

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

EMANUELLA GOMES DA SILVA

**ESTUDO DA REATIVIDADE AO DNA DE DERIVADOS FERROCÊNICOS,
UTILIZANDO TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS E ESPECTROSCÓPICAS**

Maceió

2014

EMANUELLA GOMES DA SILVA

**ESTUDO DA REATIVIDADE AO DNA DE DERIVADOS FERROCÊNICOS,
UTILIZANDO TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS E ESPECTROSCÓPICAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

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

Maceió

2014

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico Bibliotecária
Bibliotecária Responsável: Maria Helena Mendes Lessa

S586e Silva, Emanuella Gomes da.
Estudo da reatividade ao DNA de derivados ferrocênicos, utilizando técnicas eletroquímicas e espectroscópicas / Emanuella Gomes da Silva. – Maceió, 2014.
106 f. : il.

Orientadora: Marília Oliveira Fonseca Goulart.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alagoas. Escola de Enfermagem e Farmácia. Maceió, 2014.

Bibliografia: f. 89-98.
Glossário: f. 99.
Anexos: f. 100-106.

1. CT-DNA - Farmácia. 2. Derivados ferrocênicos. 3. Reatividade – CT-DNA.
4. Biosensor de dsDNA. 5. Espectroscopia. I. Título.

CDU: 615.012



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Ata do Exame de Defesa de Dissertação
Emanuella Gomes da Silva

Aos **dezoito dias** do mês de **dezembro** de **2014**, às quatorze horas, reuniu-se na Sala 103 da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas, a banca examinadora composta respectivamente pelas docentes doutoras e pelo docente doutor, Marília Oliveira Fonseca Goulart; Maria Aline Barros Fidelis de Moura; Francine Santos de Paula; Camila Braga Dornelas; Luciano Aparecido Meireles Grillo; para o **Exame de Defesa de Dissertação** intitulada: "**Estudo da Reatividade ao DNA de Derivados Ferrocênicos, utilizando Técnicas Eletroquímicas e Espectroscópicas**" elaborada pela Mestranda **Emanuella Gomes da Silva**, regularmente matriculada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Mestrado, Matrícula Institucional 13130195, sob a orientação da **Profa. Dra. Marília Oliveira Fonseca Goulart**, que presidiu os trabalhos. Após apresentação por 50 minutos, a mestranda foi arguida pela banca. Em seguida, reunidos em sessão secreta às 17:40 horas, os examinadores emitiram o seguinte parecer: APROVADA, SEM RESTRIÇÕES

Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada às 17:45 horas e eu, Daniel de Brito Ricarte, Secretário do PPGCF, Mestrado, lavrei a presente ata que vai assinada pela Banca Examinadora e pelo Mestrando. Maceió, 18 de dezembro de 2014.

Presidente (Orientadora): Profa. Dra. Marília Goulart

Examinadora Interna: Profa. Dra. Maria Aline Barros Fidelis de Moura

Examinadora Externa: Profa. Dra. Francine Santos de Paula

Examinadora Interna: Profa. Dra. Camila Braga Dornelas

Examinador Interno: Prof. Dr. Luciano Grillo

Mestranda: Emanuella Gomes da Silva

Dedico esta dissertação ao meu esposo Thiago Terto que me incentiva a buscar o aperfeiçoamento nos estudos, aos meus pais, Manoel e Marlene Gomes, bem como a todos que contribuíram direta ou indiretamente para sua produção.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, pois levo comigo a certeza na fé que se faço o possível, Deus vem e faz o impossível.

A meu esposo Thiago Terto pelo apoio, pela dedicação e atenção. Sem sua contribuição tudo seria muito mais difícil e penoso.

À minha Família, meus pais pela formação, minhas queridas irmãs pela torcida e encorajamentos. Não posso me esquecer de meus sogros maravilhosos, segundos pais, que me adotaram como filha e me acompanham nas minhas conquistas diárias.

À minha orientadora Professora Dr^a. Marília Fonseca Oliveira Goulart, pela oportunidade e confiança em mim depositada, bem como a oportunidade de estágio em outra universidade (UFMG), uma experiência enriquecedora, tanto em conhecimento científico como em bons hábitos, que seguirei como rotina de vida.

À minha amiga e pós-doutoranda do Laboratório de Eletroquímica, do IQB/UFAL, Fabrícia da Rocha Ferreira, que acompanhou meu crescimento na eletroquímica.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas.

A todos do laboratório de Eletroquímica do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas que contribuíram para produção deste trabalho científico, em especial à Profa. Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino, pelas discussões positivas sobre a metodologia a ser executada.

Aos pós-graduandos do Laboratório de Inorgânica da Profa. Dra. Heloísa Beraldo, no Instituto de Química da UFMG, que gentilmente me ensinaram parte dos procedimentos que desenvolvi nesta dissertação.

À Fapeal/Capes, ao CNPq, ao INCT-Bioanalítica e à UFAL, pela bolsa de mestrado e pelo auxílio financeiro, que permitiram a viabilização do presente trabalho.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

RESUMO

Agentes DNA-reativos estão associados a vários tipos de interação com DNA, que incluem intercalação, ligação não covalente às fendas, ligação covalente / ligação cruzada, quebra de DNA, e incorporação de nucleosídeo, entre outros, produzindo alterações em sua estrutura. Quando essas alterações se fixam de forma capaz de serem transmitidas, pode ocorrer genotoxicidade. O DNA é um alvo terapêutico importante, apesar de ser menos seletivo. Nos últimos anos, moléculas organometálicas têm sido descritas como compostos promissores na terapia contra o câncer e outras doenças. Face ao atraente perfil farmacológico identificado por substâncias derivadas do ferroceno, este trabalho visa investigar a interação de derivados ferrocênicos e seus precursores orgânicos com o DNA, por meio do emprego de técnicas eletroquímicas e espectrofotométricas, a fim de propor mecanismos de ação biológica via interação com DNA e possível reatividade ao DNA dos compostos. No trabalho, utilizaram-se biossensores de dsDNA, ssDNA em solução e microbalança eletroquímica de cristal de quartzo (MECQ), com avaliação de parâmetros eletroquímicos; espectroscopia no UV-Vis com concentração de DNA fixa e variação da concentração dos analitos, em tampão Tris-HCl pH 7,2 com 10 e 30% de etanol. A inibição da fluorescência do complexo de brometo de etídio (BE)-DNA foi avaliada em concentrações crescentes dos compostos, nas mesmas condições de UV-Vis. A investigação do retardamento da mobilidade eletroforética (RME) foi realizado em DNA pUC 19, em concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados eletroquímicos evidenciaram a perturbação da estrutura nativa do dsDNA e exposição da Guanina e Adenina para oxidação, via interação com a substância P41 e da Adenina, via interação com a substância P365. O Ferroceno não interagiu com DNA. Uma interação direta com ssDNA foi registrada apenas para P41. Por MECQ, observa-se o aumento de massa de p41 em presença da SAM de DNA. Por espectroscopia no UV-Vis, foram calculados os valores de constante de formação (K_f), com base na absorção do DNA, cujos maiores valores foram obtidos para P15: $K_f = 1 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$ e P41: $K_f = 2,4 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$. As constantes calculadas por fluorescência também foram obtidas e comparadas, com os dados da Doxorubicina, agente reconhecidamente intercalante. Fc-25 mostrou maiores valores de K_f . Todas as substâncias apresentaram estequiometria de ligação 1:1. No retardamento da mobilidade eletroforética (RME) observou-se uma diferença em presença de H3, comparável à Cisplatina, os demais não alteraram a mobilidade. A combinação de técnicas e os resultados alcançados sugerem que o tipo de interação entre os compostos e CT-DNA seja por intercalação, exceto H3 que possivelmente interage de forma direta por ligação de hidrogênio com as bases, sem intercalação.

Palavras chave: CT-DNA, derivados ferrocênicos, interação, biossensor de DNA, espectroscopia.

ABSTRACT

DNA-reactive agents are associated with several types of interaction with DNA, including intercalation, non-covalent binding to the grooves, covalent bonding / cross-linking, DNA breakage and the incorporation of nucleosides producing alterations in its structure. When these changes are irreversible, they might be transmitted, causing genotoxicity. DNA is an important therapeutic target, despite its lower selectivity. In recent years, organometallic molecules have been described as promising compounds in the therapy against cancer and other diseases. Given the attractive pharmacological profile identified for ferrocene derivatives, this work aims to use biosensors of dsDNA and ssDNA in solution, for a pharmacoelectrochemical study of the interaction with CT-DNA, also using UV-vis/fluorescence titration of tamoxifen and benzo-hydrazide-based ferrocenic derivatives, investigating their DNA-reactivity profile. In the present work, dsDNA biosensor, ssDNA in solution, quartz crystal microbalance (EQCM) and electrochemical evaluation were used; UV-Vis spectroscopy at a fixed DNA and increasing concentration of the analytes, in Tris-HCl buffer pH 7.2, with 10 and 30% ethanol. The inhibition of ethidium bromide (BE)-DNA complex fluorescence was assessed at increasing concentrations of the compounds, at the same conditions as used for UV-Vis studies. The retardation of electrophoretic mobility (REM) was performed on DNA pUC 19 at compounds' concentration of $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. The electrochemical results showed a disturbance of the native structure of dsDNA and exposure of Guanine and Adenine bases, in one case, and only adenine, in the other case, upon interaction with P41 and P365, respectively. Ferrocene itself did not show interaction. A direct interaction with ssDNA was observed only with P41; by EQCM, with evidence of the mass increase of p41 in the presence of the SAM of DNA. UV-Vis spectroscopy allowed the calculation of K_f values based on DNA uptake, which were higher for P15, with $K_f = 1 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$ and P41 $K_f = 2.4 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$. The constants calculated by fluorescence were also obtained and compared with the data of Doxorubicine, well-recognised as a intercalating drug. Fc-25 showed higher K_f values, all showed substantial accommodations binding stoichiometry 1:1. Through REM, a difference in the presence of H3, comparable to cisplatin, was noticed. The other compounds did not alter the mobility. The combination of techniques and the results obtained suggest that the type of interaction between the compounds and CT-DNA is by intercalation except for H3, which possibly interacts directly with the bases, by hydrogen bonding.

Keywords: CT-DNA, ferrocenic derivatives, interaction, DNA biosensor, spectroscopy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Metalofármacos de platina, cisplatina, carboplatina e oxaliplatina usados em terapêutica do câncer aprovados, e nedaplatina, lobaplatina, heptaplatina e satraplatina, protótipos em estágio de ensaios clínicos.....	16
Figura 2 -	(A) diagrama de orbitais moleculares e (B) processo redox reversível do ferroceno.....	20
Figura 3 -	Processos que envolvem o ferroceno em meio biológico.....	21
Figura 4 -	Estruturas químicas do tamoxifeno A, hidroxitamoxifeno B e ferrocifeno C.	22
Figura 5 -	Sequência de oxidação do complexo 1,1-di(4-hidroxifenil) -2-ferrocenil-but-1-eno para a correspondente quinonametídeo, provável espécie citotóxica.	23
Figura 6 -	Estruturas da cloroquina (A) e ferroquina (B).....	25
Figura 7 -	Classificação de agentes antineoplásicos de Calabresi e Chabner.	26
Figura 8 -	Representação da intercalação clássica, ligante de fenda e intercalação entrelaçado ao DNA.....	27
Figura 9 -	Representação esquemática do (a) Potencial aplicado ao eletrodo, tem como resposta um sistema (b) reversível e (c) irreversível, com destaque para os parâmetros mais importantes, em voltametria cíclica.	32
Figura 10 -	Formas de aplicação de potencial para a voltametria cíclica: a) potencial com varredura linear e b) potencial do tipo escada (staircase).	33
Figura 11 -	Voltamograma cíclico, descrito por Nicholson, detalhando as correntes de pico em relação à corrente zero.....	34
Figura 12 -	Representação esquemática da aplicação do potencial em função do tempo em VPD, tanto para instrumentos analógicos (a) quanto para instrumentos digitais (b). Amostragem da corrente em S1 e S2, sendo registrada a diferença entre essas correntes.	36
Figura 13 -	Perfil corrente-potencial esquemático para VPD.....	37
Figura 14 -	Configuração de um biossensor, mostrando a organização dos seus componentes funcionais. A detecção do analito-alvo é feita por um componente biológico que gera um sinal (A), o qual é convertido (B) e processado (C).....	38
Figura 15 -	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.	41
Figura 16 -	Pareamento Watson-Crick de bases e os respectivos sítios de oxidação e redução do DNA.....	42
Figura 17 -	Mecanismo geral proposto para possíveis reações de oxidação para guanina (A) e adenina (B).	43
Figura 18 -	Cristal de TiO ₂ /Au usados em MECQ, frente e verso.....	45
Figura 19 -	Níveis de energia eletrônica e transições.....	49
Figura 20 -	Diagrama de Jablonski.....	51

Figura 21 -	Sistema com os três eletrodos para análises eletroquímicas.....	58
Figura 22 -	Representação da imobilização covalente de <i>dsDNA</i> em SAM de AET numa superfície de ouro, com amina como grupo terminal.....	61
Figura 23 -	Voltamogramas de pulso diferencial de biossensor de <i>dsDNA</i> e <i>ssDNA</i> em solução na ausência e presença (A) 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de P41 (B) 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de P41, (C) e (D) 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ferroceno, (E) e (F) 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de P41, $v=10$ mV/s.....	68
Figura 24 -	Massograma da formação de SAM AET/ <i>dsDNA</i> e interação com o composto P41 (2×10^{-5} mol L^{-1}). Cristal de quartzo com cobertura de ouro em amarelo; 2-aminoetanotiol (AET) em preto; AET/ <i>dsDNA</i> em azul e AET/ <i>dsDNA</i> /P41 em vermelho.	70
Figura 25 -	Voltamograma cíclico da dessorção redutiva em eletrodo de ouro dos grupos tióis de monocamada mista de AET; KOH 0,5 mol L^{-1} ; $v = 0,05$ V.s^{-1}	71
Figura 26 -	A) Espectro de UV para DNA (130 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em ausência e presença de P41 nas concentrações 3,2; 4,0; 4,8; 5,6; 6,4; 7,2 e 8 $\mu\text{mol L}^{-1}$. B) Gráfico dos valores de $1/C$ vs. $1/(A-A_0)$, com o valor de $K_f = 2 \times 10^4 \text{L mol}^{-1}$ de P41 ao DNA. Onde A_0 é a absorção inicial do DNA livre e A é a absorção nas diferentes concentrações de P41 em 260 nm. C é a concentração de P41 em solução.	72
Figura 27 -	Espectro no UV de DNA (a) na ausência e (b-j) em presença de concentrações crescentes de P365 (A), ferroceno (C) e P15 (E). O gráfico dos valores de $1/[\text{Composto}]$ vs. $1/(A-A_0)$ de cada composto está representado em (B), (D) e (F), respectivamente.....	74
Figura 28 -	O gráfico dos valores de $1/[\text{Composto}]$ vs. $1/(A-A_0)$ para determinação da constante K_f dos compostos P92, P25, P85 e P26 estão representados em (A), (B), (C) e (D), respectivamente.....	76
Figura 29 -	(A), (C), (E), (G) e (I) Espectros no UV de DNA 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na ausência (a) e presença dos compostos H3 e seus derivados nas concentrações 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0; 14,0; 16,0; 18,0; 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (b-l). O gráfico dos valores de $1/[\text{Composto}]$ vs. $1/(A-A_0)$ de cada composto está representado em (B), (D), (F), (H) e (J).	78
Figura 30 -	(A) Espectro de emissão de BE e CT-DNA, na ausência e presença de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Dox. (B) Regressão linear de F_0/F vs $[\text{Dox}]$ ($\lambda_{em.} = 590$ nm). (C) Regressão linear de $\text{Log}[(F_0-F)/F]$ vs $\text{Log}[\text{Dox}]$ ($\lambda_{em.} = 590$ nm).....	81
Figura 31 -	(A) Espectro de emissão de BE e CT-DNA, na ausência e presença de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Fc-25. (B) Regressão linear de F_0/F vs $[\text{Fc-25}]$ ($\lambda_{em.} = 591$ nm). (C) Regressão linear de $\text{Log}[(F_0-F)/F]$ vs $\text{Log}[\text{Fc-25}]$ ($\lambda_{em.} = 591$ nm).	82
Figura 32 -	Curvas com base na emissão de BE e CT-DNA, na ausência e presença de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ no $\lambda_{em.} = 591$ nm (A e B) e $\lambda_{em.} = 598$ nm (C e D). Onde (A e C) regressão linear de F_0/F vs $[\text{Composto}]$. (B e D) regressão linear de $\text{Log}[(F_0-F)/F]$ vs $\text{Log}[\text{Composto}]$	83

