de redução bem definidas, Figura 81a (preto), havendo aumento pronunciado das intensidades de corrente destes processos em função da concentração de β -CD, Figura 81a (vermelho, azul e verde), caracterizando a formação do complexo de inclusão. Um terceiro processo de redução (IIIc) foi observado após a formação da hidroxilamina em IIc e, considerando o mecanismo de redução de nitrocompostos pode estar relacionado à formação da amina. Em varredura inversa de potencial, duas ondas de oxidação (Ia e IIa) de alta intensidade de corrente relacionadas aos produtos de redução de **2**. Semelhantemente a **1**, maiores intensidades de corrente de pico são relacionadas a uma concentração de β -ciclodextrina 10x menor, Figura 81a (vermelho).

Figura 81. a: Voltamogramas Cíclicos de **2** ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) em diferentes concentrações de β -CD, (●) 0, (●) 0,01, (●) 0,1 e (●) 1 mmol L^{-1} . **b:** Voltamogramas em varreduras sucessivas de **2** ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) em presença β -ciclodextrina ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$), em eletrodo de carbono vítreo, tampão fosfato pH 7,4, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

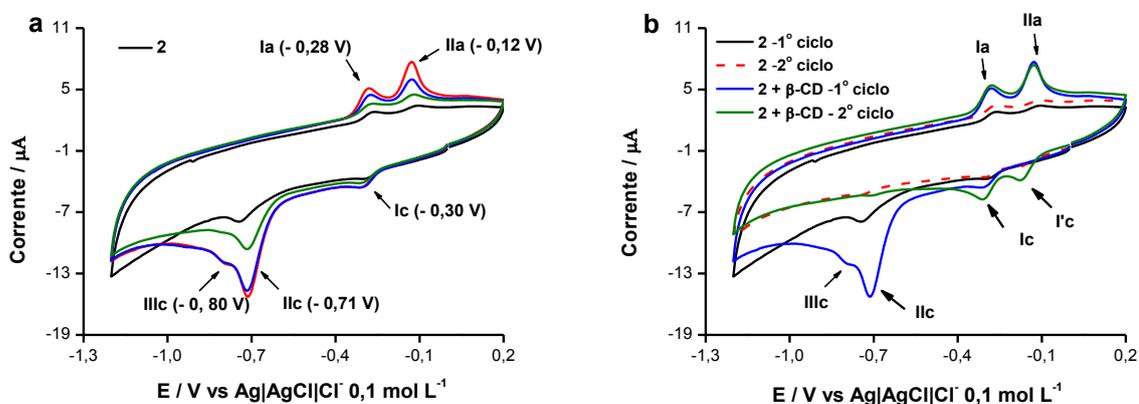


Fonte: Autor, 2011.

O perfil eletroquímico de **2** com adição de β -ciclodextrina sugere que seus produtos da redução são mais estáveis no complexo **2**- β -ciclodextrina. Assim, varreduras sucessivas de **2** em presença de β -CD, concentração 10x menor, Figura 81b, foram realizadas. É observado a partir destes estudos, um novo par redox (Ila/I'c), Figura 81b (verde), relacionado ao sistema quasi-reversível nitroso/hidroxilamina ($\text{ArNO} \rightarrow \text{ArNHOH}$). A partir da hidroxilamina formada em Ilc ($-0,69 \text{ V}$), Figura 81b (azul). Esta possibilidade é reforçada pela manutenção da onda Ila, Figura 81b (verde), em varreduras sucessivas de potencial catódico.

Os estudos de **2** utilizando etanol como co-solvente, Figura 82a-b, demonstraram a mesma tendência já observada quanto ao aumento dos potenciais de pico redox em função da concentração de β -CD. Devido à maior solubilidade de **2** em meio aquoso-etanólico, os processos redox se apresentam mais definidos, sendo, possível observar maior facilidade de redução para o segundo processo em presença de β -CD, constatando-se um deslocamento anódico de potencial de 30 mV, Figura 82a (preto e vermelho). O aumento da concentração de β -CD promove o mesmo decréscimo de corrente de pico já mencionado. A maior estabilidade dos intermediários de redução também foi observada neste meio, representados pelo par redox Ila/I'c, Figura 82b, como já discutido anteriormente.

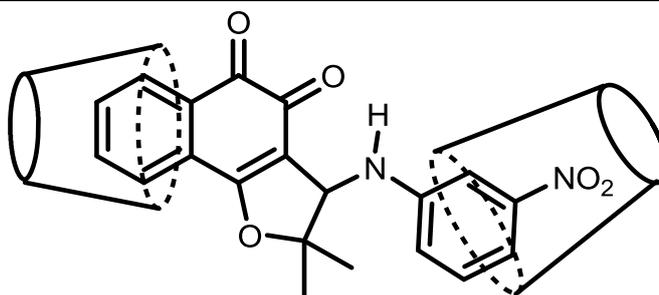
Figura 82. a: Voltamogramas Cíclicos de **2** ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) em diferentes concentrações de β -CD, (●) 0, (●) 0,01, (●) 0,1 e (●) 1 mmol L^{-1} **b:** Voltamogramas em varreduras sucessivas de **2** ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) em presença β -CD ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$). Tampão fosfato pH 7,4 + EtOH (5%), eletrodo de carbono vítreo, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2011.

Os estudos de **2**, apresentaram um decréscimo mais acentuado para a corrente de pico relacionada ao processo IIc, em relação a Ic, em maiores concentração de β -CD. Esta característica é conseqüência do maior encapsulamento de **2** na cavidade hidrofóbica da β -CD, em maiores concentração do oligossacarídeo, impedindo o processo redox do grupo eletroativo como representado na Figura 83.

Figura 83. Estrutura proposta para o complexo de inclusão **2**- β -CD.

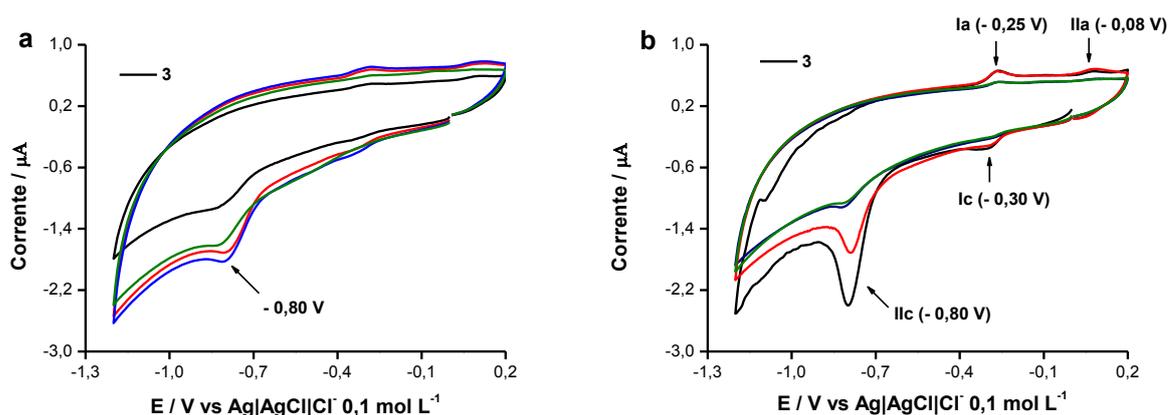


Fonte: Autor, 2011.