Figura 33 - Gel de agarose 1%, após incubação dos compostos com DNA pUC 19 por 24h à 37 °C, concentração das amostras à 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Testes diagnósticos em VC para processos reversíveis (a), irreversíveis (b) e quase-reversíveis (c).	35
Tabela 2 -	Sensores eletroquímicos de DNA empregados para a análise de interação com diferentes compostos bioativos.....	39
Tabela 3 -	Exemplos de valores de constantes de ligação K_f de compostos descritos na literatura com <i>dsDNA</i> , por espectroscopia no UV-vis.	48
Tabela 4 -	Compostos analisados.	54
Tabela 5 -	Lista de reagentes com o laboratório de aquisição.	57
Tabela 6 -	Valores das constantes de ligação K_f dos compostos com CT-DNA, por UV-Vis.	77
Tabela 7 -	As constantes de extinção de Sterne Volmer (K_{sv}), constante de ligação aparente (K_{app}), constante de ligação (K_a), a estequiometria de ligação (n) e o percentual de diminuição da fluorescência (%F) para a ligação competitiva entre BE ligado ao CT-DNA entre os compostos estudados.	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

v	Velocidade de varredura de potencial
ΔA_{abs}	Varição da Absorvência
ΔI	Diferença entre a corrente da linha base e da de pico no voltamograma
A	Ampere
Abs	Absorvência
AET	Hidrocloreto de 2-aminoetanotiol
Ar	Argônio
CI ₅₀	Concentração inibitória média capaz de inibir 50% do efeito máximo
CT-DNA	Ácido desoxirribonucleico de timo de bezerro, do inglês Calf Thymus-DNA
CV	Carbono vítreo
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
dsDNA	Ácido Desoxirribonucléico em fita dupla, do inglês double strand of DNA
<i>E</i>	Potencial
EDC	Cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
<i>E_p_a</i>	Potencial de pico anódico
<i>E_p_c</i>	Potencial de pico catódico
Fc	Ferroceno
GSH	Glutathiona
HCT-8	Linhagem de células de carcinoma de cólon humano
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês Human Immunodeficiency Virus
HL-60	Linhagem de células de leucemia promielocítica humana
<i>I</i>	Corrente
<i>I_p_a</i>	Corrente de pico anódica
λ	Comprimento de onda
K _f	Constante de formação de complexo para o DNA
MDA-MB 435	Linhagem de células de melanoma humano
MGB	Células de membrana glomerular basal de macacos
MTT	Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
pb	Pares de bases
QM	Quinonametídeo

SAM	Monocamadas auto-organizadas, do inglês Self Assembled Monolayers
SF-295	Linhagem de células de glioblastoma humano
ssDNA	Ácido Desoxirribonucléico em fita simples, do inglês single strand of DNA
TBE	Tampão com a composição Tris-HCl, Borato e EDTA
VC	Voltametria Cíclica
Vis	Visível
VPD	Voltametria de Pulso Diferencial
UV	Ultra Violeta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Metalofármacos	18
1.2	Ferroceno e seus derivados	19
1.3	Interação com DNA	25
1.3.1	Técnicas de investigação	28
1.4	Eletroquímica	31
1.4.1	Voltametria cíclica	31
1.4.2	Voltametria de pulso diferencial	36
1.4.3	Biossensor de DNA eletroquímico	37
1.4.4	Microbalança Eletroquímica de cristal de quartzo (MECQ)	44
1.5	Espectroscopia no UV-Vis	46
1.5.1	Fundamento	49
1.6	Espectroscopia de Fluorimetria	50
1.7	Justificativa de execução	52
2	OBJETIVO	53
2.1	Geral	53
2.2	Específico	53
3	MATERIAIS E MÉTODOS	54
3.1	Reagentes e Solventes	54
3.2	Estudo Eletroquímico	57
3.2.1	Estudos em meio prótico	58
3.2.2	Preparo e aplicação do biossensor de <i>dsDNA</i>	59
3.2.3	Preparo e aplicação do <i>ssDNA</i>	60
3.2.4	Microbalança de Eletroquímica de Cristal de Quartzo (MECQ)	60
3.3	Espectroscopia de Absorção (Titulação UV)	62
3.4	Estudos da fluorescência	64
3.5	Eletroforese em Gel de Agarose	66
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4.1	Estudos eletroquímicos	67
4.1.1	Biossensor de <i>dsDNA</i> e <i>ssDNA</i> em solução	67
4.1.2	Avaliação da interação de P41 com <i>dsDNA</i> por Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo (MECQ)	69
4.2	Análise da interação dos analitos com <i>dsDNA</i> por espectrofotometria	71

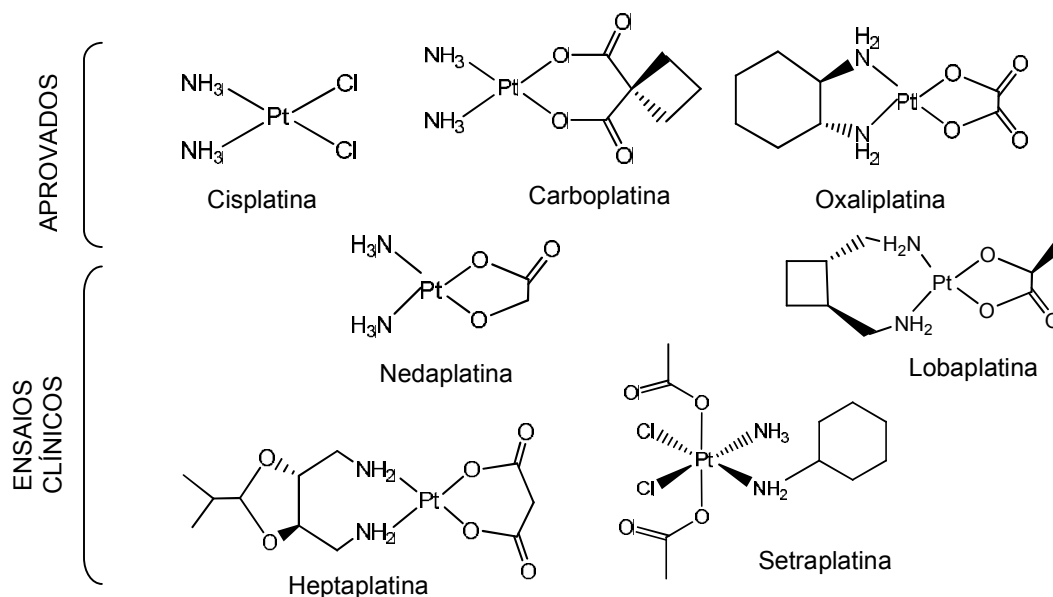
4.3	Avaliação da ligação competitiva com Brometo de etídio intercalado ao CT-DNA.....	80
4.4	Estudo da interação com DNA plasmídico por eletroforese em gel.....	85
5	CONCLUSÃO	87
	PERSPECTIVAS.....	88
	REFERÊNCIAS.....	89
	GLOSSÁRIO.....	98
	ANEXO A.....	99

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de mortalidade no mundo e a segunda principal causa de morte nos países em desenvolvimento (JEMAL et al., 2011). Cirurgia e radioterapia dominaram o tratamento de câncer até 1960. Posteriormente, tornou-se claro que as taxas de sobrevivência aumentam com a combinação da quimioterapia, o que abriu a oportunidade de aplicar fármacos em conjunto com a cirurgia e/ ou radioterapia (DEVITA et al., 2008).

A era moderna dos fármacos anticâncer à base de metais começou com a descoberta das propriedades antitumorais da *cis*-[diaminodicloroplatina (II)], a cisplatina (LIPPERT, 1999). Atualmente, a cisplatina e seus sucessores, fármacos de platina de segunda geração, carboplatina e oxaliplatina, estão entre os mais importantes agentes quimioterapêuticos usados contra uma variedade de cânceres. A Figura 1 representa as estruturas da cisplatina e a oxaliplatina e a carboplatina, seguida de promissores candidatos a fármacos que estão em ensaios clínicos nos Estados Unidos (KIDANI; MASAHIDE, 1987).

Figura 1 - Metalofármacos de platina, cisplatina, carboplatina e oxaliplatina usados em terapêutica do câncer aprovados, e nedaplatina, lobaplatina, heptaplatina e satraplatina, protótipos em estágio de ensaios clínicos.



Fonte: (MJOS; ORVIG, 2014).

O DNA é aceito como sendo o alvo celular da cisplatina e seus efeitos antitumorais são atribuídos a Pt^{2+} da molécula que se liga covalentemente na posição N-7 da adenosina (A) ou guanosina (G) na sequência GG e AG, formando ligações cruzadas intercadeia e 1,2- ou 1,3-intracadeia, causando torções, que bloqueiam a replicação, transcrição e desencadeiam apoptose e necrose das células tumorais, por conseguinte, mediando a citotoxicidade e resistência de compostos de platina. A resistência aos metalofármacos de platina é um processo multifatorial, podendo ocorrer através de vários mecanismos, tais como diminuição da absorção do fármaco por resistência na membrana celular, aumento do efluxo de fármacos, a inativação do fármaco por glutatona e metalotioneínas, evasão de apoptose e valorização do reparo do DNA (BOULIKAS et al., 2007; BOULIKAS; VOUGIOUKA, 2003; MJOS; ORVIG, 2014).

A elucidação dos mecanismos moleculares que envolvem o mecanismo de ação da cisplatina, resistência e sensibilidade forneceram o baseamento necessário para a concepção e síntese de novos compostos de platina com um perfil melhor de toxicidade, evasão de resistência e ampliação dos tumores alvo (BOULIKAS et al., 2007; MJOS; ORVIG, 2014).

Estimulada pelo sucesso dos agentes anticancerígenos de platina, outros compostos à base de metal estão sendo testados quanto à sua atividade antineoplásica. A literatura relata uma variedade de complexos metálicos que apresentam atividades citotóxicas ou antitumorais, tais como de gálio (III), ouro (I, III), antimônio (III), bismuto (III) e rutênio (II) paládio (II), cobre (II), irídio (III), ósmio (IV), ródio (III) (ARYANPOUR et al., 2012; PARRILHA et al., 2014; PEÑA, et al., 2014).

Nesse sentido, muitos esforços são direcionados na busca de mecanismos de ação de candidatos a fármacos à base de metais que não sejam de platina.

1.1 Metalofármacos

Há interesse crescente no uso de complexos de metais de transição em medicina, bem como em outras áreas biológicas. Assim, muito se pode esperar da química de organometálicos quando dirigida a utilizações terapêuticas, sendo tema central da pesquisa química contemporânea (BIOT et al., 2000; PAITANDI et al., 2014).

A introdução intencional de íons metálicos no sistema biológico humano tem provado ser útil tanto para fins terapêuticos como diagnósticos. Este último levou a um aumento da compreensão e detecção precoce de doenças por meio da formação de imagens do corpo vivo. Hoje em dia, agentes de contraste contendo isótopos radioativos metálicos são produzidos e administrados diariamente em muitos hospitais em tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) com escaneamento do corpo humano (MJOS; ORVIG, 2014).

Os metalofármacos destinados à terapêutica abrangem as mais diversas patologias e tratamentos, como: (i) radiofármacos, utilizados como última medida nos estágios avançados de câncer, fornecem doses de radiação ionizante citotóxicas diretamente no tecido; são eles o ^{89}Sr , ^{90}Y , ^{153}Sm , ^{223}Ra ; (ii) no tratamento de herpes, testes clínicos com complexos de cobalto (II) se mostram promissores e a inserção de uma variedade de metais de transição (o vanádio, o tungstênio, molibdênio e níbio) tem demonstrado diminuir a atividades de HIV, dentre outros vírus; (iii) na artrite, compostos com ouro são utilizados para retardar a progressão de doenças reumáticas; (iv) no tratamento de diabéticos, efeitos positivos estão associados a análogos de vanádio; (v) como agente anticâncer se destaca a cisplatina como o metalofármaco mais bem sucedido; (vi) agentes antimicrobianos e anti-parasitários baseados em arsênio, antimônio e bismuto; um candidato promissor é a ferroquina, derivado ferrocênico da cloroquina para tratamento de malária (MJOS; ORVIG, 2014).

Derivados ferrocênicos têm sido reportados como altamente ativos *in vitro* e *in vivo* contra várias doenças. Os primeiros estudos datam do fim da década de 70, onde avaliaram seu potencial anticâncer, mostrando excelentes resultados. Desde então, vários compostos ferrocênicos têm sido sintetizados e avaliados em termos

de propriedades anticancerígenas (ORNELAS, 2011). Para tanto, será detalhado numa seção a parte.

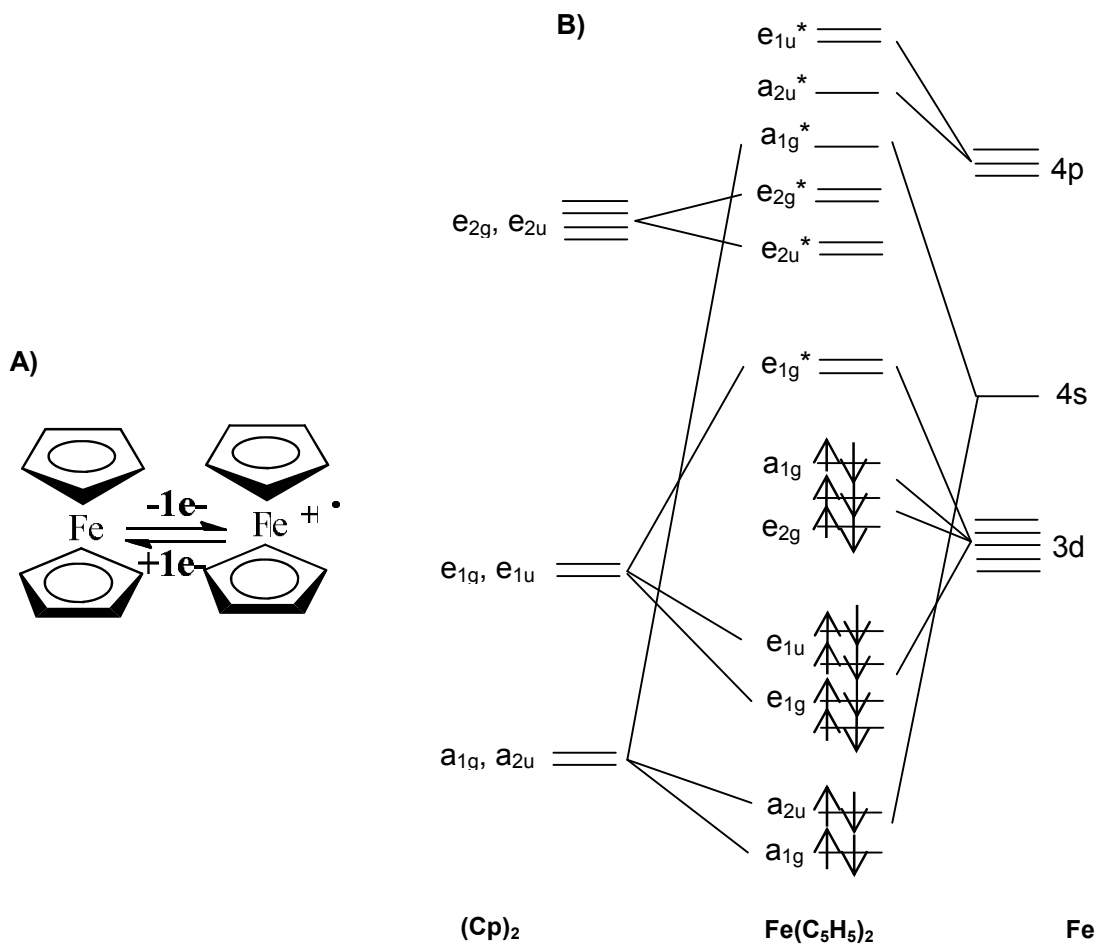
1.2 Ferroceno e seus derivados

Em 1951, Pauson e Kealy sintetizaram o ferroceno (Figura 2A) pela primeira vez (KEALY et al., 1951). Este é um complexo organometálico "sanduíche" em que um átomo de ferro, no estado de oxidação 2^+ , está posicionado entre dois planos de anéis ciclopentadienílicos (WILKINSON; WOODWARD, 1952).

O ferroceno exhibe interessantes propriedades de oxirredução, as quais se devem à sua capacidade de sofrer oxidação reversível, com a geração de espécie do tipo cátion-radical – íon ferrocênio (Figura 2A) (ROSEMBLUM, 1965). Sua formação pode ser entendida com o auxílio do diagrama de orbitais moleculares do ferroceno (Figura 2B), que também explica a natureza diamagnética do ferroceno, uma vez que todos os elétrons da camada de valência encontram-se emparelhados (FRANCISCO; VARGAS, 2010).

O ferroceno é um composto organometálico que obedece à regra dos 18 elétrons, semelhante a regra do octeto, no caso de moléculas orgânicas. Do total de 18 elétrons disponíveis para ligação (6 elétrons da camada de valência do Fe^{2+} e 6 de cada ligante ciclopentadienila Cp^-), 12 encontram-se em orbitais fortemente ligantes, e os outros seis, em orbitais não-ligantes e_{2g} e a_{1g} . Essa configuração é muito importante, já que são os elétrons não-ligantes que determinam o comportamento redox e muitas propriedades químicas do composto (Figura 2). Um elétron pode ser facilmente removido do HOMO a_{1g} , gerando uma espécie do tipo cátion-radical ferrocênio (ZERNER et al., 1980; FRANCISCO; VARGAS, 2010).

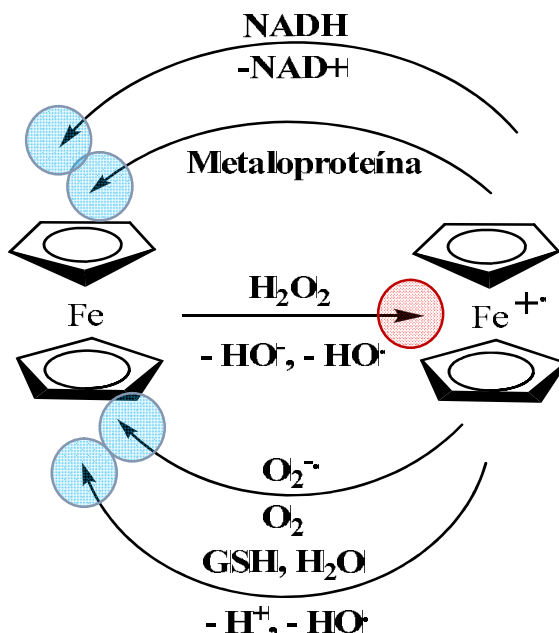
Figura 2 - (A) Diagrama de orbitais moleculares e (B) processo redox reversível do ferroceno.



Fonte: Adaptado de FRANCISCO; VARGAS, 2010.

Estudos nos levam a crer que o ferroceno em meio biológico seja oxidado ao cátion-radical ferrocênio pelo peróxido de hidrogênio na presença da enzima peroxidase (Figura 3) enquanto o processo de redução pode acontecer por diversos caminhos: i) pela ação do ânion radical superóxido, gerado fotoliticamente, dependente do pH, sendo este convertido no sistema a O₂; ii) pela oxidação de metaloproteínas (plastocianina ou ferrocitocromo c) e do nicotinamida adenina dinucleotídeo - NADH a NAD⁺¹ e iii) através da formação do radical HO[•] na presença da glutatona, GSH (EPTON et al., 1977; NEUSE, 2005; FRANCISCO; VARGAS, 2010).

Figura 3 - Processos que envolvem o ferroceno em meio biológico.



Fonte: Adaptado de NEUSE, 2005.

Quanto às suas características e propriedades, é um sólido de cor vermelho-alaranjada de notável estabilidade, solúvel em solventes orgânicos, mas não em água. Ao contrário do que se poderia pensar, dada a sua estrutura, Fc é muito estável em ambientes oxidantes. Além disso, o ferroceno não é citotóxico. A sua toxicidade é relativamente baixa (1,320 mg/kg por via oral e 500 mg/kg por via intraperitoneal em ratos) fazendo dele um composto interessante para o desenvolvimento de moléculas medicamentosas compatíveis com praticamente qualquer tratamento (DUBAR, 2012). No entanto, o seu produto oxidado, o íon ferrocênio é bem conhecido por sua citotoxicidade (PAITANDI et al., 2014).

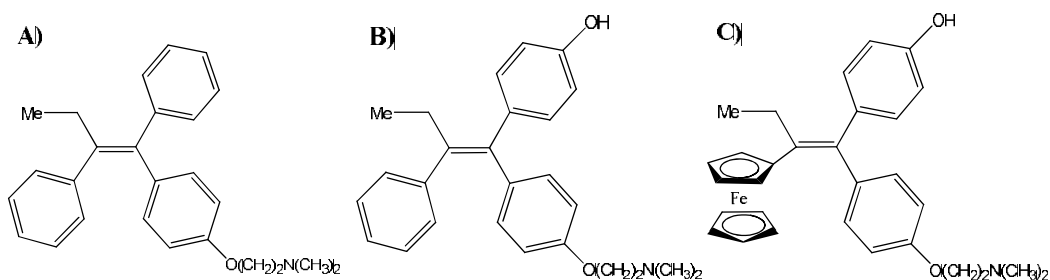
Por sua fácil funcionalização, há uma grande variedade de compostos ferrocenílicos disponíveis, os quais se mostram muito promissores (ORNELAS, 2011). A literatura relata os mais diversos interesses na síntese de análogos com atividades variadas, como quimiossensores de ânions, biossensores, catalisadores, polímeros e grupo redox em métodos eletroquímicos, para detectar uma sequência de ácidos nucleicos, pois possui um potencial redox acessível (PEREIRA, 2013). O ferroceno também tem atraído atenção especial na Química Medicinal, como candidato a fármaco para tratamento de várias doenças, tais como as infecções

bacterianas, fúngicas e viróticas, como, por exemplo, o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e, principalmente, em malária e câncer (PAITANDI et al., 2014).

Os mais relevantes exemplos de compostos baseados em ferroceno que demonstraram atividade anticâncer, são os que incluem: (i) sais ferricênio; (ii) ferroceno conjugado com moléculas biologicamente ativas; (iii) derivados de ferroceno moduladores seletivos de estrogênio; (iv) ferrocênio andrógênio e anti-andrógênio; (v) compostos ferrocênicos coordenados com outros metais; (vi) porções ligadas ao ferroceno, direcionadas ao DNA (ORNELAS, 2011).

As propriedades anticancerígenas de derivados de ferroceno têm sido estudadas em linhagens de células cancerosas desde o final dos anos 70 com ferrocenil em polianilinas (FIORINA et al., 1978). Um exemplo muito citado é a incorporação do grupo ferrocenil à estrutura da molécula hidroxitamoxifeno (Figura 4B), metabólito mais ativo do fármaco Tamoxifeno (Figura 4A), e o resultado é o ferrocifeno (Figura 4C). O tamoxifeno é o agente quimioterapêutico de primeira escolha para os pacientes com câncer de mama, hormônio-dependente, classificado como modulador seletivo dos receptores de estrogênio (SERMs) (JAOUEN et al., 2004; PIGEON et al., 2005; HILLARD et al., 2006; BURIEZ et al., 2008; SILVA et al., 2010).

Figura 4 - Estruturas químicas do tamoxifeno A, hidroxitamoxifeno B e ferrocifeno C.

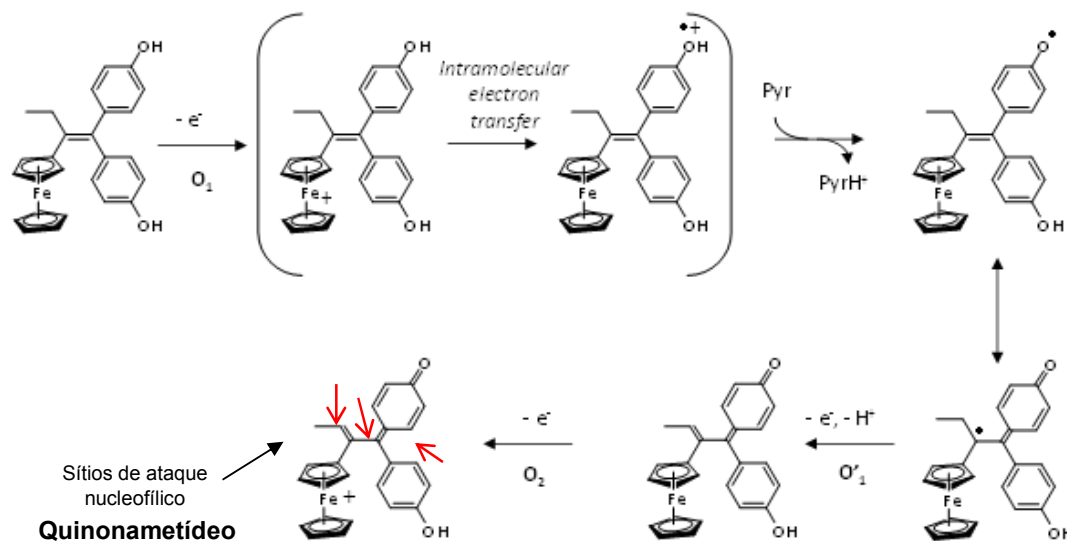


Fonte: Autora, 2014.

Inicialmente, se acreditava que o mecanismo de ação do ferrocifeno seria semelhante ao do tamoxifeno, através de ligação competitiva ao receptor de estrogênio (ERα), reprimindo, assim, a transcrição de DNA mediada por estradiol em tumor de tecido. No entanto, tem sido demonstrado que a atividade do ferrocifeno

em células hormônio-independentes é devida à geração de quinonametídeos em ambientes oxidantes (Figura 5).

Figura 5 - Sequência de oxidação do complexo 1,1-di(4-hidroxifenil)-2-ferrocenil-but-1-eno para a correspondente quinonametídeo, provável espécie citotóxica.



Fonte: Adaptado de TAN et al., 2012.

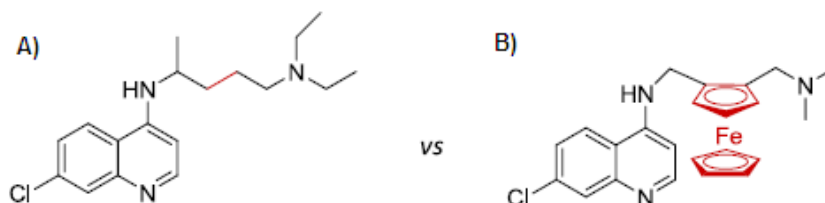
Mecanicamente, a sequência de oxidação apresentada na Figura 5 mostra uma base promotora de transferência de elétrons entre o fenol e o ferrocenil através da deslocalização do sistema π da molécula, possível pelo aumento da acidez do grupo hidroxil (o qual pode ser formalmente representado como cátion radical hidroxilo como as espécies resultantes da transferência de elétrons intramolecular). Nesse contexto, o grupo ferrocenila funciona como uma antena eletrônica e pode servir como um transportador intramolecular do centro eletropositivo da molécula (SCHLESENER et al., 1984; HILLARD et al., 2006). Em presença de bases adequadas (nucleobases ou peptídeos) um radical fenoxi é formado, este rearranja para um radical mais estável com o carbono central. Há oxidações subsequentes e um autêntico quinonametídeo é gerado, suficientemente eletrofílico para reagir com endobióticos, o que pode levar a morte celular.

Por isso, a citotoxicidade dos ferrocifenóis se origina da possibilidade de geração de quinonametídeos em ambientes oxidantes, QM sendo eletrófilos que poderiam danificar células por formação de adutos com o DNA, a GSH, ou proteínas

(TAN et al., 2012). Termodinamicamente, a presença de ferroceno permite a oxidação do grupo fenol para valores de potencial menos positivos do que os de hidroxitamoxifeno, ou seja, em condições de oxidação biologicamente relevantes (AMATORE et al., 1993). Pois, este grupo funciona como uma antena facilitando a oxidação do fenol por transferência intermolecular.

Em 1997, Biot et al., inspirados pelos trabalhos pioneiros do grupo do Prof. Gerard Jaouen com os derivados de tamoxifeno, descreveram a síntese de novos análogos da cloroquina (Figura 6A), referência no tratamento de malária, onde a cadeia de carbono é substituída pelo grupo ferrocenila na posição 1-4, relativa aos dois átomos de N exocíclicos. De uma primeira triagem de 50 compostos que continham o grupo ferroceno (Fc) emergiu um candidato promissor: a 7-cloro-4-[(2-*N,N'*-dimetilaminometil)ferrocenilmetilamino]quinolina(SR97193), mais conhecida como ferroquina (Figura 6B) que está sendo desenvolvida pelo laboratório SANOFI-AVENTIS (França) e encontra-se na fase II dos ensaios clínicos. O planejamento da síntese teve como base a afeição do parasito por ferro livre, porém o mecanismo de ação que levou a ferroquina a manifestar atividade antimalárica mais ativa que a cloroquina em linhagens de *Plasmodium falciparum* sensíveis e resistentes à cloroquina ainda não foi totalmente elucidado. Seu mecanismo está associado a diversas propostas que comparam as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas da ferroquina com as da cloroquina, como: (i) inibição do pigmento malárico; (ii) geração de espécies reativas de oxigênio; (iii) interação com proteína transmembranaral do *P. falciparum*; (iv) ligação de hidrogênio intramolecular; (v) modificação da cadeia lateral básica; (vi) variação da posição do grupo Fc; e (vii) metabólitos secundários (BIOT et al., 2000; FRANCISCO; VARGAS, 2010; MJOS;ORVIG, 2014).

Figura 6 - Estruturas da cloroquina (A) e ferroquina (B).



Fonte: FRANCISCO; VARGAS, 2010.

As investigações sobre as interações entre complexos metálicos e alvos biológicos, são importantes para entender melhor sua atividade farmacológica. Uma vez que o DNA é um importante receptor celular, muitos compostos exercem os seus efeitos antitumorais através da ligação ao DNA, alterando assim a sua replicação e inibição do crescimento de células (LI *et al.*, 2007)

Estudos anteriores do Grupo de Eletroquímica da UFAL avaliaram a atividade biológica de trinta derivados ferrocênicos do tamoxifeno e um não ferrocênico pelos métodos do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), avaliação do potencial hemolítico, avaliação da viabilidade celular em linhagem de células de membrana glomerular basal de macacos (MGB de macacos, integridade da membrana, análise morfológica hematoxilina / eosina, coloração diferenciada por brometo de etídio/ laranja de acridina, avaliação da ativação das caspases 3 e 7, avaliação do ciclo celular e fragmentação do DNA e determinação da externalização da fosfatidilserina (Anexo I) (OLIVEIRA, 2014).

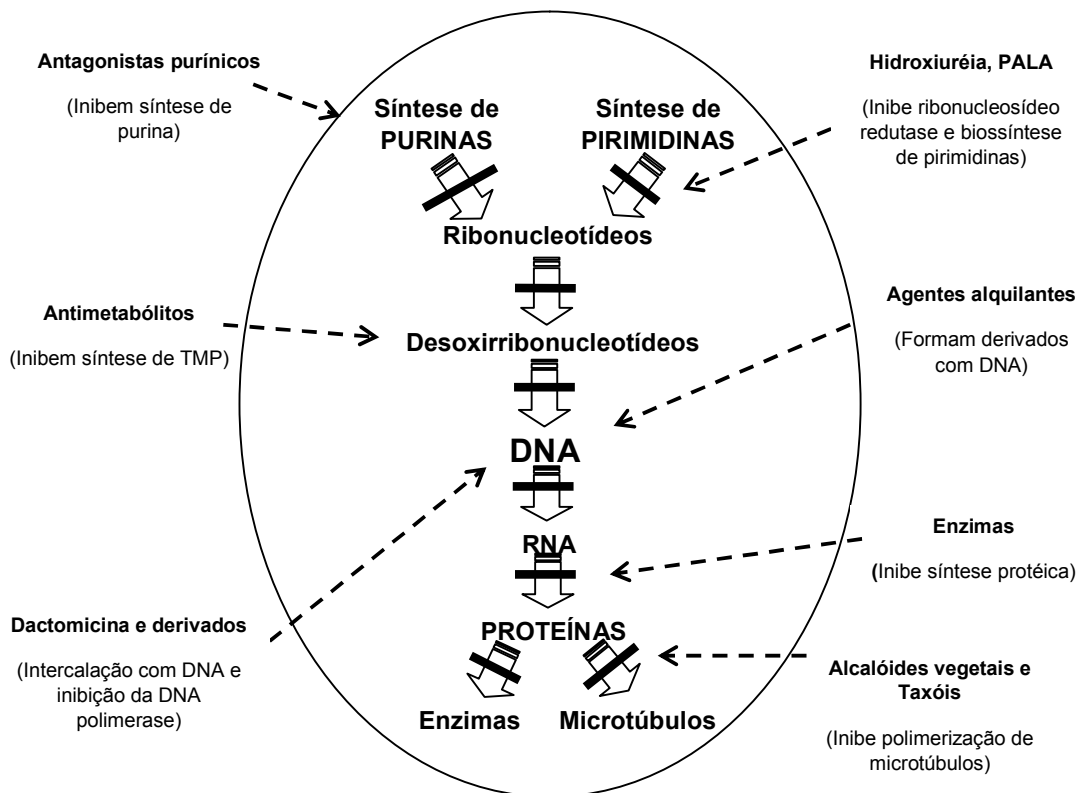
1.3 Interação com DNA

O DNA foi identificado como o principal alvo para fármacos anticâncer, considerado um dos receptores biológicos mais promissores para o desenvolvimento de agentes quimioterapêuticos, onde, ao alterar a conformação do DNA, inibem a duplicação ou transcrição (LI *et al.*, 2012).