Os estudos de **3** em presença de β -CD também evidenciaram a interação deste com o oligossacarídeo, Figura 84a-b. Contudo, é observado um tendência diferenciada quanto às modificações nos potenciais de pico redox. Em meio aquoso tamponado, foi observado um aumento da corrente do pico de redução do nitro ao

derivado hidroxilamínico (- 0,80), Figura 84a (preto), até adição de β -CD em concentração igual a **3**, Figura 84a (vermelho e azul). O processo redox anterior à redução do grupo quinona continuou de difícil caracterização, mesmo em presença de β -CD. Em concentração de β -ciclodextrina 10x maior que **3**, Figura 84a (verde), a corrente de pico da hidroxilamina decresce, devido à menor disponibilidade do grupo a processo redox. Os estudos utilizando etanol como co-solvente, Figura 84b, permitiram uma observação mais clara dos processos de redução da quinona e do nitro, Figura 84b (preto), porém, um comportamento distinto em relação aos nitroderivados **1** e **2** foi evidenciado.

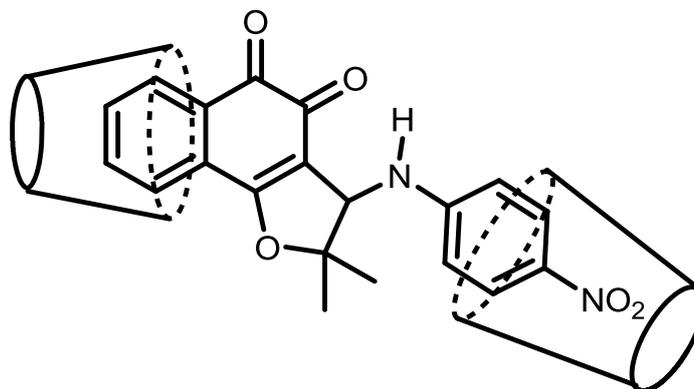
Figura 84. a: Voltamogramas Cíclicos de **3** ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) em diferentes concentrações de β -CD, (●) 0, (●) 0,01, (●) 0,1 e (●) 1 mmol L^{-1} , tampão fosfato pH 7,4. **b:** Voltamogramas Cíclicos de **3** ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) com adição de diferentes concentrações de β -CD, (●) 0, (●) 0,01, (●) 0,1 e (●) 1 mmol L^{-1} , tampão fosfato (pH 7,4) + EtOH (5%). Eletrodo de carbono vítreo, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2011.

As correntes de pico referentes aos processos de redução Ic e IIc, sofrem decréscimo quando a concentração de β -ciclodextrina é 10x menor, Figura 84b (vermelho), sendo este mais acentuado em IIc. Em concentração de β -CD igual e 10x maior que **3**, Figura 84b (azul e verde), as correntes de pico para estes dois processos praticamente desaparecem em consequência do maior encapsulamento do composto, com efeito protetor dos grupos eletroativos a processo redox. Assim, o provável complexo **3**- β -CD é proposto na Figura 85.

Figura 85. Estrutura proposta para o complexo de inclusão 3- β -CD.



Fonte: Autor, 2011.

Os estudos realizados em presença de β -CD, embora qualitativos, evidenciaram a formação de complexos de inclusão entre a *nor*- β -lapachona e nitroderivados com o oligossacarídeo. A partir destes resultados, foi observada a estabilização dos intermediários de redução do grupo nitro em **1** e **2**, um aspecto bastante relevante considerando que a atividade biológica deste grupo farmacofórico decorre dos vários intermediários gerados por biorredução. Nesse sentido, a formação de complexos de inclusão com β -CD constitui uma alternativa viável para aumentar a solubilidade desses compostos e, a preparação desses complexos poderá ser realizada, para assim avaliar as atividades biológicas.

4.9 Atividade Biológica e Comportamento Eletroquímico da *Nor*- β -lapachona e Nitroquinonas

As técnicas eletroquímicas são extensivamente utilizadas para esclarecer o mecanismo de ação de fármacos, proporcionando excelentes perspectivas sobre o modo de ação. A eletroquímica permite uma abordagem adequada para doenças associadas ao estresse oxidativo, como câncer, além de proporcionar o entendimento da interação entre fármacos anticancerígenos e o DNA, fornecendo informações sobre a extensão do dano ao DNA (Pelicano *et al.*, 2004; Rauf *et al.*; 2005). Nesse sentido, far-se-á uma correlação a cerca do comportamento eletroquímico apresentado pelos derivados nitrofenilamínicos da *nor*- β -lapachona com as atividades biológicas apresentadas, destacando o efeito do grupo nitro para a atividade biológica.

As atividades citotóxicas expressivas da *nor*- β -lapachona e seus derivados nitroquinonas foram apresentadas nas Tabelas 1 e 2 (pag. 67). Estes resultados são fruto de ensaios biológicos realizados com estes compostos, pelo grupo de pesquisa em farmacologia da Universidade Federal do Ceará, para avaliar a citotoxicidade e mecanismo de ação (Cavalcanti, 2010). O perfil antiproliferativo dos compostos foi analisado por método colorimétrico do MTT (células tumorais) e do Alamar Blue (CMSP). Após 72 horas de exposição, elevado potencial citotóxico foi observado para a *nor*- β -lapachona e seus derivados (**1**, **2** e **3**) (Da Silva Júnior *et al.*, 2007; Da Silva Júnior *et al.*, 2008; Da Silva Júnior *et al.*, 2010; Cavalcanti, 2010).