Calabresi e Chabner (1995) classificaram os fármacos antineoplásicos usando como critério o ponto de interferência no mecanismo de ação das diferentes etapas da síntese do DNA, transcrição e transdução (Figura 7). Entretanto, os autores consideram esta classificação arbitrária, pois, por exemplo, os agentes

hormonais, entre outros, não são classificáveis desta forma. Contudo, a variedade de tipos de compostos utilizados em quimioterapia oncológica é tão grande, que tal classificação só pode ser feita indiretamente (ALMEIDA et al., 2005).

Figura 7 - Classificação de agentes antineoplásicos de Calabresi e Chabner.



Fonte: Adaptado de ALMEIDA et al., 2005.

Dentre os fármacos anticancerígenos comuns em terapia clínica, estão os fármacos que podem inserir ou intercalar entre os pares de bases do DNA e inibir a síntese de ácidos nucleicos (TORIGOI et al., 2002).

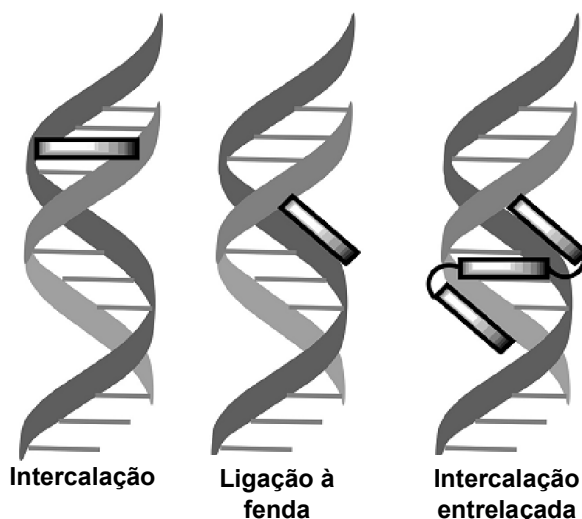
Existem vários tipos de interações associadas com os ligantes de DNA. Estas incluem intercalação, ligação não covalente às fendas, ligação covalente/ligação cruzada, quebra de DNA, e incorporação de nucleosídeo (ERDEM et al., 2008). De modo geral, há duas classes de agentes de ligação não-covalentes com DNA que foram identificadas, os intercaladores e os ligantes de fenda, os quais podem apresentar interações moleculares do tipo hidrofóbicas, iônica, ligações de hidrogênio, ou van der Waals. Os intercaladores se ligam por meio da inserção de

um cromóforo aromático planar entre os pares de bases adjacentes do DNA, onde a interação ocorre entre os sistemas π -elétron da molécula e os anéis heterocíclicos dos pares de base; ao passo que ligantes de fenda encaixam-se na fenda menor do DNA, causando menor perturbação conformacional ou da estrutura primária do DNA (RESCIFINA et al., 2014).

As moléculas que se ligam ao DNA têm preferência por um único sítio de ligação (sequência de bases), determinado por ligeiras diferenças no mecanismo de ligação, resultando em variações de citotoxicidade e atividades farmacológicas. Embora seja bem estabelecido que a ligação ao DNA não confere atividade citotóxica, esta é critério necessário para a existência de um efeito genotóxico (BANDYOPADHYAY et al., 2012).

Vale lembrar que moléculas livres em solução e complexadas com os ácidos nucleicos podem existir em equilíbrio dinâmico. Primeiro, a molécula se liga reversivelmente ao DNA antes de subsequentes eventos químicos. Em princípio, existem seis modos de ligação reversível de moléculas com a dupla hélice de DNA (Figura 8): (i) atrações eletrostáticas com a estrutura aniônica açúcar-fosfato do DNA, (ii) a interação com a fenda maior do DNA, (iii) as interações com a fenda menor, (iv) intercalação entre pares de bases por meio da fenda maior, (v) intercalação entre pares de bases por meio da fenda menor, e (vi) intercalação entrelaçada (STREKOWSKI; WILSON, 2007).

Figura 8 - Representação da intercalação clássica, ligante de fenda e intercalação entrelaçada ao DNA.



Fonte: RESFINA et al., 2014.

Nas últimas décadas muita atenção tem sido dada à síntese e caracterização de novos complexos de metal de transição, porque alguns deles podem interagir de modo não-covalente com o DNA, atuando como sondas para manipulação da estrutura de ácido nucleico ou exibindo propriedades de nuclease (HADJILIADIS et al., 2009). Esforços consideráveis são ainda necessários para desenvolver novos complexos de metais de ligação ao DNA (SUN et al., 2011).

Como um resultado do complexo de formação que ocorre entre DNA e os fármacos, a termodinâmica, a estabilidade e as propriedades funcionais do DNA sofrem mudança. O entendimento de como a complexação afeta tanto a estrutura, como as propriedades mecânicas do DNA, é um passo importante no sentido de elucidar o mecanismo funcional do agente de ligação e também pode fornecer informações para a produção de medicamentos de forma racional. Por conseguinte, torna-se necessário o uso de técnicas analíticas que possibilitem identificar possível interação com o DNA e quantificá-la.

1.3.1 Técnicas de investigação

Muitas são as técnicas para a investigação da capacidade de um composto interagir com o DNA. Por exemplo, se na presença de DNA um composto mostrar um desvio para o vermelho na absorção de UV-Vis pode sugerir interação (SUH; CHAIRES, 1995). Mais conclusivamente, estudos de desnaturação térmica, onde o DNA dupla fita, na presença e ausência de compostos é desnaturado termicamente em componentes de cadeia simples. Os compostos que se associam fisicamente com o DNA aumentam a temperatura do ponto médio de desnaturação (T_m) (MARTINEZ et al., 2005).

Os compostos fluorescentes podem ter deslocamento no comprimento de onda, e/ou aumento das emissões de fluorescência quando ligados ao DNA. O brometo de etídio intercalador (BE) aumenta em 24 vezes sua fluorescência na presença de DNA. Além disso, mudanças no espectro de dicroísmo circular do DNA na ausência e presença de diferentes proporções do fármaco também podem indicar interação (PALCHAUDHURI; HERGENROTHER, 2007).

A calorimetria de titulação isotérmica é uma técnica sensível em que o composto é titulado numa solução de DNA, permitindo a determinação dos vários parâmetros de ligação, tais como constante de dissociação (K_d), entalpia (ΔH), entropia (ΔS), e a estequiometria da ligação. Entretanto, depende muito de variável do meio, como pH, tampão e temperatura (REN et al., 2000).

Medições de viscosidade são úteis para processos com intercaladores, pois este provoca o desenrolamento e o alongamento do DNA, aumentando a proporção do intercalador e DNA, aumentando a viscosidade da solução. Se um plasmídeo circular é usado, os picos de viscosidade diminuem com o aumento da concentração do composto, indicando mudança no DNA de um estado superenrolado negativo para um relaxado. Porém, está limitada pela solubilidade aquosa do composto (PILCH et al., 1993). Embora a mudança em viscosidade possa identificar conclusivamente intercaladores, o dicroísmo circular é uma forma de espectroscopia que faz uso da absorção diferenciada da luz polarizada no sentido horário ou no sentido anti-horário, pode distinguir simultaneamente entre os modos intercalante e de ligação ao sulco (PALCHAUDHURI; HERGENROTHER, 2007).

Experimentos de fluorescência envolvem o monitoramento do espectro de emissão de um composto fluorescente em ausência e presença de DNA. O aparecimento de uma banda de absorção no comprimento de onda de excitação do DNA em 260 nm indica uma estreita interação e transferência de energia entre os pares de bases de DNA e a molécula, porém não é exclusivo de intercaladores, certos ligantes de fenda são capazes de transferir energia por fluorescência (HYUN et al., 1997).

Espectroscopia vibracional no infravermelho é frequentemente usada para caracterizar a natureza da interação e para monitorar os efeitos de vários fármacos sobre a estrutura do DNA. O aumento da intensidade ou o deslocamento das vibrações moleculares das bases e fosfato do DNA estão associados à interação, permitindo determinar os locais de ligação do fármaco, a especificidade de sequência, a estrutura secundária e a estabilidade helicoidal do DNA, em solução aquosa (NEAULT et al., 1996). Há necessidade de que o DNA dos ensaios esteja

extremamente purificado, procedimento detalhado na metodologia (HANLON et al., 2000).

O uso de modelos biológicos experimentais *in vitro*, que mimetizam o ambiente biológico também são muito empregados nos estudos de interação com DNA, como o teste do cometa, estudo *in vitro* que avalia a extensão da quebra ao DNA após exposição de linfócitos a substâncias suspeitas de potencial genotóxico. A interpretação das lâminas coradas com brometo de etídeo é feita no microscópio de fluorescência, onde para cada cauda é atribuído um nível de dano (COLLINS et al., 2004).

Análises de distribuição do ciclo celular e fragmentação de DNA por citometria de fluxo reforçam os resultados de interação com DNA e mecanismo de morte celular. Os dados são interpretados em histogramas de ciclo celular com os dados de intensidade de fluorescência *versus* o número de células. A intensidade de fluorescência emitida é diretamente proporcional à quantidade de DNA existente na célula, permitindo assim diferenciar DNA celular, e suas diferentes intensidades nas fases do ciclo (G_1 , S e G_2) do DNA fragmentado (SHAPIRO et al., 1995; BROWN; WITTEWER, 2000).

Ao longo dos anos, a interação do DNA com outras moléculas tem sido extensamente estudada pelas técnicas supracitadas. A maioria desses métodos, porém, são indiretos e exigem diferentes estratégias de rotulagem. Além disso, o tempo de produção e custos dos ensaios convencionais colocam um limite para a aplicabilidade de rastreio em grande escala de candidatos a fármacos (ERDEM et al., 2008).

Nesse sentido, as técnicas voltamétricas tornam-se importante instrumento para a análise conformacional do DNA, produzindo evidências sobre o polimorfismo da dupla hélice pelo estudo dos danos oxidativos causados a este pela interação com o alvo em solução (DOGAN-TOPAL et al., 2009; DRUMMOND et al., 2003). Logo, descrever princípios da técnica torna mais fácil a discussão dos resultados.

1.4 Eletroquímica

Os estudos que envolvem a transferência de elétrons são importantes para a compreensão de vários processos que ocorrem no meio biológico, auxiliando assim no desenvolvimento das áreas químico-farmacêutica, farmacológica, toxicológica e biomédica, em geral. Muitos dos mais importantes processos em célula viva, desde seu metabolismo até sua defesa, envolvem processos de oxidação e redução. As enzimas que catalisam os processos de oxidação e redução são onipresentes nos organismos vivos. Esses processos requerem um ambiente redox que permita realizar eficientemente esta função. Esse ambiente redox é mantido por um complexo grupo de proteínas, peptídeos e genes, com base em uma série de transformações redox e não-redox, catalisadas enzimaticamente ou não, e envolvem transferência de elétrons e de átomos. Qualquer mudança nesse delicado equilíbrio pode causar alteração na homeostase celular ou em outros ambientes (MOURA, 2008).

A eletroquímica se refere a fenômenos químicos associados à transferência de elétrons, que podem ocorrer homogeneamente em solução, ou heterogeneamente na superfície do eletrodo (BRETT e BRETT, 1996). O processo eletroquímico baseia-se na aplicação de um potencial capaz de oxidar ou reduzir substratos de interesse, sendo o método padrão para o estudo das reações redox. Os métodos eletroquímicos oferecem certas vantagens sobre métodos convencionais, como o uso de pouca quantidade de reagentes; custo relativamente baixo de instrumentação; oferecimento de informações sobre a atividade da espécie química, além de fácil controle de variáveis, que, combinadas de formas diversas, levam a técnicas eletroquímicas particulares (MELLO, 2007; MOURA, 2008; SKOOG, 2009).

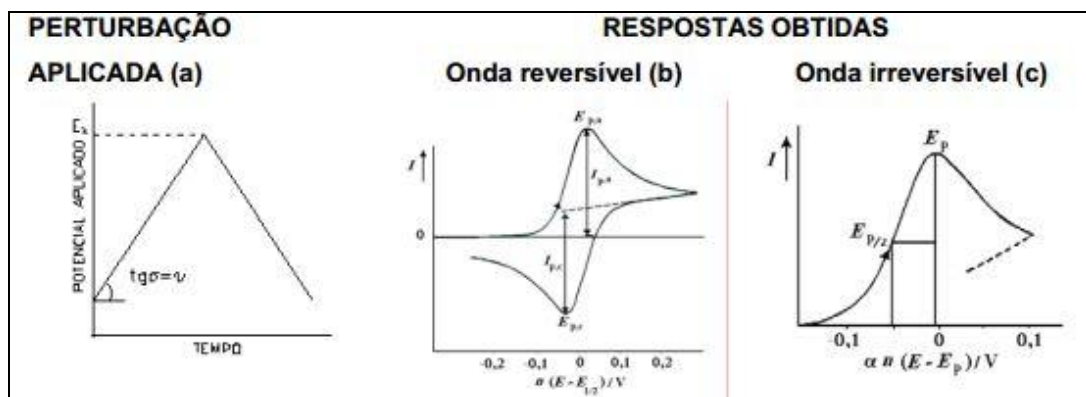
1.4.1 Voltametria cíclica

Dentre as diversas técnicas eletroquímicas existentes, a técnica mais comumente utilizada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos é a voltametria cíclica. A eficiência desta técnica está na sua habilidade em fornecer, rapidamente, informações sobre as reações de transferência de elétrons, sobre a termodinâmica de processos redox, sobre a cinética de reações

heterogêneas de transferência de elétrons, a possibilidade de investigar a reatividade química das espécies eletrogeradas e reações químicas acopladas a processos adsorptivos, além de auxiliar na elucidação do mecanismo eletródico analisado (BRETT e BRETT 1996; BARD e FAULKNER, 2001).

A voltametria cíclica é uma técnica de varredura reversa de potencial, onde o potencial aplicado ao eletrodo é submetido à variação, numa velocidade conhecida, e ao atingir o potencial final desejado, a varredura é revertida ao valor inicial, na mesma velocidade. Obtém-se como resposta a essa perturbação (Figura 9a), no caso de uma transferência eletrônica reversível, um par de picos, catódico e anódico (Figura 9b), quando uma transferência é irreversível há apenas um pico (Figura 9c) (GREEF et al., 1985).

Figura 9 - Representação esquemática do (a) Potencial aplicado ao eletrodo, tem como resposta um sistema (b) reversível e (c) irreversível, com destaque para os parâmetros mais importantes, em voltametria cíclica.

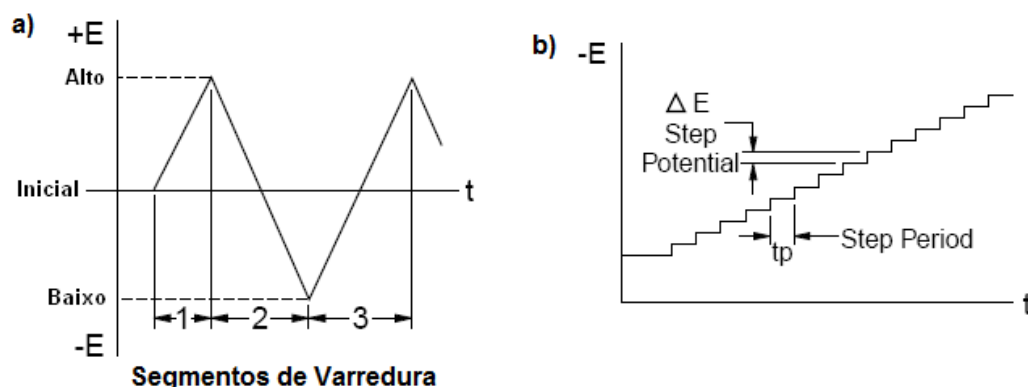


Fonte: GREEF et al., 1985.

A forma de aplicação do potencial, em voltametria cíclica, está representada na Figura 10a, onde o potencial é modificado ou variado linearmente com o tempo, no eletrodo de trabalho estacionário em uma solução sem agitação. A técnica de voltametria cíclica “staircase” é utilizada como contraponto a voltametria cíclica linear, no sentido de minimizar a contribuição da corrente capacitiva na corrente total. Porém, o potencial é aplicado na forma de escada (staircase, Figura 10b), com pequenos degraus de potenciais (da ordem de 10 mV) e tempo de duração pequeno (50 ms), sendo a corrente medida apenas no final deste intervalo (MIAW et al., 1988;

BOLT, 1997; TICIANELLI e GONZALEZ, 2005; BARD e FAULKNER, 2001; BRETT e BRETT, 1996).

Figura 10 - Formas de aplicação de potencial para a voltametria cíclica: a) potencial com varredura linear e b) potencial do tipo escada (staircase).



Fonte: BOLT, 1997.

A análise do processo eletroquímico ocorrido pode ser feita por meio da obtenção dos parâmetros eletroquímicos mais importantes, ou seja, os potenciais de pico catódico e anódico (E_{pc} e E_{pa}), as correntes de pico catódica e anódica (i_{pc} e i_{pa}) e os potenciais de meia onda ($E_p/2$). Por outro lado, as reações que ocorrem no eletrodo são determinadas por dois componentes principais que são o transporte de massa do analito por difusão em solução para a superfície do eletrodo, e a transferência heterogênea de carga entre o analito e o eletrodo, em alguns casos ainda podem ocorrer reações químicas acopladas a algum destes processos (BARD e FAULKNER, 2001; BRETT e BRETT, 1996).

Para uma reação reversível, ou seja, uma reação que ocorre com velocidade suficientemente alta para estabelecer um equilíbrio dinâmico na interface, apenas a etapa de transferência de massa influenciará no processo. A corrente do pico (em amperes) neste caso é dada por:

$$i_{pc} = (2,69 \times 10^5) n^{2/3} A D_0^{1/2} \nu^{1/2} C_0 \quad \text{Eq 1.}$$

Sendo que n é o número mols de elétrons envolvidos no processo, A é a área do eletrodo (cm^2), D_o é o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) e C_o é a concentração da espécie em solução (mol cm^{-3}), v é a velocidade de varredura (V s^{-1}) (equação 1).

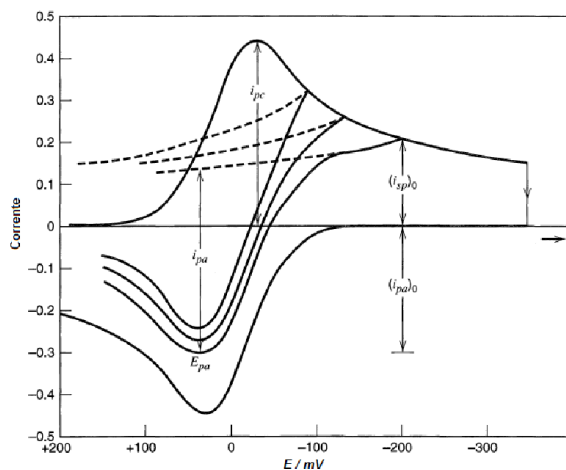
Para uma reação reversível, a corrente de pico varia linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, a razão entre a corrente de pico anódico e catódico será igual a 1 e independente do valor de v , o potencial de pico não apresenta variação com a velocidade de varredura de potencial e a razão $i_p/v^{1/2}$ é constante e independe de v (BARD e FAULKNER, 2001; BRETT e BRETT, 1996).

Para calcular a razão entre as correntes de pico i_{pa}/i_{pc} , a equação descrita por R. Nicholson pode ser utilizada (BARD e FAULKNER, 2001) (Equação 2),

$$\frac{i_{pa}}{i_{pc}} = \frac{(i_{pa})_0}{(i_{pc})_0} + \frac{(0,485) \cdot (i_{sp})_0}{(i_{pc})_0} + 0,086 \quad \text{Eq. 2.}$$

em que devem ser consideradas as intensidades das correntes $(i_{pa})_0$, $(i_{pc})_0$ e $(i_{sp})_0$ desde a corrente zero, sendo desta forma, descritas na Figura 11.

Figura 11 - Voltamograma cíclico, descrito por Nicholson, detalhando as correntes de pico em relação à corrente zero.



Fonte: Adaptado de Bard e Faulkner, 2001.

Quando a velocidade de transferência de carga é lenta comparada com a velocidade de varredura, as concentrações das espécies oxidadas (O_x) e reduzidas (R_{ed}) não serão mais função apenas do potencial, não possuindo, portanto um

comportamento nernstiano. Nestas circunstâncias, a equação que descreve a corrente de pico (i_{pc}) é dada segundo a equação 3:

$$i_{pc} = (2,99 \times 10^5)n(\alpha n)^{1/2}AC_0D_0^{1/2}v^{1/2} \quad \text{Eq. 3.}$$

Nestes casos, em reações irreversíveis, o voltamograma costuma apresentar apenas pico anódico, podendo se deslocar com o aumento da velocidade de varredura. Já para uma reação eletródica quase-reversível, a corrente é controlada tanto pela etapa de transferência de massa como pela etapa de transferência de carga e a equação de Nernst seria apenas aproximadamente satisfeita (BARD e FAULKNER, 2001; BRETT e BRETT, 1996).

Os testes diagnósticos para a caracterização dos processos descritos em voltametria cíclica são apresentados na Tabela 1. Em uma análise qualitativa, na maioria das vezes, o perfil da onda pode dar indício de processo reversível, como a presença de um par de picos (catódico e anódico) de mesma altura, com potenciais de pico separados por uma distância de $59/n$ mV (n = número de elétrons), caso as espécies oxidadas e reduzidas sejam estáveis. Por outro lado, um processo irreversível pode ser caracterizado pela evidência da completa ausência do pico reverso, apesar de esse não ser o único critério de análise, como descrito anteriormente (GREEF et al., 1985).

Tabela 1 - Testes diagnósticos em VC para processos reversíveis (a), irreversíveis (b) e quase-reversíveis (c).

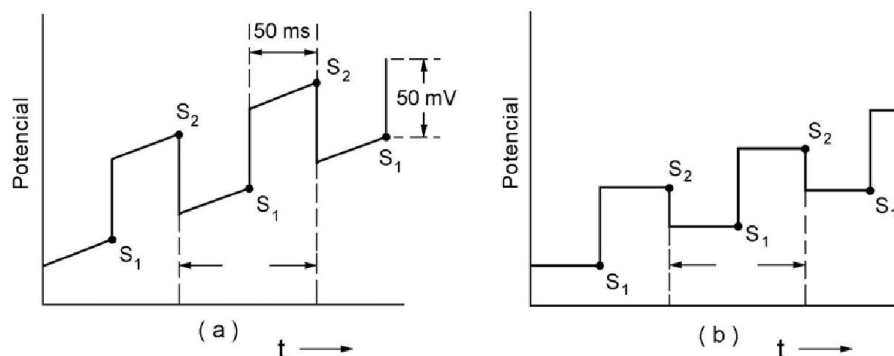
Processos Reversíveis (a)	Processos Irreversíveis (b)	Processos Quase-reversíveis (c)
$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = 59/n$ mV	Ausência de pico reverso	$I_{pa}/I_{pc} = 1$ se $\alpha = 0,5$
$ E_p - E_{p/2} = 59/n$ mV	$ E_p - E_{p/2} = 48/\alpha n$ mV	I_p aumenta com o aumento de v
$ I_{pa}/I_{pc} = 1$	E_{pc} desloca $-30/\alpha n$ mV por década de aumento de v	E_{pc} desloca negativamente com aumento de v
E_p é independente de v	I_{pc} dependente $v^{1/2}$	$\Delta E_p = 58/n$ mV e aumenta com v .
I_p dependente $v^{1/2}$		

Fonte: Adaptado de GREEF et al., 1985

1.4.2 Voltametria de pulso diferencial

A voltametria de pulso diferencial é uma técnica muito usada em medidas em níveis traço, de espécies orgânicas e inorgânicas, em que, o degrau de potencial é a base deste tipo de voltametria (WANG, 2000). Na voltametria de pulso diferencial, pulsos de amplitude fixos sobrepostos a uma rampa de potencial crescente são aplicados ao eletrodo de trabalho, sendo que a forma e os sinais de excitação captados dependem do tipo de aparelho utilizado, podendo ser tanto analógico quanto digital (Figura 12). Nos equipamentos analógicos, uma sobreposição de pulsos periódicos sobre uma rampa linear é verificada (Figura 12a), já em equipamentos digitais, há uma combinação de um pulso de saída com um sinal em degrau (Figura 12).

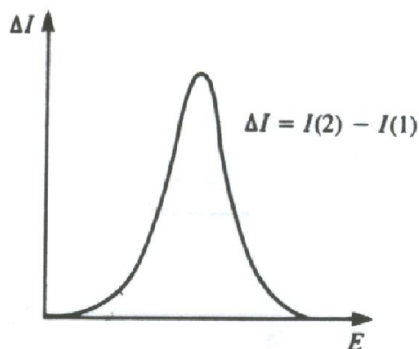
Figura 12 - Representação esquemática da aplicação do potencial em função do tempo em VPD, tanto para instrumentos analógicos (a) quanto para instrumentos digitais (b). Amostragem da corrente em S₁ e S₂, sendo registrada a diferença entre essas correntes.



Fontes: BARD e FAULKNER, 2001; BRETT e BRETT, 1996.

Em VPD, a corrente é medida duas vezes, sendo uma antes da aplicação do pulso (S₁) e outra ao final do pulso (S₂), onde a primeira corrente é instrumentalmente subtraída da segunda. Em seguida, a diferença das correntes é plotada em função do potencial aplicado, e o voltamograma resultante consiste de picos de corrente de forma gaussiana, cujas áreas são diretamente proporcionais à concentração do analito (Figura 13B) (BRETT e BRETT, 1996).

Figura 13 - Perfil corrente-potencial esquemático para VPD.



Fonte: Adaptado de BRETT e BRETT, 1996.

Para a voltametria de pulso diferencial, o objetivo de se fazer duas leituras de corrente e se trabalhar com a diferença entre elas é fazer a correção da corrente capacitiva. À medida que se aplica o pulso, ocorre um acréscimo da contribuição da corrente capacitiva e da corrente faradaica, mas a corrente capacitiva diminui exponencialmente, enquanto que a corrente faradaica diminui linearmente. Assim, escolhendo um tempo apropriado para se fazer a segunda leitura, faz-se a leitura da corrente total a um valor de corrente onde a contribuição da corrente capacitiva (não-faradaica) pode ser desconsiderada. Esta correção de correntes possibilitada pelo modo de pulso diferencial permite obter limites de detecção da ordem de 10^{-8} mol L⁻¹ (BRETT e BRETT, 1996).

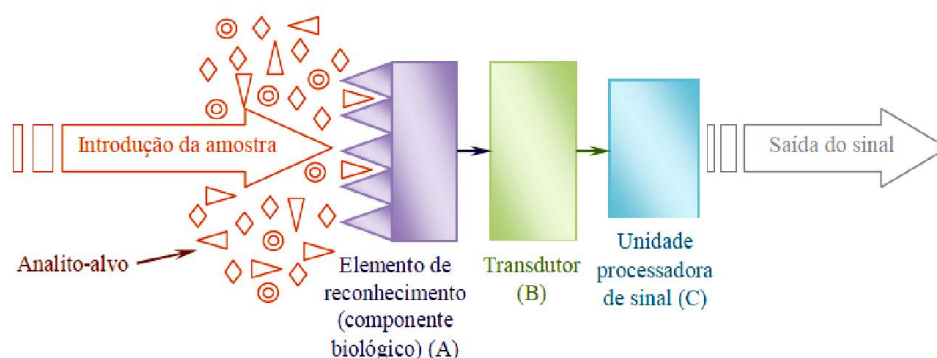
1.4.3 Biossensor de DNA eletroquímico

Biossensores são dispositivos que combinam um componente biológico com um componente detector e compreendem os elementos sensíveis, material biologicamente derivado, como elemento de reconhecimento; ligado a um sistema de detecção acoplado a um transdutor, o qual deve ter capacidade de converter o sinal químico gerado em sinal mensurável (corrente elétrica, variação de temperatura, absorção de luz) e processá-lo, Figura 14 (WANG, 2000; LIU et al., 2012).

Em eletroquímica, esses dispositivos analíticos que se baseiam em reações de transferência de carga, são ditos processos faradaicos, ou ainda processos não faradaicos, no caso dos que se baseiam em migração de carga. Ainda podem ser de

natureza: potenciométrica; condutimétrica; amperométrica, voltamétrica; óptica; entalpimétrica; piezelétrica (WANG, 2000). A última década assistiu a um grande desenvolvimento de biossensores eletroquímicos de ácidos nucleicos, justificado pela obtenção de informações específicas de sequência mais simples, mais rápido e mais barato do que os testes tradicionais de ácido nucléico. Além disso, esses dispositivos oferecem maneiras inovadoras para a interface, em nível molecular (LIU et al., 2012).

Figura 14 - Configuração de um biossensor, mostrando a organização dos seus componentes funcionais. A detecção do analito-alvo é feita por um componente biológico que gera um sinal (A), o qual é convertido (B) e processado (C).



Fonte: CALIL, 2011.

O monitoramento eletroquímico de interações fármaco/DNA está relacionado com as diferenças entre os sinais eletroquímicos de moléculas que se ligam ao DNA. Devido ao efeito de proximidade da cadeia dupla, *dsDNA*, a alteração causada pela possível interação do composto com o DNA pode ser observada por mudanças nos sinais de oxidação ou redução em relação aos compostos e a(s) base(s) do DNA. Os processos de monitoramento podem ser realizados em diferentes eletrodos e detecta interações entre as distintas substâncias e o DNA em solução e / ou na superfície do eletrodo (ERDEM et al., 2008). A Tabela 2 traz alguns exemplos de interações identificadas via eletroquímica com compostos de interesse biológico, além de constantes de formação do complexo.

Tabela 2 - Sensores eletroquímicos de DNA empregados para a análise de interação com diferentes compostos bioativos.

Sensor de DNA	MD	Eletrodo	Interações	Compostos	Constante de ligação (L mol ⁻¹)	Referência
<i>ds</i> -DNA	FE	SnO ₂	através da formação de adutos covalentes	tetrafluoro-1,4-benzoquinona (TFBQ); tetra-1,4-cloro-benzoquinona (TCBQ)	—	JIA et al., 2010
<i>ss</i> DNA	VC	GCE	por ligações de hidrogênio	5-hidroxi-1,4-naftoquinona; 1,4-Benzoquinona e 1,4-naftoquinona	—	ZANG et al., 2012
<i>ds</i> DNA	VPD e E-UV	GCE	por intercalação e ligação com a fenda menor	C-1305 (5-dimetilaminopropilamino-8-hdroxi-6H-v-triazolo[4,5,1-de]acridin-6-one)	—	NOWICKA et al, 2009
<i>ds</i> DNA e <i>ss</i> DNA	VPD	GCE	interação com guanina	2-ftalimido-N-substituted feniletanosulfonamida (PMPES-derivatives)	—	OZKAN-ARIKSOYSAL et al., 2010
<i>ds</i> DNA	VPD	GCE	intercalação	Metotrexato	—	PONTINHA et al, 2011
<i>ds</i> DNA	VPD	GCE	formação de 8-oxoguanina	Ocratoxina A (OTA)	—	OLIVEIRA et al, 2007
<i>ds</i> DNA	EF E VPD	PGE	intercalação entre as bases de DNA	benzotienoindol (BTIN) e benzofuroindol (BFIN)	—	QUEIROZ et al, 2008.
<i>ds</i> DNA	VPD	PGE	intercalação	Codeína e Morfina	—	ENSAFI et al, 2013
<i>ds</i> DNA e <i>ss</i> DNA	VPD	CPE e PGE	alteração nos sinais de oxidação da guanina denina	Ciclofosfamida	—	PALASKA et al, 2007
<i>ds</i> DNA	VPD	GCE	intercalação e interação eletrostática	Gatifloxacino Moxifloxacino Esparfloxacino	3,2 x 10 ³ 2,6 x 10 ³ 2,8 x 10 ³	ABD-ELGAWAD et al, 2010
<i>ds</i> DNA	VPD	HMDE e GCE	intercalação	Lumicromo	4,12 (± 1,12) x 10 ⁵ 1,03 (± 0,43) x 10 ⁴	IBRAHIM et al, 2003
<i>ds</i> DNA e <i>ss</i> DNA	VC e VPD	PCE	intercalação entre fenda	Nitazoxanida	4,1 x 10 ⁵	RADI; EL-NAGGAR; NASSEF, 2014

<i>dsDNA</i>	VC	GCE	intercalação	bis(1,10-fenantolina)cobre(II)	$4,14 \pm 0,24 \times 10^3$	NI et al., 2006
<i>dsDNA</i>	VC	GCE	intercalação	Bis (m-ferrocenilbenzoato)tri(p-tolil)antimônio (V) e Bis (p-ferrocenilbenzoato)tri(p-tolil)antimônio (V)	$6,61 \times 10^3$ $6,58 \times 10^3$	ASGHAR et al. 2012

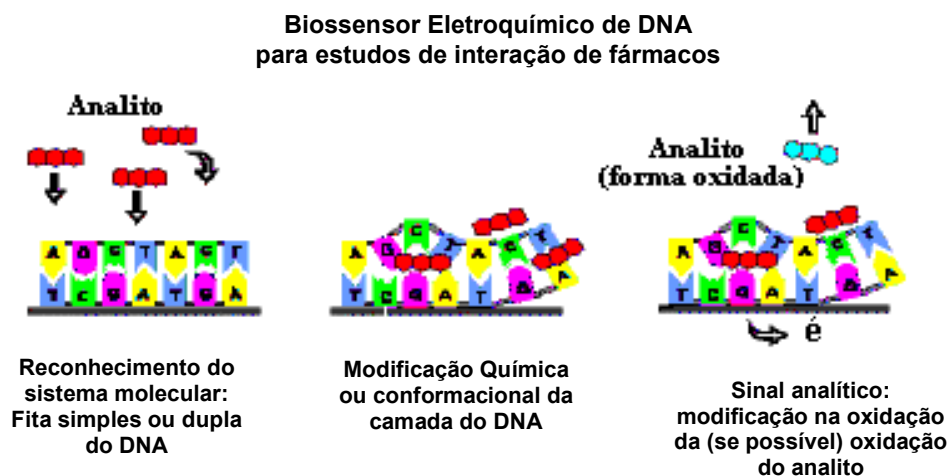
*MD= método de detecção; VPD=Voltametria de Pulso Diferencial; VC=voltametria cíclica; FE=fotoeletroquímica; E-UV=espectroscopia; EF=Espectroscopia de Fluorescência de UV; CP=pasta de carbono; PGE=eletrodo de grafite descartável; CGE= eletrodo de carbon vítreo; HMDE= eletrodo de gota de mercúrio.