Os estudos demonstraram que os nitroderivados, em relação à *nor*- β -lapachona, não apresentaram aumento significativo da citotoxicidade sobre células tumorais. Contudo, a presença de grupo nitro nestas moléculas, contrariamente a *nor*- β -lapachona, promoveu uma mudança no mecanismo de ação, em que os derivados interagiram diretamente com o DNA, com dano conseqüente. Desta forma, foi observado que a citotoxicidade dos compostos está relacionada à geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), indução de quebra de fitas de DNA, interferência sobre os mecanismos de reparo das lesões no DNA e atividade das topoisomerasas I e II (Cavalcanti, 2010). Nesse sentido, um sumário de todos os parâmetros eletroquímicos em meio prótico (tampão acetato pH 4,5) e aprótico (DMF/TBABF₄), dados cinéticos, e reatividade com oxigênio, DNA e ssDNA são expressos na Tabela 9. Tanto os produtos de redução da *nor*- β -lapachona quanto de seus nitroderivados apresentaram reatividade com oxigênio com conseqüente geração de espécies reativas de oxigênio. Porém, nos estudos em biossensor de DNA, de modo semelhante aos ensaios biológicos, apenas os nitrocompostos foram DNA-reativos.

As análises eletroquímicas forneceram informações valiosas sobre a estabilidade dos produtos de redução das nitroquinonas. A partir de estudos cinéticos foram obtidas as taxas reacionais para o mecanismo de redução, associação com oxigênio e tempo de meia vida dos intermediários, Tabela 9. Adicionalmente o efeito nas correntes de pico relacionadas à oxidação das bases guanina (G) e adenina (A) no estudo em função da concentração dos compostos em ssDNA é representada, Tabela 9. Diante desses dados, é percebido que as

diferentes posições do grupo nitro influenciam as atividades biológicas, sendo observado outro mecanismo de ação, o dano ao DNA. Moléculas interagem diretamente com DNA de diversas formas: elas podem ligar-se ao ácido nucléico e inibir algumas das funções básicas das células, tais como replicação, transcrição, transdução de sinais e, podem bloquear interação de DNA com proteínas específicas ou impedir que o DNA adote conformações necessárias para função biológica. O dano ao DNA causado por ligações entre moléculas pequenas com as bases de DNA é freqüentemente investigado através de biossensores de DNA, cujo fundamento do método é baseado na resposta eletroquímica das bases de DNA (Vyskocil *et al.*, 2010).

Considerando os potenciais de redução listados na Tabela 9, é percebido que a presença do grupo nitro, eletroatraente, embora não esteja em conjugação com a quinona, facilita a redução desta por efeitos indutivos. Nestes derivados, é observada também a possibilidade de formação de ligação de hidrogênio intramolecular. Efeitos estereoeletrônicos são observados para o composto *orto* (**1**), característica que resulta em duas possibilidades de ligação de hidrogênio intramolecular, que pode acentuar o caráter eletrofilico da quinona.

A literatura apresenta uma variedade de trabalhos relacionados ao estudo de nitroaromáticos com atividade tripanossomicida (Argüello *et al.*, 2006; Catalán *et al.*; 2010; Squella *et al.*; 2005; Aravena *et al.*; 2005). Com o intuito de obter informações relativas ao mecanismo de ação destes compostos, os estudos são voltados à análise da estabilidade dos intermediários de redução do grupo nitro, caracterizando o mecanismo de redução eletroquímica e assim, as reações as quais estes intermediários são suscetíveis, além de análises da interação com importantes alvos biológicos, como glutatona e DNA, e análises por espectroeletroquímica são realizadas para confirmar a presença de espécies radiculares no meio reacional.

Tabela 9. Parâmetros eletroquímicos relacionados ao mecanismo de redução da *nor*- β -lapachona e seus derivados. Parâmetros cinéticos, reatividade com oxigênio e com DNA, obtidos por métodos eletroquímicos e, percentagem de decréscimo das correntes de pico referentes à oxidação das bases guanina (G) e adenina (A) do ssDNA.

Compostos	- * E_{pic} (V) aprótico	- * $E_{pl'c}$ (V) aprótico	- * E_{pllc} (V) aprótico	- * E_{plllc} (V) aprótico	+ * E_{pa1} (V) aprótico	- * E_{pic} (V) prótico	- * E_{pllc} (V) prótico	K_2 (mol ⁻¹ Ls ⁻¹)	$t_{1/2}$ (s-1)	$K_{ap(O_2)}$ (s ⁻¹)	Interação com DNA	% G (6,97 μ A)	% A (10,02 μ A)
Nor-β- lapachona	0,687	————	- 1,110	————	————	- 0,182	————	————	————	0,55	Negativo	————	————
1 (orto)	0,655	1,132	1,279	2,163	1,130	0,173	0,809	1,420 x 10 ³	0,36	0,20	Positivo	27 %	16 %
2 (meta)	0,659	1,088	1,279	2,038	9,700	0,256	0,826	15,188 x 10 ³	0,06	0,72	Positivo	30%	24%
3 (para)	0,676	1,148	1,450	2,245	1,060	0,336	1,08	5,495 x 10 ³	0,18	0,27	Positivo	28%	21%

* Potenciais de pico em eletrodo de carbono vítreo.

k_2 : Constante de decaimento do ânion radical por desproporcionamento (determinada a partir de estudos em eletrodo de Hg).

$t_{1/2}$: tempo de meia-vida do ânion radical (calculado a partir de estudos em eletrodo de Hg).

$K_{ap(O_2)}$: constante de reatividade com oxigênio (determinada a partir de estudos em eletrodo de carbono vítreo).

% G: Decréscimo da corrente de oxidação da base guanina (estudo em eletrodo de carbono vítreo).

% A: Decréscimo da corrente de oxidação da base adenina (estudo em eletrodo de carbono vítreo).

Fonte: Autor, 2011.

No presente estudo, como já mencionado, a nitroquinona **3**, apresentou um comportamento mais nítido para o processo I_{lc} (-1,223 V), com características de irreversibilidade, sendo possivelmente relacionada ao diânion quinônico ou, à própria quinona, uma vez que o mecanismo de desproporcionamento foi confirmado e os estudos por espectroeletróquímica evidenciaram a formação dos ânions radicais semiquinona e nitro nos primeiro e terceiro processos redox, respectivamente.

As nitroquinonas **1** e **2** apresentaram um ombro catódico (~ I_c - 1,0 V) intermediário entre o primeiro e o segundo picos de redução. Como os estudos em espectroeletróquímica confirmaram que as ondas I_c e I_{lc}, com características de reversibilidade, referem-se aos ânions radicais semiquinona e nitro, respectivamente, este também deve referir-se ao diânion quinônico ou a redução da quinona regenerada por desproporcionamento. Contudo, ressalta-se que os estudos por espectroeletróquímica de **2** foram realizados em momento anterior (Hernández *et al.*, 2008), com evidências de formação do ânion radical nitro no segundo processo de redução. Assim, a presença do ânion radical nitro é observada no processo I_{lc}, tanto para o derivado **1** quanto para **2**, situado em mesmo potencial de redução (- 1,279 V), Tabela 9, enquanto que para **3**, este intermediário é gerado em potencial mais catódico, -2,022 V, vs. Ag|AgCl|Cl⁻.