Fonte: Autora 2014.

Existem diferentes tipos de eletrodos de trabalho (carbono vítreo, ouro, pasta de carbono). Vários métodos foram desenvolvidos para ligar as sondas de DNA para as superfícies sólidas de biossensores. Sistemas comuns de Imobilização de sonda incluem: (1) monocamadas auto-organizadas com sondas funcionalizadas com tióis em eletrodos de ouro; (2) fixação de sondas de DNA biotinizado, através da interação biotina-avidina na superfície do eletrodo; e, (3) eletropolimerização com produção de sondas com comprimentos diferentes (LIU et al., 2012)

Um método eletroquímico clássico para análise de ácidos nucleicos baseia-se na oxidação das bases guanina e adenina do *dsDNA* por voltametria de pulso diferencial, cujo princípio base está representado na Figura 15.

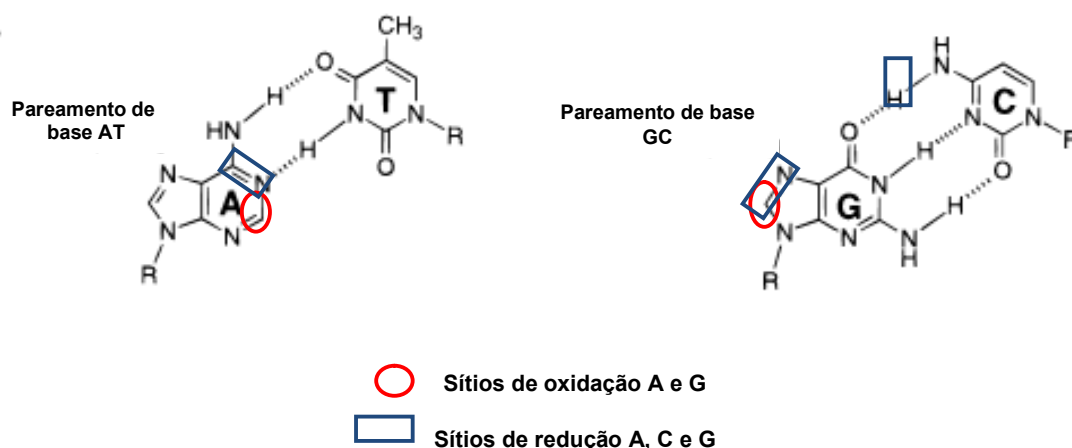
Figura 15 - Representação do modo de operação do biossensor de DNA. O analito entra entre as fitas do DNA, modifica sua conformação, o que leva à exposição de suas bases, passíveis de oxidação anódica.



Fonte: Adaptado de ABREU et al., 2011.

Na Figura 16, vêem-se os sítios passíveis de oxidação dessas bases e suas etapas de oxidação estão esquematizadas na Figura 17. Os picos anódicos dessas bases nitrogenadas apresentam como valores característicos de potencial, 0,8 V para guanina e 1,2 V para adenina e o mecanismo de oxidação compreende duas etapas, com a perda de quatro elétrons e quatro prótons (BRETT et al., 1999).

Figura 16 - Pareamento Watson-Crick de bases e os respectivos sítios de oxidação e redução do DNA.

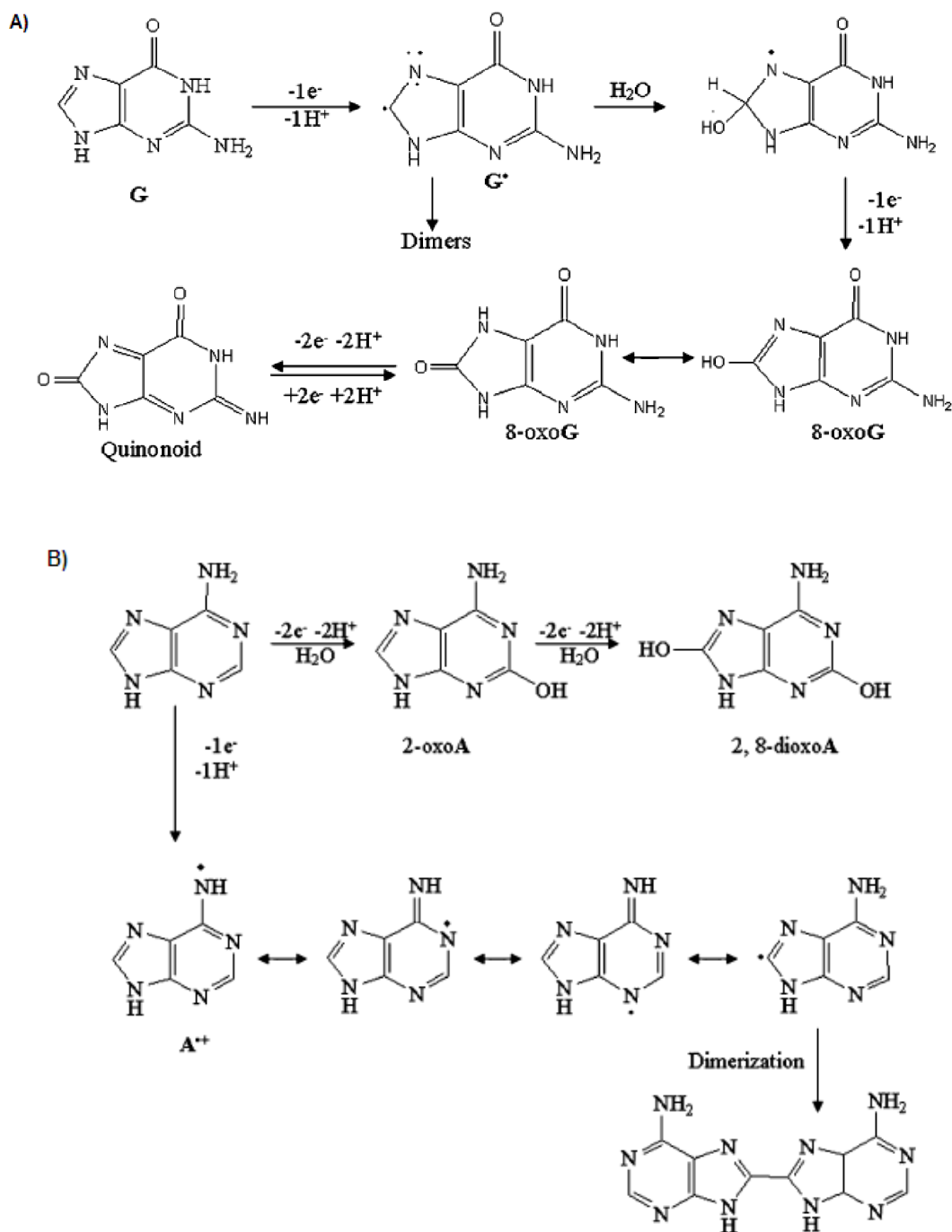


Fonte: Adaptado de RAJSKI; WILLIAMS, 1998.

Em eletrodo de carbono vítreo, os picos referentes à eletrooxidação do DNA, em meio ácido (pH 4,5), referem-se à oxidação das bases púricas (guanina e adenina), sendo as bases pirimídicas (timina e citosina) eletroinativas nessas condições. Em geral, o *dsDNA* apresenta menores correntes de eletrooxidação quando comparado ao *ssDNA* (DNA desnaturado, fita simples), isso se deve não só pelo fato de os sítios de oxidação estarem protegidos, por estarem envolvidos em ligações de hidrogênio, como também por sua menor flexibilidade de adsorção (ABREU et al., 2011).

A interação de um analito (isto é, um fármaco, pró-fármaco ou um intermediário gerado *in situ*) com *dsDNA* pode levar à ruptura de ligações de hidrogênio e consequente abertura da dupla hélice, o que resulta em aumento da acessibilidade para as bases constituintes. O grau de dano de DNA pode ser determinado por monitorização da oxidação das bases expostas por voltametria. A 8-oxoguanina e a 2,8-oxoadenina (Figura 17) são exemplos de produtos mutagênicos gerados a partir do dano oxidativo causado por radicais livres e exposição à radiação ionizante (OLIVEIRA-BRETT et al., 2004).

Figura 17 - Mecanismo geral proposto para possíveis reações de oxidação para guanina (A) e adenina (B).



Fonte: ABBASPOUR; NOORI, 2008.

As características eletroquímicas de tais biossensores de *dsDNA* têm sido avaliadas, e é evidente que esta abordagem pode fornecer uma maior compreensão do mecanismo de interação entre fármacos e DNA e, assim, um direcionamento no planejamento de novos fármacos com esse mecanismo (BARROS et al., 2012).

Assim, métodos eletroquímicos oferecem uma grande promessa para explorar as diferenças nas interações em solução e em superfície para estudos de interações entre DNA e fármacos com porção eletroquimicamente ativa (ERDEM et al., 2008).

1.4.4 Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo (MECQ)

Uma técnica *in situ* de grande importância é a Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo, a qual fornece informações relevantes para a compreensão do processo de transporte de massa em um nível molecular (Figura 18). É um método eletroacústico que utiliza a propriedade piezoelétrica do quartzo para gerar dados da massa depositada e/ou adsorvida na interface sólido/água ou sólido/ar. Neste método mede-se a massa por unidade de área via medição da alteração na frequência do ressonador de cristal de quartzo. O quartzo é um sensor extremamente sensível de massa, capaz de medir em níveis inferiores a nanogramas, o que o torna um candidato promissor para aplicações como biossensor, objetivo do trabalho (VARELA et al., 2000; CHANG; ZHAO, 2008).

Como a onda acústica gerada com a excitação elétrica se propaga pelo cristal, o ângulo de corte em relação ao eixo do monocristal exerce influência na velocidade de propagação, sendo que cada corte exibe diferentes propriedades. Para o cristal de quartzo existem três tipos de corte principais, AT, BT e SC, sendo o corte AT mais utilizado para estudos eletroquímicos, pois sofre menor influência com a variação de temperatura. A frequência fundamental de vibração do cristal de quartzo pode variar, sendo as mais utilizadas entre 5 e 10 MHz, por apresentarem facilidade de manuseio e excelente sensibilidade (SMITH, 2008).

Figura 18 - Cristal de TiO₂/Au usados em MECQ, frente e verso.



Fonte: HEYDARI; HAGHAYEGH, 2014.

No decorrer da medida experimental a variação na frequência correspondente à adição ou subtração de massa na superfície do cristal de quartzo é descrita pela equação 4 de Sauerbrey:

$$\Delta f = - \left(\frac{2 f_0^2}{A(\mu_q \rho_q)^{1/2}} \right) \Delta m = -k \Delta m \quad \text{Eq. 4.}$$

onde Δf é a variação de frequência de ressonância em Hz, A é a área geométrica piezoelectricamente ativa em cm² (definida pela área de intersecção entre os depósitos metálicos das duas faces do quartzo), f_0 é a frequência fundamental do cristal, μ_q é o modo de cisalhamento do quartzo, ρ_q é a densidade do quartzo e Δm representa a variação da massa na superfície do cristal. Para um cristal com corte AT a temperatura ambiente, $K = 0,0566 \text{ Hz}/(\text{ng cm}^{-2})$, permite medidas com variação de massa menores que 1 ng cm^{-2} (SMITH, 2008).

Contudo, a equação 4 foi desenvolvida para condições de aplicação no vácuo, assim, em sistemas aquosos Δf pode variar em função das propriedades do solvente tais como viscosidade, densidade e pressão hidrostática, ou ainda em função da rugosidade e hidrofília ou hidrofobia da superfície do depósito sobre o cristal. Em pequenas variações de frequência como na deposição de monocamadas os efeitos causados pelo solvente ou pela superfície do depósito podem ser expressivos.

O emprego da equação de Sauerbrey em sistemas com variação de massa exige a consideração de alguns fatores importantes como:

- Os filmes devem estar rigidamente ligados ao depósito metálico;
- As variações de frequência observadas devem ser menores que 2% da frequência de ressonância fundamental do cristal.

Ao tratarmos de filmes muito finos, tais como monocamadas de tióis adsorvidos sobre o depósito de ouro na superfície do cristal, é viável a suposição de que as variações de frequência podem ser atribuídas a variações de massa (COELHO, 2011).

Quando uma Monocamada Auto-organizada (SAM), por exemplo, é depositada sobre um eletrodo constituído de um fino filme metálico recobrendo uma placa de cristal de quartzo, a diferença de pressão exercida por esse filme provoca uma variação na frequência vibracional do cristal. Por meio de um frequencímetro que mede essa variação e utilizando uma calibração específica (própria para cada aparelho), é possível converter este valor em massa depositada. Desta forma, torna-se possível o registro de um diagrama da massa depositada no eletrodo ao longo do tempo de estudo, simultâneo à execução de outras técnicas como a voltametria cíclica (CHANG; ZHAO, 2008; HEYDARI; HAGHAYEGH, 2014).

Com essa ferramenta em mãos, torna-se possível a caracterização e a consequente interpretação de diversos fenômenos que ocorrem em sistemas eletroquímicos.

1.5 Espectroscopia no UV-Vis

A intercalação de substâncias com o DNA pode ser acompanhada por métodos espectroscópicos, que fornecem informações sobre a intensidade e a posição das bandas de absorção ou emissão. Em virtude do sistema cromóforo do agente intercalante, suas propriedades espectrais são alteradas quando interagem com o DNA (BARICATTI, 1998). É evidenciado um aumento na absorção do DNA na região do ultravioleta, no pico máximo de 260 nm, característico do polímero, fato que se justifica pela diminuição das ligações de hidrogênio, o que coloca as bases mais expostas à luz (QUEIROZ et al., 2007). A Tabela 3 traz uma relação de substâncias descritas na literatura que apresentam interação com dupla hélice de

DNA, o meio de estudo e suas respectivas constantes de interação calculadas por espectroscopia no UV.

Para tanto é importante entender um pouco o fundamento da técnica de espectrofotometria no UV-Vis.

Tabela 3 - Exemplos de valores de constantes de ligação K_f de compostos descritos na literatura com *dsDNA*, por espectroscopia no UV-vis.