Os estudos em eletrodo de mercúrio permitiram quantificar a estabilidade dos produtos de redução, para primeira onda, das nitroquinonas. O decaimento do ânion radical semiquinona se dá por desproporcionamento em taxas elevadas, obedecendo à seguinte ordem: QPh-*m*-NO₂ > QPh-*p*-NO₂ > QPh-*o*-NO₂, Tabela 9, com menor tempo de meia-vida relacionado à maior constante *k*, portanto, referente ao composto **2**.

Elevadas taxas de decaimento para os ânions radicais podem ser vantajosas devido ao menor tempo de permanência no organismo, após efeito desejado, e conseqüentemente menor possibilidade de toxicidade (Argüello *et al.*, 2006).

A reatividade com oxigênio foi observada e, conseqüentemente, a geração de ERO, reforçando os ensaios biológicos que revelaram a indução da morte celular por apoptose. É bem conhecido que o grupo quinona pode gerar espécies reativas de oxigênio e, que estas podem induzir dano ao DNA (Kim *et al.*, 2005; Mizutani *et al.*, 2005). Além do DNA, EROs podem atacar outros alvos celulares, como proteínas e lipídios (Figura 1, pag. 33). Assim, de acordo com as constantes de associação entre os produtos da redução da *nor*-β-lapachona e nitroderivados **1**, **2** e **3** e

oxigênio, Tabela 9, a seguinte ordem de reatividade foi observada: (2) QPh-*m*-NO₂ > *nor*-β-lapachona > (3) QPh-*p*-NO₂ > (1) QPh-*o*-NO₂. Desta forma, maior habilidade em gerar espécies reativas de oxigênio é atribuída à 2 e à *nor*-β-lapachona. Porém, estes valores não são discrepantes e, portanto, a capacidade de gerar o estresse oxidativo, morte celular por apoptose, é atribuída à *nor*-β-lapachona e seus nitroderivados, de acordo com ensaios biológicos realizados para estes compostos.

Contudo, a fragmentação do DNA, observado nos estudos pelo teste do cometa, foi corroborada a partir dos ensaios eletroquímicos em biossensor de DNA. Contrariamente a *nor*-β-lapachona, as nitroquinonas causaram tanto dano direto ao DNA, bem como os seus produtos de redução. Para o composto 1, foi observado um pico de oxidação em +0,35 V, após a redução dos grupos eletroativos, que de acordo com estudos da literatura para o nitrocomposto niclosamida em biossensor de dsDNA (De Abreu *et al.*, 2002) pode estar relacionado à 8-oxoguanina, produto da oxidação da guanina, conferindo maior reatividade para este derivado frente ao DNA.

Adicionalmente, utilizando a metodologia de ssDNA (DNA em fita simples), foi confirmada a interação com o DNA. De acordo com os dados da Tabela 9, as nitroquinonas promoveram acentuado decréscimo (entre 25-30%) nas correntes de oxidação da base guanina em concentração na ordem de 10 μM, o que não foi observado para a *nor*-β-lapachona mesmo em concentração de 100 μM. Efeito similar também foi observado para a onda de oxidação da adenina. Diante desse comportamento, é comprovada a possibilidade de formação de adutos com DNA a partir das nitroquinonas ou, o dano ao DNA pelos produtos de biorredução das mesmas. É bem relatada que devido às suas características eletrofílicas, quinonas são aceptores de Michael, apresentando então alta afinidade por biomoléculas (Asche *et al.*, 2005). Assim, esta característica pode ter sido acentuada pela presença do grupo nitro.

Contudo, embora o mecanismo adicional observado para as nitroquinonas, o dano direto ao DNA, tais atividades são resultado de um efeito sinérgico dos dois grupos funcionais. Esta consideração é subsidiada pelas análises realizadas com nitroanilinas precursoras, Tabela 10, frente às células tumorais, com atividade inexpressiva.

Tabela 10. Determinação dos valores de CI_{50} para as nitroanilinas precursoras.

Linhagens celulares - CI_{50} - $\mu\text{g/mL}$ (IC95%)			
Amostras	HCT8	MDA-MB435	SF295
<i>Para</i> -Nitroanilina	>25	>25	>25
<i>Meta</i> - Nitroanilina	>25	>25	>25
<i>Orto</i> - Nitroanilina	>25	>25	>25

Células: MDA-MB435 (melanoma - humano), HCT-8 (cólón - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano).

Fonte: Autor, 2011.

As amostras foram testadas em concentrações que variaram de 0,333 a 173 $\mu\text{g/mL}$. Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos intervalos de confiança, a partir da regressão não linear no programa *GraphPad Prism*. Cada amostra foi testada em triplicata em dois experimentos independentes. Nenhuma das amostras apresentou citotoxicidade para as células tumorais em uma concentração de até 173 $\mu\text{g/mL}$.

Desta forma, a síntese de composto de funcionalidade mista é uma alternativa viável no desenvolvimento de fármacos com maior potencial terapêutico. O grupo quinona, presente em todos os compostos estudados, confere a habilidade de geração de espécies reativas de oxigênio e conseqüente estresse oxidativo, mecanismo observado em células com alta concentração de oxigênio, resultado em morte celular por apoptose. Por outro lado, o dano direto ao DNA conseqüente da presença do grupo nitro é de extrema relevância no tratamento de células cancerosas com limitada concentração de oxigênio.

Outra característica importante que merece destaque é a atividade tripanossomicida observada para as nitroquinonas **1** e **2**, Tabela 2 (pag. 67), que superou o benznidazol, nitrocomposto atualmente aceito para o tratamento da Doença de Chagas (Da Silva *et al.*, 2010). Esta atividade reforça o efeito da presença do grupo nitro nestas moléculas sobre a atividade tripanossomicida, dependente de biorredução a vários intermediários citotóxicos, como o ânion radical nitro, nitroso e hidroxilamina.

Os estudos por espectroeletrólquímica confirmaram a geração dos ânions radicais semiquinona e nitro no processo de redução das nitroquinonas e, como já mencionado, essa característica é relevante do ponto de vista biológica, haja vista a capacidade de ciclagem redox inerente às quinonas e aos nitrocompostos que pode repercutir numa profusão de espécies reativas na célula.

5 CONCLUSÕES

Os estudos eletroquímicos das nitroquinonas em meio prótico e meio aprótico, permitiram observar que a redução das mesmas ocorre através de um mecanismo de redução típico de quinonas e nitroaromáticos.

As análises eletroquímicas utilizando eletrodo de mercúrio permitiram a obtenção de parâmetros importantes para caracterização da estabilidade dos produtos de redução das nitroquinonas ((**1**) QPh-*o*-NO₂ > (**3**) QPh-*p*-NO₂ > (**2**) QPh-*m*-NO₂), sendo confirmando o mecanismo EC, reação química acoplada ao processo eletroquímico de transferência de elétrons.

Diante do perfil redox distinto apresentado pelas nitroquinonas em relação ao composto precursor, *nor*-β-lapachona, os estudos polarográficos se mostraram relevantes para caracterização do mecanismo eletródico, sendo confirmada a geração do ânion radical semiquinona em primeiro processo redox.

Os estudos por EPR (ressonância do spin do elétron) permitiram caracterizar o processo redox das nitroquinonas, sendo o primeiro processo redox relacionado ao ânion radical semiquinona, enquanto que o ânion radical nitro é formado no terceiro processo redução, para **3**, enquanto que nas nitroquinonas **1** e **2**, este intermediário é gerado no segundo processo redox. Estes intermediários estão diretamente relacionados às atividades biológicas destes compostos, como relatado na literatura.

A segunda onda de redução observada para o composto **3**, ou ombro catódico intermediário para os compostos **1** e **2**, deve estar relacionada a redução da semiquinona ao diânion correspondente ou, diante da presença de reação química acoplada ao processo eletroquímico, a redução da quinona regenerada por desproporcionamento.

Estudos eletroquímicos realizados para a *nor*-β-lapachona e nitroderivados evidenciaram que seus produtos da redução interagem com oxigênio, o que dá suporte para mecanismo biológico de ação destes compostos, sendo relacionado à geração de estresse oxidativo (EO).

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.

A interação direta e após redução das nitroquinonas foi observada nos estudos com biossensor eletroquímico de DNA, apontando um novo caminho para as atividades biológicas.

Diante do caráter lipofílico das nitroquinonas, o aumento da solubilidade das mesmas em meio aquoso através da formação de complexo de inclusão com β -ciclodextrina abre um leque para o preparo destes complexos para avaliação das atividades biológicas *in vivo*.

PERSPECTIVAS

Realizar estudo quantitativo para avaliar a interação da *nor*- β -lapachona e seus derivados nitroquinonas com β -ciclodextrina e assim, determinar as constantes de associação entre as mesmas, por métodos eletroquímicos e espectroscópicos.

Preparar complexos de inclusão entre *nor*- β -lapachona e nitroquinonas para análises por ressonância magnética nuclear (RMN) com objetivo de caracterizar o mecanismo de encapsulamento, bem para posteriores ensaios biológicos, *in vivo*.

Analisar a reatividade dos complexos com dsDNA, ssDNA e glutathiona.

REFERÊNCIAS

- ALEGRÍA, A. E.; SANCHEZ-CRUZ, P.; RIVAS, L.; Alkaline-earth cations enhance *ortho*-quinone catalyzed ascorbate oxidation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 37, p. 1631-1639, 2004.
- ALMEIDA, V. L., *et al.*; Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim. Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.
- ARAVENA, C. M., *et al.*; Potent 5-nitrofurán derivatives inhibitors of *Trypanosoma Cruzi* growth: electrochemical, spectroscopic and biological studies." **Spectrochimica Acta**, Parte A, v. 79, p. 312-319, 2011.
- ARGÜELLO, J., *et al.*; Nitro radical anion formation from nitrofuryl substituted 1,4-dihydropyridine derivatives in mixed and non-aqueous media. **Bioelectrochem.**, v. 69, p. 104-112, 2006.
- ASCHE, C., *et al.*; Synthesis, antitumour activity and structure–activity relationships of 5H-benzo[b]carbazoles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 819-837, 2005.
- BABULA, P., *et al.*; Noteworthy secondary metabolites naphthoquinones – their occurrence, pharmacological properties and analysis." **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 5, p. 47-68, 2009.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R.: **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**, J. Wiley, New York, 1990.
- BARETY, *et al.*; Electrochemical behaviour of nitroimidazole derivatives in dimethylsulphoxid." **J. Electroanal. Chem.**, v. 162, p. 335-341, 1984.
- BENIGNI, R.; BOSSA, C.; Mechanisms of chemical carcinogenicity and mutagenicity: a review with Implications for Predictive Toxicology. **Chem. Rev.**, v. 111, p. 2507-2536, 2011.
- BERNARDO, P. H., *et al.*; Synthesis, electrochemistry, and bioactivity of the cyanobacterial calothrixins and related quinones. **J. Med. Chem.**, v. 47, p. 4958-4963, 2004.
- BÉRUBÉ, L. R., *et al.*; Use of a high frequency ultrasound microscope to image the action of 2-nitroimidazoles in multicellular spheroids. **Biochem. Pharmacol.**, v. 42, p. 2153-2161, 1991.
- BOLLO, S., *et al.*, Electrochemical Study of 4-Substituted Analogues of Megazol. **Electroanalysis**, v. 17, p. 134-139, 2005.
- BOLLO, S., *et al.*, The effect of 5-substitution on the electrochemical behavior and antitubercular activity of PA-824. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p. 812-817, 2011.

BOLTON, J. L., *et al.*; Role of quinones in toxicology. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 13, p. 135-160, 2000.

BORDWELL, F. G.; ALGRIM, D.; VANIER, N. R.; Acidities of anilines and toluenes. **J. Org. Chem.**, v. 42, p. 1817-1819, 1977.

BRETT, A. M. O., *et al.*, Voltammetric behaviour of mitoxantrone at a DNA-biosensor." **Biosensors & Bioelectronics**, v. 13, p. 861-867, 1998.

BRETT, A. M. O.; *et al.*, In Comprehensive chemical kinetics, **Elsevier: Amsterdam**, v. 37, p. 91-119, 1999.

BRETT, A. M.; *et al.*, Electrochemical detection of in situ adriamycin oxidative damage to DNA. **Talanta**, v. 56, p. 959-970, 2002.

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. **Electrochem. Commun.**, v. 5, p. 178-183, 2003.