Compostos	Meio do estudo	K_f (L mol ⁻¹)	Refs.
1-ferrocenil-3-fenil-2-prop-1-eno	DMSO	$1,26 \pm 0,01 \times 10^4$	QURESHI et al., 2010
1,3,8-trihidroxi-6-metilantra-cene-9,10-dieno	Tampão Tris-HCl-Metanol	$5,59 \times 10^3$	SAITO et al., 2012
safranal	H ₂ O/Etanol	$1,24 \pm 10^3$	KANAKIS et al., 2009
crocetina		$6,20 \pm 10^3$	
dimetilcrocetina		$1,85 \pm 10^5$	
quercetina	Tampão acetato pH 4,7	$3,56 \times 10^3$	JANJUA et al., 2009
	Tampão fosfato pH 7,4	$3,98 \times 10^3$	
mitoxantrona	Tampão Tris-HCl-H ₂ O	$3,8 \times 10^5$	AGARWAL et al., 2013
hesperitina	Tampão fosfato pH 7,4	$3,99 \times 10^3$	HEGDE et al., 2012
naringenina		$4,19 \times 10^3$	
3-fenil-1-piridin-2-ilprop-2-eno-1-ona tiossemicarbazona		$2,52 \times 10^3$	
3-(4-clorofenil)-1-piridin-2-ilprop-2-eno-1-ona tiossemicarbazona	Tampão Tris-HCl	$1,61 \times 10^4$	SILVA et al., 2013
3-(4-bromofenil)-1-piridin-2-ilprop-2-eno-1-ona tiossemicarbazona		$2,74 \times 10^3$	
epirubicina	H ₂ O	$3,4 \times 10^4$	CHARAK et al., 2011
3-fenil-1-piridin-2-ilprop-2-eno-1-ona tiossemicarbazona		$2,52 \pm 0,21 \times 10^3$	
3-(4-clorofenil)-1-piridin-2-ilprop-2-eno-1-ona tiossemicarbazona	Tampão Tris-HCl	$1,61 \pm 0,22 \times 10^4$	SILVA et al., 2013
3-(4-bromofenil)-1-piridin-2-ilprop-2-eno-1-ona tiossemicarbazona		$2,74 \pm 0,47 \times 10^3$	
sertralina	Tampão Tris-HCl	$5,11 \times 10^4$	DORRAJI et al., 2013
nitazoxanida	Tampão fosfato	$5,0 \times 10^5$	RADI; EL-NAGGAR; NASSEF, 2014
doxorubicina	Tampão fosfato	$3,2 \times 10^4$	HAJIAN et al., 2009
	Tampão Tris-HCl	$3,48 \times 10^5$	LUÍS, 2011
brometo de etídio	Tampão	$1,23 \pm 0,07 \times 10^5$	DIMIZA et al., 2011

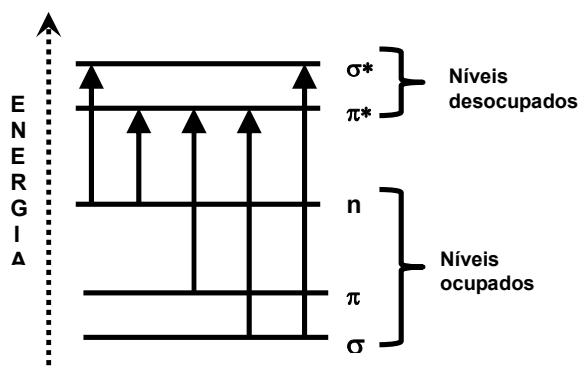
Fonte: Autora, 2014.

1.5.1 Fundamento

A energia total de uma molécula é a soma de suas energias eletrônica, vibracional e rotacional. A absorção de energia na região do ultravioleta produz modificações da energia eletrônica da molécula em consequência de transições dos elétrons de valência (SILVERSTEIN et al., 1994).

Quando uma molécula absorve energia, um elétron é promovido de um orbital ocupado para um orbital desocupado de maior energia potencial. A transição mais provável é do orbital de maior energia (HOMO) para o orbital desocupado de menor energia (LUMO). Na maioria das moléculas, os orbitais ocupados de menor energia são os σ (ligações sigma). Os orbitais p ficam em níveis de energia um pouco mais altos, e os pares isolados, ou orbitais não ligantes (n), ficam em energia ainda mais altas. Os orbitais desocupados ou antiligantes (p^* e σ^*), são os de maior energia (Figura 19) (PAVIA et al., 2010).

Figura 19 - Níveis de energia eletrônica e transições.



Fonte: Adaptado de Pavia et al, 2010.

A relação entre a energia absorvida em uma transição eletrônica e a frequência (ν), o comprimento de onda (λ) e o número de onda ($\bar{\nu}$) da radiação que produz a transição é:

$$\Delta E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} = h\bar{\nu}c$$

onde h é a constante de Planck, c é a velocidade da luz e ΔE é a energia absorvida pela molécula na transição eletrônica entre um estado de menor energia (estado fundamental) e um de maior energia (estado excitado). A energia absorvida depende

da diferença entre os dois estados, quanto menor, maior será o comprimento de onda de absorção (SILVERSTEIN et al., 1994).

Além do princípio da técnica de espectroscopia no UV-Vis, uma esplanção sobre o fundamento de fluorescência também é importante, visto que o presente trabalho também contém metodologia que envolve essa técnica, facilitando o entendimento dos processos ocorridos.

1.6 Fluorimetria

O fenômeno de fluorescência é um tipo de luminescência, caracterizado pela absorção de radiação em um determinado comprimento de onda ou grupo de comprimentos de onda e a re-emissão em um diferente comprimento de onda. O comprimento de onda de excitação é, geralmente, menor do que o comprimento de onda de emissão, como descrito pela Lei de Stokes de 1852.

Wyszecki (1972) descreveu que, em uma molécula, os níveis energéticos dos elétrons são bem definidos e a elevação a níveis mais altos ocorre através da absorção seletiva da radiação pela molécula. Um elétron no nível fundamental é elevado a um nível superior por meio da absorção de uma certa quantia de energia, de um quantum ou fóton $h\nu$ onde h é a constante de Planck (6.626×10^{-34} Js) e ν é a frequência da luz absorvida. A frequência ν tem uma relação inversa com o comprimento de onda λ , de acordo com a relação: $\nu = c/\lambda$, onde c é a velocidade da luz ($c = 299.792.458$ m/s). Conforme essa relação, a frequência é inversamente proporcional ao comprimento de onda, ou seja, entre a energia necessária para a elevação de um elétron a um nível energético superior e o comprimento de onda de absorção.

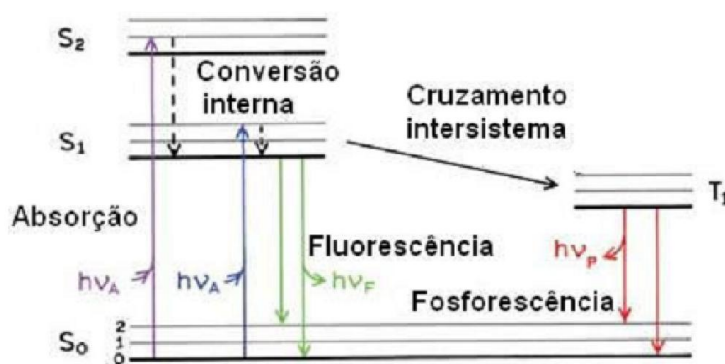
Os níveis energéticos são muito instáveis e rapidamente a molécula retorna ao seu nível energético fundamental. O retorno pode ocorrer de três formas, como fluorescência, fosforescência ou como transição sem radiação.

O diagrama de Jablonski (Figura 20) é conveniente para visualizar, de um modo simples, os possíveis processos: absorção de fótons, conversão interna, fluorescência, cruzamento intersistema, fosforescência, fluorescência com retardo e

transições tripleto-triplete. Os estados eletrônicos singletos são representados por S_0 (estado eletrônico fundamental), S_1 , S_2 , e estados tripletos, T_1 , T_2 , ... Níveis vibracionais são associados com cada estado eletrônico.

É importante perceber que a absorção é muito rápida ($\cong 10^{-15}$ s) em relação a todos os outros processos, não há deslocamento concomitante do núcleo de acordo com o princípio de Franck-Condon (uma transição eletrônica ocorre preferencialmente sem mudanças nas posições dos núcleos atômicos nas moléculas e em seu ambiente) (VALEUR, 2005).

Figura 20 - Diagrama de Jablonski.



Fonte: LAKOWICZ, 2006.

As setas verticais correspondem ao início da absorção a partir do nível mais baixo de energia vibracional de S_0 , porque à temperatura ambiente a maioria das moléculas está neste nível. A absorção de um fóton pode levar a molécula para um dos níveis vibracionais de S_1 , S_2 , Dentre os possíveis processos de desexcitação a emissão de fótons que acompanha a relaxação $S_1 \rightarrow S_0$ é chamada de fluorescência. Deve ser enfatizado que, apesar de algumas exceções, a emissão de fluorescência ocorre a partir de S_1 e suas características (exceto polarização) não dependem do comprimento de onda de excitação (considerando que somente exista uma espécie no estado fundamental).

1.7 Justificativa de execução

Tendo em vista a importância do estudo da interação entre compostos com interesse biológico e a macromolécula de DNA, o presente trabalho busca através de métodos de eletroquímica clássica, eletroforese, microbalança de cristal de quartzo, espectroscopia no UV-Vis e fluorescência, investigar e compreender a relação existente entre os compostos estudados e o CT-DNA. Assim, cada metodologia nos fornece informações, que, em conjunto, permitem mapear as principais vias de reatividade de compostos em relação ao DNA.

Em estudos anteriores do grupo de eletroquímica, o composto P41 se mostrou promissor em estudos farmacológicos com células tumorais, como também provocou fragmentação em DNA em mais de 30% na progressão do ciclo celular de HL-60 por citometria de fluxo (OLIVEIRA, 2011). Buscando compreender se seu mecanismo de ação antitumoral está diretamente relacionado à reatividade ao DNA, foram utilizadas diversas técnicas. Além destes, outros derivados ferrocênicos do tamoxifeno e da benzo-hidrazida foram avaliados e suas constantes espectroscópicas comparadas.

2 OBJETIVO

2.1 Geral

Investigar a interação de derivados ferrocênicos e seus precursores orgânicos com o DNA, por meio do emprego de técnicas eletroquímicas e espectrofotométricas, a fim de propor mecanismos de ação biológica via interação com DNA e possível reatividade dos compostos ao DNA.

2.2 Específico

Investigar a possível interação de derivados ferrocênicos com DNA, através de técnica eletroanalítica de pulso diferencial, utilizando biossensores de DNA e por balança eletroquímica de cristal de quartzo (MECQ);

Avaliar a relação entre os resultados obtidos com os biossensores e métodos de análise tradicionais, como eletroforese em gel, espectroscopia no UV-Vis e fluorescência;

Quantificar o dano (efeito da concentração da espécie bioativa).

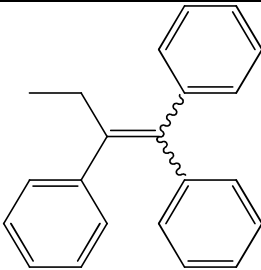
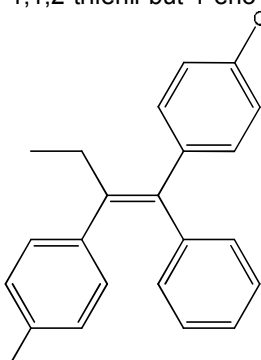
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes e Solventes

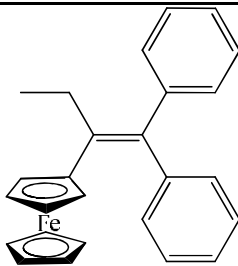
Os derivados ferrocifênicos e os precursores orgânicos foram gentilmente cedidos pela Dra. Elizabeth Hillard do Laboratório Charles Friedel da Escola Nacional Superior de Paris – França e pelo Dr. Diogo Lúcio, do Instituto Gonçalo Muniz, FIOCRUZ, Salvador. A análise estrutural dos mesmos foi realizada com base em métodos físico-químicos habituais e encontram-se publicados, conforme listagem na Tabela 4

Todos os ensaios foram realizados no Laboratório de Eletroquímica da UFAL, com exceção da eletroforese, feita no Laboratório de Química Bio-inorgânica da UFMG.

Tabela 4 - Compostos analisados.

Código	Fórmula estrutural e Nomenclatura	MM (g.mol ⁻¹)	Referência
P365	 <p>1,1,2-trifenil-but-1-eno</p>	284,4	SCHNEIDER et al., 1982
P92	 <p>1,2-Bis-(4-hidroxifenil)-1-fenil-but-1-eno</p>	316,39	YU et al., 2003

P41

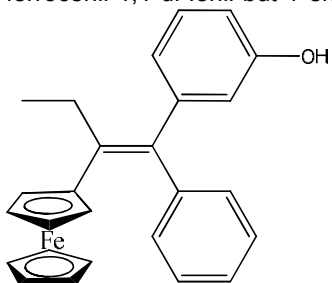


392,3

HILLARD et al., 2007

2-ferrocenil-1,1-di-fenil-but-1-eno

P25

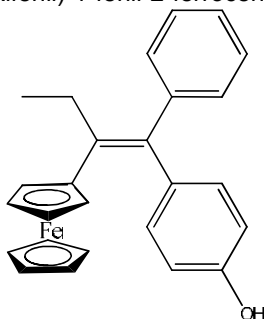


408,31

HILLARD et al., 2007

1-(3-Hidroxifenil)-1-fenil-2-ferrocenil-but-1-eno

P85

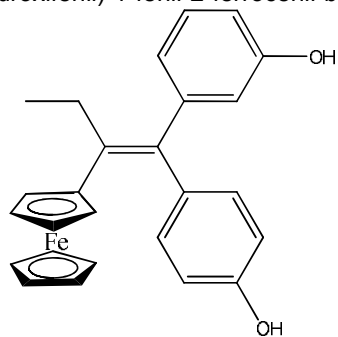


408,31

TOP et al., 2003

1-(4-Hidroxifenil)-1-fenil-2-ferrocenil-but-1-eno

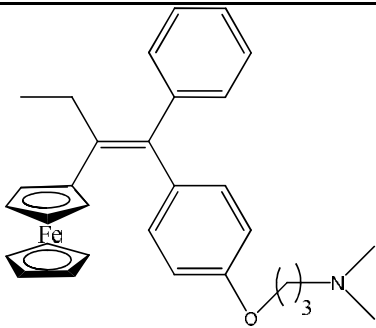
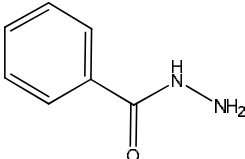
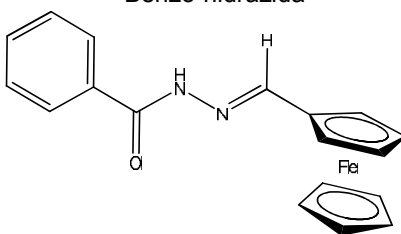
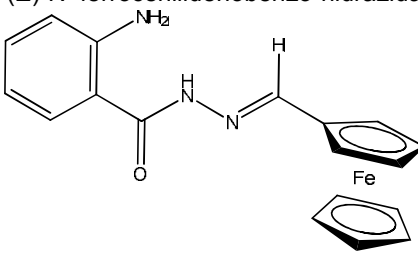
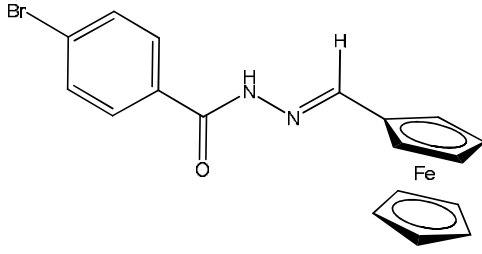
P26

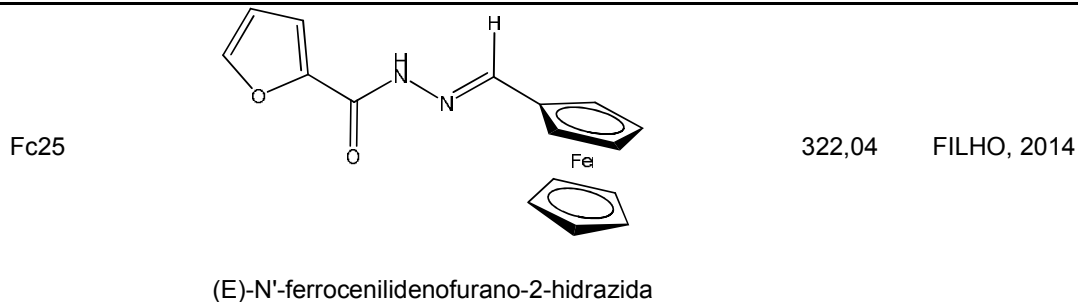


424,31

HILLARD et al., 2007

2-Ferrocenil-1-(3-hidroxifenil)-1-(4-hidroxifenil)-but-1-eno

P15	 <p>1-[4-(3-Dimetilaminopropoxi)fenil]-1-(4-hidroxifenil)-2-ferrocenil-but-1-eno</p>	509,5	TOP et al., 2003
H3	 <p>Benzo-hidrazida</p>	136,06	FILHO, 2014
Fc3	 <p>(<i>E</i>)-<i>N'</i>-ferrocenilidenobenzo-hidrazida</p>	332,06	FILHO, 2014
Fc5	 <p>(<i>E</i>)-<i>N'</i>-ferrocenilideno-2-aminobenzo-hidrazida</p>	347,07	FILHO, 2014
Fc10	 <p>(<i>E</i>)-<i>N'</i>-ferrocenilideno-4-bromobenzo-hidrazida</p>	409,97	FILHO, 2014



Todos os reagentes químicos utilizados nas análises e listados Tabela 5 foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas em água grau Milli-Q (18 MΩ cm).