BRETT, A. M.; GOULART, M. O. F.; DE ABREU F. C.: Reduction of lapachones and their reaction with L-cysteine and mercaptoethanol on glassy carbon electrodes." **Bioelectrochemistry**, v. 56, p. 53-55, 2002.

BRETT, A. M. O.; *et al.*, Comparison of the voltammetric behavior of metronidazole et a DNA-modified glassy carbon electrode, a mercury thin film electrode and a glassy carbon electrode. **Electroanal.**, v. 9, 110-114, 1997.

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

BREZDEN, C. B.; MCCLELLAND, R. A.; RAUTH. A. M.; Mechanism of the selective hypoxic cytotoxicity of 1-methyl-2-nitroimidazole. **Biochem. Pharmacol.**, v. 48, p. 361-370, 1994.

BUDAL, R.M. "**Estudos de formação de complexos de inclusão em ciclodextrinas.**" Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

CHIORCEA-PAQUIM, A. M.; *et al.*, Electrochemical and AFM evaluation of hazard compounds–DNA interaction. **Electrochimica Acta**, v. 54, p.1978-1985, 2009.

CARBAJO, J.; *et al.*, Cyclic voltammetric study of the disproportionation reaction of the nitro radical anion from 4-nitroimidazole in protic media. **J. Electroanal. Chem.**, v. 531, p. 187-194, 2002.

CAVALCANTI, B. C.; "**Avaliação *in vitro* do potencial citotóxico de derivados arilaminados *nor-β-lapachônicos*: Estudos de mecanismos de ação.**" Tese de Doutorado, Universidade Federal do Ceará, 2008.

COLÓN, I. G.; *et al.*, Role of the nitro functionality in the DNA binding of 3-nitro-10-methylbenzothiazolo[3,2-a]quinolinium chloride. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 21, p.1706-1715, 2008.

CONSTATINO, M. G., Química Orgânica, **LTC**, 1ª Ed.; p. 1, 2008.

CRAWFORD, P. W.; *et al.*, The electrochemistry of antineoplastic furanquinones: electrochemical properties of benzo[b]naphtho[2,3-d]furan-6,11-dione derivatives." **Electrochimica Acta**, v. 41, p. 2399-2403, 1996.

DANG, X. J.; *et al.*, Inclusion of the parent molecules of some drugs with β -cyclodextrin studied by electrochemical and spectrometric methods. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 448, p. 61-67, 1998.

DA SILVA JÚNIOR, E. N.; *et al.*, Synthesis and anti-Trypanosoma cruzi activity of derivatives from nor-lapachones and lapachones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 5030-5038, 2008.

DA SILVA JÚNIOR, E. N.; *et al.*, The evaluation of quinonoid compounds against Trypanosoma cruzi: Synthesis of imidazolic anthraquinones, nor-b-lapachone derivatives and β -lapachone-based 1,2,3-triazoles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 3224-3230, 2010.

DE ABREU, F. C.; *et al.*, Cathodic reduction of 2-nitronaphthothiophen-4,9-quinone: evidence of catalysis by proton donors and its simulation. **J. Electroanal. Chem.**, v. 462, p. 195-201, 1999.

DE ABREU, F. C.; FERRAZ, P. A. L.; GOULART, M. O. F.; Some applications of electrochemistry in biomedical chemistry. Emphasis on the correlation electrochemical and bioactive properties. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, v. 13, p. 19-35, 2002.

DE ABREU, F. C.; GOULART, M. O. F.; BRETT, A. M. O.; Reduction of lapachones in aqueous media at a glassy carbon electrode. **Electroanal.**, v.14, p. 29-34, 2002.

DE ABREU, F. C.; GOULART, M. O. F.; BRETT, A. M.: Detection of the damage caused to DNA by niclosamide using an electrochemical DNA-biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, p. 913-919, 2002.

DE ABREU, F. C.; LOPES, A. C. O.; GOULART, M. O. F.: Influence of the leaving group and of the annelation in the electroreduction of 2-methyl-substituted quinines. **J. Electroanal. Chem.**, v. 562, p. 53-59, 2004.

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. **J. Electroanal. Chem.**, v. 608, p. 125-132, 2007.

DE ABREU, F. C.; *et al.*, The application of DNA-biosensors and differential scanning calorimetry to the study of the DNA-binding agent berenil. **Sensors**, v. 8, p.1519-1538, 2008.

DE ABREU, F. C.; *et al.*, **Química Medicinal: Métodos e Fundamentos em Planejamento de Fármacos**, edusp, cap. 6, 2011.

DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ, P.; *et al.*, Electrochemistry of Nucleic Acids at Solid Electrodes and Its Applications. **Electroanalysis**, v. 16, p. 1193-1204, 2004.

DE MOURA, M.A.B.F. **Atividade antitumoral de nitroquinona derivada da nor- β -lapachona. Contribuição da farmacoeletoquímica na pesquisa de mecanismo de ação de novos fármacos**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Alagoas, 2008.

DICULESCU, V. C.; PAQUIM, A. M. C.; BRETT, A. M. O.; Electrochemical DNA sensors for detection of DNA damage. **Sensors**, v. 5, 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.

DRYHURST, G.; Electrochemistry of biological molecules. **Academic Press**, New York, 1997.

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

FERNÁNDEZ-CHECA, J. C., Redox regulation and signaling lipids in mitochondrial apoptosis. **Biochem. Bioph. Res. Commun.**, v. 304, p. 471–479, 2003.

FISHER, A.; *et al.*, Quinone Electrophiles Selectively Adduct “Electrophile Binding Motifs” within Cytochrome c. **Biochemistry**, v. 46, p.11090-11100, 2007.

FLEURY, C.; MIGNOTTE, B.; VAYSSIÈRE, J. L.; Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. **Biochimie**, v. 84., p. 131–141, 2002.

FOLCH-CANOVA, C.; *et al.*, ESR and electrochemical study of 1,2-disubstituted 5-nitroindazolin-3-ones and 2-substituted 3-alkoxy-5-nitro-2H-indazoles: Reactivity and free radical production capacity in the presence of biological systems. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 75, p. 375-380, 2010.

FOSTER, I.; Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**, v. 14, p. 144–149, 2008.

GÁL, M.; *et al.*, Voltammetry of hypoxic cells radiosensitizer etanidazole radical anion in water. **Bioelectrochemistry**, v. 78, p. 118-123, 2010.

GARRIDO, J. M. P. J.; *et al.*, An Electrochemical outlook on tamoxifen biotransformation: current and future prospects. **Current Drug Metabolism**, v. 12, 372-382, 2011.

GIULIVI, C.; CADENAS, E.; One- and two-electron reduction of 2-methyl-1,4-naphthoquinone bioreductive alkylating agents: kinetic studies, free-radical production, thiol oxidation and DNA-strand-break formation. **Biochem. J.**, v. 301, p. 21-30, 1994.

GOLDBERG, I. R.; MCKINNEY, T. M.: Principles and Techniques of Electrochemical-Electron Spin Resonance Experiments. In Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, Kissinger, P. T., Heineman, W. R., eds. **Marcel Dekker**: New York, 2 ed., 675, 1996.

GONZÁLEZ, I.; FRONTANA, C.; Effects of the molecular structure on the electrochemical properties of naturally occurring α -hydroxyquinones. An electrochemical and ESR study. **J. Electroan. Chem.**, v. 603, p. 155-165, 2007.

GORODETSKY, A. A.; BUZZEO, M. C.; BARTON, J. K.; DNA-Mediated Electrochemistry. **Bioconjugate Chem.**, v. 19, p. 2286-2296, 2008.

GOULART, M. O. F.; *et al.*, Electroanalytical aspects of biological significance compounds., v. 2, p.1-32, 2006.

GOULART, M. O. F. ; *et al.*, Electrochemical study of methyl 2-[p-nitrophenyl(hydroxy)methyl]acrylate, an anticancer drug and its reactivity towards GSH and oxygen. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 154, p. 121-129, 2007.

GUPTA, D.; *etal.*, β -lapachone, a novel plant product, overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. **Experimental Hematology**, v. 30, p. 711-720, 2002.

GUTIERREZ, P. I.; The role of nad(p)h oxidoreductase (dt-diaphorase) in the Bioactivation of quinone-containing antitumor agents: A review. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, p. 263-275, 2000.

HEIMBROOK, D. C.; SHYAM, K.; SARTORELLI, A. C.; Novel 1-haloalkyl-2-nitroimidazole bioreductive alkylating agents. **Anti-Canc. Drug Des.**, v. 2, p. 339-350, 1988.

HELI, H.; BATHAIE S. Z.; MOUSAVI, M. F.; An electrochemical study of neutral red-DNA interaction. **Electrochimica Acta**, v. 51, p.1108-1116, 2005.

HERNÁNDEZ, M., *et al.*, Inner reorganization during the radical-biradical transition in a nor-b-lapachone derivative possessing two redox centers. **Org. Biomol. Chem.**, v. 6, p. 3414-3420, 2008.

HERNÁNDEZ-MUÑOZ, L. S.; *et al.*, Revisiting the electrochemical formation, stability and structure of radical and biradical anionic structures in dinitrobenzenes. **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 8325-8335, 2010.

HILLARD, E. A., *et al.*, Electrochemical parametrs and techniques in drug development, with an emphasis on quinonoes and related compounds. **Chem. Commun.**, p. 2612-2628, 2008.

JAFFAR, M.; WILLIAMS, K. J.; STRATFORD, I. J.; Bioreductive and gene therapy approaches to hypoxic diseases. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 53, p. 217-228, 2001.

JOMOVA, K.; VALKO, M.; Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**, v. 283, p. 65–87, 2011.

KELSON, B.; *et al.*, 1,2,4-Benzotriazine 1,4-dioxides. An important class hypoxic cytotoxins with antitumor activity. **Anti-Canc. Drug Des.**, v. 13, p. 575-592, 1998.

KIM, B. C.; *et al.*, Genipin-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by reactive oxygen species/c-Jun NH2-terminal kinase-dependent activation of mitochondrial pathway. **Biochemical Pharmacology**, v. 70, p. 1398-1407, 2005.

KOVACIC, P.; OSUNA JR., J. A. Mechanisms of Anti-Cancer Agents: Emphais on Oxidative Stress an Electron Transfer. **Curr. Pharm. Des.**, v. 6, p. 277-309, 2000.

KOVACIC, P. Unifying mechanism for anticancer agents involving electron transfer and oxidative stress: Clinical implications. **Medical Hypotheses**, v. 69, p. 510-516, 2007.

LA-SCALEA, M. A., *et al.*, Voltammetric behavior of nitrofurazone and its hydroxymethyl prodrug with potential anti-Chagas activity. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 16, p. 774-782, 2005.

LA-SCALEA, M. A., *et al.*, Voltammetric behavior of benznidazole at a DNA-electrochemical biosensor. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 29, p. 561-568, 2002.

LEE, J. H., *et al.*, Down-regulation of cyclooxygenase-2 and telomerase activity by β -lapachone in human prostate carcinoma cells. **Pharmacological Research**, v. 51, p. 553–560, 2005.

LEE, K.; TURBULL, P.; MOORE, H. W.; Concerning the Mechanism of the Hooker Oxidation. **J. Org. Chem.**, v. 60,p. 461-464, 1995.

LUND, H., *Organic Electrochemistry*, 4th. Ed., Lund and O. Hammerich, Editors, p. 389, **Marcel Dekker**, New York (2001).

MATÉS, J. M.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F. M.; Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 32, p. 157-170, 2000.

MAYA, J. D., *et al.*, Trypanosoma cruzi: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurán derivatives. **Biochem. Pharm.**, v. 65, p. 999-1006, 2003.

MERIC, B., *et al.*, Electrochemical biosensor for the interaction of DNA with the alkylating agent 4,4'-dihydroxy chalcone based on guanine and adenine signals. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 30, p. 1339-1346, 2002.

MILLER, C., *et al.*, Revisiting the Interaction of the Radical Anion Metabolite of Nitrofurantoin with Glutathione. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 397, p. 113-118, 2002.

MIZUTANI, H., *et al.*, Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. **Life Sciences**, v. 76, p.1439-1453, 2005.

MONGE, A., *et al.*, Hypoxia-selective agents derived from quinoxaline 1,4-di-N-oxides. **J. Med. Chem.** V. 38, p. 1786-1792, 1995.

MORALES-MORALES, J. A., *et al.*, Analysis of the substituent effect on the reactivity modulation during self-protonation processes in 2-nitrophenols. **J. Phys. Chem.** v. 111, p. 8993-9002, 2007.

MORENO, E., *et al.*, 1,4-Di-N-oxide quinoxaline-2-carboxamide: cyclic voltammetry and relationship between electrochemical behavior, structure and anti-tuberculosis activity. **Electrochimica Acta**, v. 56, p. 3270-3275, 2011.

MOSMANN, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological methods**, v. 16, p. 55-56, 1983.

MOURITS, M.J.E., *et al.*, Tamoxifen treatment and gynecologic side effects: a review. **Obstetrics & Gynecology**, v. 97, p. 855-866, 2001.

NAUGHTON, D. P.; Drug targeting to hypoxic tissue using self-inactivating bioreductive delivery systems. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 53, p. 229-233, 2001.

NICHOLSON, R.S.; "Theory of Stationary Electrode Polarography. **Anal. Chem.**, v. 36, p. 702-723, 1964.

NOWICKA, B.; KRUK, J., Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinines. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1797, p. 1587-1605, 2010.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J., Agentes antineoplásicos biorredutíveis: Uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Quim. Nova**, v. 25, p. 976-984, 2002.

OLMSTEAD, M. L.; NICHOLSON, R. S.; Cyclic voltammetry theory for the disproportionation reaction and spherical diffusion. **Anal. Chem.**, v. 41, p. 862-864, 1969.

OLMSTEAD, M. L.; HAMILTON, R. G.; NICHOLSON, R. S.; Theory of cyclic voltammetry for a dimerization initiated electrochemically. **Anal. Chem.**, v. 41, p. 260-267, 1969.

OZTEKINA, Y., *et al.*, Electrochemical modification of glassy carbon electrode by poly-4-nitroaniline and its application for determination of copper(II). **Electrochimica Acta**, v. 56, p. 387-395, 2010.

PAULA, F. R.; SERRANO, S. H. P.; TAVARES, L. C.; Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Quim. Nova**, v. 32, p. 1013-1020, 2009.

PELICANO, H.; CARNEY, D.; HAUNG, P.; ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. **Drug Resistance Updates**, v. 7, p. 97-110, 2004.

PLYTA, F., *et al.*, Inhibition of topoisomerase I by naphthoquinone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 8, p. 3385-3390, 1998.

RAJ, C. R.; RAMARAJ, R.; Electrochemistry and photoelectrochemistry of phenothiazine dye- α -cyclodextrin inclusion complexes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 405, p. 141-147, 1996.

RAJSKI, S. R.; WILLIAMS, R. M.; DNA Cross-Linking Agents as Antitumor Drugs. **Chem. Rev.**, v. 98, p. 2723-2796, 1998.

RAUF, S., *iet al.*, Electrochemical approach of anticancer drugs-DNA interaction. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 7, p. 205-217, 2005.

ROSS, D., *et al.*, NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. **Chemico-Biological Interactions**, v. 129, p. 77-97, 2000.

SALAS, M., *et al.*, Electrochemical reduction of 1,4-benzoquinone. Interaction with alkylated thymine and adenine nucleobases. **J. Electroan. Chem.**, v. 543, p. 73-81, 2003.

SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R., Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 30, p. 1191-1212, 2001.

SÉQUARIS, J. M.; VALENTA, P.; AC voltammetry: a control method for the damage to DNA caused in vitro by alkylating mutagens. **J. Electroanal. Chem.**, v. 227, p. 11-20, 1987.

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

SMITH, M. B.; MARCH, J., Organic Chemistry, **John Wiley**, 6 ed., 1-2384, 2007.

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

SOUZA, A. A., *et al.*, Electrochemical study, on mercury, of a *meta*-nitroarylamine derivative of nor- β -lapachone, an antitumor and trypanocidal compound. **Quim. Nova**, v. 33, p. 2075-2079, 2010.

SPANSWICK, V. J.; CUMMINGS, J.; SMYTH, J. F.; Enzymology of mitomycin C metabolic activation in tumour tissue. **Biochemical Pharmacology**, v. 51, p. 1623-1630, 1996.

SQUELLA, J. A.; BOLLO, S.; NÚÑEZ-VERGARA, L. J.; Recent Developments In the Electrochemistry of some Nitro Compounds of Biological Significance. **Curr. Org. Chem.** v. 9, p. 565-581, 2005.

STECKHAN, E. In *Organic Electrochemistry*; Lund, H., Baizer, M., Eds., 3^a ed edition, **Marcel Dekker: New York**, p. 582, 1991.

TOCHER, J. H.; Reductive activation of nitroheterocyclic compound. **Gen. Pharmac.**, v. 28, p. 485-487, 1997.

VALDERRAMA, J. A, *et al.*, Studies on quinones. Part 39: Synthesis and leishmanicidal activity of acylchloroquinones and hydroquinones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 4153-4159, 2005.

VALDERRAMA, J. A., *et al.*, Studies on quinones. Part 43: Synthesis and cytotoxic evaluation of polyoxyethylene-containing 1,4-naphthoquinones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 3687-3693, 2008.

VALDERRAMA, J. A., *et al.*, Studies on quinones. Part 45: Novel 7-aminoisoquinoline-5,8-quinone derivatives with antitumor properties on cancer cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 2894-2901, 2009.

VALKO, M., *et al.*, Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 266, p. 37-56, 2004.

VALKO, M.; *et al.*, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Biol. Interac.**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VALKO, M., *et al.*, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VALLE-BOURROUETA, G, *et al.*, Magnetic interactions as a stabilizing factor of semiquinone species of lawsone by metal complexation. **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 9042-9050, 2010.

VASCONCELOS, S. M. L., *et al.*, Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes de marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**, v. 30, p. 1323-1338, 2007.

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

VYSCOIL, V.; LABUDA, J.; BAREK, J.: Voltammetric detection of damage to DNA caused by nitro derivatives of fluorene using an electrochemical DNA biosensor. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 397, p. 233-241, 2010.

WANG, J., *et al.*, Interactions of antitumor drug daunomycin with DNA in solution and at the surface. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, p. 33-40, 1998.

WANG, J.; CAI, Z.; Incorporation of the antibacterial agent, miconazole nitrate into a cellulosic fabric grafted with β -cyclodextrin. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, p. 695-700, 2008.

WARDMAN, P.; Electron transfer na oxidative stress as key factors in the design of drugs selectively active in hypoxia. **Curr. Chem.**, v. 8 , p. 739-761, 2001.

WEMPE, M. F., *et al.*, Pharmacokinetics of raloxifene in male Wistar–Hannover rats: Influence of complexation with hydroxybutenyl-beta-cyclodextrin International. **Journal of Pharmaceutics**, v. 346, p. 25-37, 2008.

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

YANG, Z., *et al.*, Electrochemical behavior of gallic acid interaction with DNA and detection of damage to DNA. **Journal Electroanal. Chem.**, v. 624, p. 91-96, 2008.

YAU, C. M. H.; CHAN, H. L.; YANG, M.; Electrochemical properties of DNA-intercalating doxorubicin and methylene blue on n-hexadecyl mercaptan-doped 5'-thiol-labeled DNA-modified gold electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, p. 873-879, 2003.