Tabela 5 - Lista de reagentes com o laboratório de aquisição.

Reagentes	Aquisição
ferroceno (Fc)	Sigma Aldrich
trizma hidrocloreto	(Steinheim, Germany)
tris-Borato-EDTA	
hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etil-carbodiimida (EDC)	
dimetilformamida (DMF)	
agarose	
ácido desoxirribonucléico (<i>dsDNA</i>) sal sódico de timo de bezerro	
brometo de etídio	
DNA plasmídico pUC19	
hidrocloreto de 2-aminoetanotiol (AET)	TCI américa.- U.S.A.
ácido acético (HOAc)	Cromoline®
ácido clorídrico (HCl)	
acetato de sódio (NaOAc)	Vetec Química Fina Ltda
fosfato de sódio diidratado (Na ₂ HPO ₄)	(Rio de Janeiro, BR)
fosfato de sódio monoidratado (NaH ₂ PO ₄)	

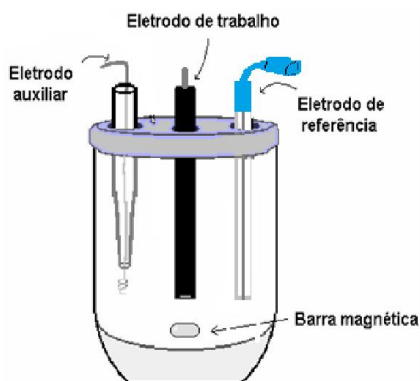
3.2 Estudo Eletroquímico

As medidas eletroquímicas foram realizadas através do equipamento potenciostato/galvanostato, PGSTAT (AUT73222) da Autolab®. A verificação do pH das soluções tampão foi realizado em pHmetro da Quimis.

Para os estudos eletroquímicos utilizou-se um sistema de três eletrodos (Figura 21): eletrodo de carbono vítreo CV (BAS, diâmetro 1,6 mm) como eletrodo de trabalho; eletrodo de fio de platina, como auxiliar; e Ag|AgCl|Cl⁻ (saturado), como eletrodo de referência.

Os gráficos processados foram tratados utilizando o programa Microlab Origin 6.0.

Figura 21 - Sistema com os três eletrodos para análises eletroquímicas.



Fonte: Autora, 2014.

O eletrodo de carbono vítreo (BAS) passou por uma limpeza mecânica antes de cada varredura de potencial. Foi polido com alumina ($0,3 \mu\text{m}$) e lavado abundantemente com água, antes de ser levado ao ultrassom por 30 s em etanol, para remoção das partículas residuais na superfície do eletrodo.

Após o procedimento de limpeza, foi realizado o teste com a sonda ferricianeto de potássio $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, para verificar a área eletroativa do eletrodo, assim como a eficiência do polimento. Em seguida, após lavagem com água grau Milli-Q os eletrodos foram utilizados no estudo eletroquímico com DNA.

3.2.1 Estudos em meio prático

Os estudos eletroquímicos em meio prático foram realizados em solução de tampão acetato (pH 4,5, força iônica $1,0 \text{ mol L}^{-1}$) preparados com acetato de sódio (NaAcO) e ácido acético (HAcO), dissolvidos em água purificada em um sistema Milli-Q Millipore. Experimentos voltamétricos com o biossensor de *dsDNA* e *ssDNA*

em solução foram realizados em meio misto aquoso, tampão acetato pH 4,5 e 30% álcool etílico P.A.

3.2.2 Preparo e aplicação do biossensor de *dsDNA*

Para a produção do gel de *dsDNA*, foram pesados em uma cápsula plástica 12 mg de *dsDNA* sem seguida foi adicionado 1 mL de tampão acetato pH 4,5, para solubilização. Posteriormente, a capsula foi deixado na geladeira entre 2 à 8°C, por 48 h para homogeneização e evitar degradação pelo calor.

O eletrodo de carbono vítreo foi polido com suspensão de alumina na gramatura de 1 e 0,3 micra. Para obtenção da área eletroativa foram realizados experimentos de Voltametria Cíclica nos potenciais de -0,3 à 0,6 V, numa solução de ferricianeto de potássio 1,0 mmol L⁻¹ em KCl, $v = 10$ mV, seguida de Voltametria de Pulso Diferencial nos mesmos parâmetros, onde para cada novo biofilme faz-se esse procedimento, devendo o eletrodo manter o mesmo perfil de pico na VPD

Fez-se cinco varreduras com condicionamento de 120 s sem aplicação de potencial por VPD nos potenciais de 0,0 à 1,4 V, $v = 5,0$ mV s⁻¹ e amplitude de 0,05 V; valores também usados para os estudos eletroquímicos com DNA, etapa justificada pela geração de cargas positivas na superfície do eletrodo, o que favorece as respostas do biossensor pela interação destas com os grupos fosfatos do DNA que apresentam natureza negativa. São adicionados 10 μ L do gel de *dsDNA* sobre a superfície do eletrodo de CV limpo, com subsequente secagem com fluxo de argônio (Ar) antes da realização dos experimentos. O eletrodo modificado é imerso em 5 mL de tampão acetato + 30% de etanol P.A., pH 4,5, sendo este o branco.

Um novo eletrodo de *dsDNA* foi confeccionado, seguindo-se os mesmos procedimentos. O mesmo é imerso em tampão acetato com 30% de etanol, adicionado da substância a ser avaliada a uma concentração pré-determinada. Antes das análises voltamétricas, o eletrodo é deixado em contato com a solução por 10 min, sem agitação.

3.2.3 Preparo e aplicação do ssDNA

Para a obtenção do ssDNA, 3 mg de CT-DNA foram pesados em um tubo e a este adicionado 1 mL de HCl 1,0 mol L⁻¹. Após fechamento, o tubo permaneceu 1h em banho-maria a 100 °C. Imediatamente após, adicionou-se 1 mL de NaOH 1,0 mol L⁻¹, para neutralizar, e em um balão de 10 mL, o volume foi completado com tampão acetato pH 4,5.

O ssDNA em solução tampão acetato com 30% etanol é o branco, exibindo os resíduos das bases guanina e adenina, quando realizados ensaios de VPD. A esta solução foi adicionado o analito, deixado em contato por 10 min. Com relação aos parâmetros eletroanalíticos, a técnica utilizada foi a VPD, na faixa de potencial de 0,0 à +1,4 V vs Ag|AgCl|Cl⁻, $v = 5,0 \text{ mV s}^{-1}$ e amplitude de 0,05 V.

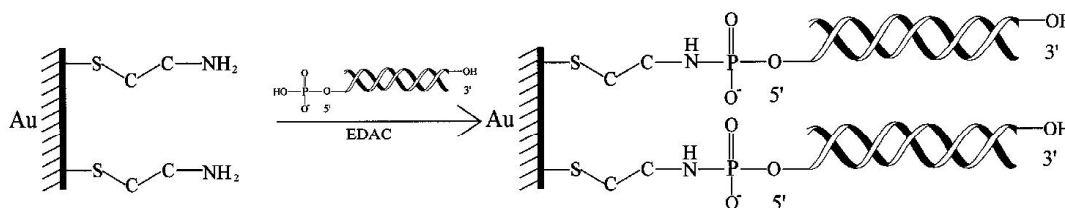
3.2.4 Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo (MECQ)

Para o estudo foi desenvolvido um biossensor de dsDNA monitorado por MECQ (FERREIRA, 2013). Inicialmente foi observada a frequência de oscilação de um cristal de quartzo ao ar. Em seguida, uma solução aquosa 0,01 mol L⁻¹ de hidrocloreto de 2-aminoetanotiol (AET) foi colocada na cela da microbalança, cuidadosamente desaerada com Ar e isolada, a formação desta monocamada foi acompanhada pelo tempo de 3 h; ao fim, foi retirada e cuidadosamente lavada com água deionizada, sendo obtida a SAM de AET (Figura 22).

A SAM de AET foi então ativada com cloridrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etil-carbodiimida (EDC) (1,0 mg.mL⁻¹) em uma solução de dsDNA (1,0 mg.mL⁻¹) em tampão acetato pH 5,4. Esta solução permaneceu na cela por 1 h, sendo aplicado um potencial de 0,0 V, desta forma, obteve-se a SAM de AET/dsDNA, que foi colocada em contato com a solução do analito na concentração de $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em tampão Tris-HCl e NaCl, ambos a 5,0 mmol L⁻¹ e 30% de etano P.A., condição mantida nas três etapas do experimento. A interação da substância de interesse biológico com o DNA foi monitorada através da variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo por 2 h, sem aplicação de potencial. Todos os experimentos foram realizados em temperatura de 25 °C.

O EDC é usado para mediar a formação de ligação entre os grupos terminais hidroxila, aminas ou carboxila e os grupos fosfato do DNA (ZHAO et al., 1996). Neste estudo, o EDC foi usado para promover a condensação entre o grupo 5'-fosfato terminal ou 3'-hidroxi-terminal do DNA e o grupo amino-terminal da SAM, resultando na imobilização de DNA na superfície do cristal, como está representado na Figura 22.

Figura 22 - Representação da imobilização covalente de dsDNA em SAM de AET numa superfície de ouro, com amina como grupo terminal.



Fonte: Zhao et al., 1999.

Objetivando comprovar a formação da monocamada auto-organizada sobre o cristal de Au/TiO₂, foi registrado o voltamograma por VC da dessorção para estimar a quantidade de tióis adsorvidos na superfície do ouro. A dessorção eletroquímica foi realizada em solução de KOH 0,5 mol L⁻¹, variando o potencial de 0,1 V a -1,2 V com velocidade de 0,05 V.s⁻¹.

O pico de redução observado relaciona-se à redução do tiol adsorvido, segundo a equação 5 (ROJAS et al., 1995; BOLLO et al., 2003),



onde RS é um alceno tiol. Esse comportamento constitui uma forte evidência do rompimento da ligação RS-Au, e pode ser utilizado para o cálculo do excesso superficial da camada de AET na superfície do cristal de ouro utilizando a equação 6 (CANCINO, 2008),

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA} \quad \text{Eq. 6}$$

sendo, Γ o excesso superficial (mol cm⁻²), Q representa a carga medida em C (Coulomb), obtida pela integração da área do pico de dessorção, multiplicado pelo

inverso da velocidade de varredura, n o número de elétrons, F é a constante de Faraday de 96.500 C que corresponde ao número de avogrado multiplicado pela carga do elétron e A é a área eletroativa do eletrodo de ouro (cm^2), o disco de quartzo utilizado apresenta 10 mm de diâmetro, resultando em $0,785 \text{ cm}^2$.

3.3 Espectroscopia de Absorção (Titulação UV)

Com o intento de avaliar inicialmente a interação entre os compostos do estudo e a molécula de DNA, foram utilizados ensaios de espectroscopia de absorção UV-Vis, utilizando DNA de timo de bezerro.

Optou-se por manter a concentração de DNA constante e variar a das substâncias. Antes de cada leitura o sistema foi mantido sob agitação constante por 15 minutos sob 25°C , temperatura escolhida com base em estudos com isotermas (HEGDE et al., 2012).

O estudo foi feito em tampão Tris-HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ à 30% etanol P.A. com as substâncias mantidas em solução estoque etanólica a 2 mmol L^{-1} . O DNA foi preparado adaptando a metodologia já descrita (JANJUA et al., 2011; SAITO et al., 2012; AGARWAL et al., 2013), por dissolução de 12 mg.mL^{-1} de CT-DNA em tampão acetato (pH 4,5, $1,0 \text{ mol L}^{-1}$). A solução-mãe foi mantida a 8°C durante 24 h, e agitou-se em intervalos determinados para garantir a homogeneidade da solução de DNA final; desta foi retirada uma alíquota de $10 \mu\text{L}$ e dissolvida para o volume do estudo.

A concentração de CT-DNA, por nucleotídeo, foi inicialmente determinada pela leitura de absorvência a 260 nm em espectrofotômetro NanoDrop de arranjo de diodos Hewlett-Packard 8453A, e utilização do coeficiente de extinção molar de $6.600 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, para CT-DNA (MAHLER et al., 1964) com posterior aplicação da lei de Lambert-Beer, equação 7:

$$A_0 = \epsilon \cdot l \cdot D_t$$

Eq. 7

em que A_0 corresponde à absorvência, ε ($\text{mol L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) ao coeficiente de extinção molar, l (cm) ao percurso ótico e D_t (mol L^{-1}) à concentração da espécie (KANAKIS et al., 2009).

As razões entre as absorvências em 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}) do espectro de DNA foram calculadas antes de iniciar os estudos, sendo um indicativo de DNA livre de contaminação por proteína os que apresentam valores entre 1,80 e 1,9. O mesmo para 260 e 230 nm (A_{260}/A_{230}) razão que permite avaliar se o DNA está livre de contaminantes, como sais e compostos orgânicos, devendo apresentar razão inferior à 2 (HEGDE et al., 2012; LUIS, 2011). Em todo o estudo, o DNA utilizado estava dentro da margem de pureza, isento de contaminação.

A constante de ligação K do complexo composto–DNA foi calculada espectrofotometricamente aplicando uma adaptação da equação de Benesi–Hildebrand para a banda II, 260nm, equação 14, obtida mediante cálculos com as equações abaixo (AGARWAL et al., 2013).

A absorvência da solução (A_t), que compreende de concentração total de DNA (D_t), juntamente com a concentração total do analito ou substrato (S_t) é

$$A_t \rightarrow \varepsilon_D l[D] + \varepsilon_S l[S] + \varepsilon_{DS} l[DS] \quad \text{Eq. 8}$$

em que $[D]$ é a concentração de DNA não complexado, $[S]$ é a concentração do substrato não complexado, $[DS]$ é a concentração do complexo DNA-substrato, ε_S é a absorvência molar da substância e ε_{DS} é a absorvência molar do complexo. Depois de combinar com o balanço de massa, a equação de absorvência pode ser escrita como:

$$A_t \rightarrow \varepsilon_D lD_t + \varepsilon_S lS_t + \Delta\varepsilon_{DS} l[DS] \quad \text{Eq. 9}$$

A absorvência da solução (A), medida em relação à concentração total do analito como referência é:

$$A \rightarrow \varepsilon_D lD_t + \Delta\varepsilon_{DS} l[DS] \quad \text{Eq. 10}$$

A constante de estabilidade (K_{DS}) para a formação do complexo (DS) pode ser dada como:

$$K_{DS} \rightarrow [DS]/[D][S] \quad \text{Eq. 11}$$

Combinando as equações 10 e 11 para a equação de balanço de massa obtem-se:

$$[D] = D_t/(1 + K_{DS}[S]) \quad \text{Eq. 12}$$

Dando:

$$\frac{\Delta A}{l} \rightarrow \frac{D_t K_{DS} \Delta \epsilon_{DS} [S]}{1 + K_{DS} [S]} \quad \text{Eq. 13}$$

Existe uma relação hiperbólica entre a concentração do substrato livre e sua interação com DNA. Tomando o inverso de ambos os lados da equação 13, obtemos uma transformação linear, equação 14.

$$\frac{l}{\Delta A} \rightarrow \frac{1}{D_t K_{DS} \Delta \epsilon_{DS} [S]} + \frac{1}{D_t \Delta \epsilon_{DS}} \quad \text{Eq.14}$$

Assumindo que, D_t é a concentração de DNA total, $\Delta \epsilon_{DS}$ é a absorvidade molar do complexo com balanço de massa de DNA e do substrato em análise, e K_{DS} é a constante de estabilidade para a formação do complexo (DS).

O gráfico gerado pela relação de $1/\Delta A$ vs. $1/[\text{substrato}]$ é linear, dada a equação 14, a constante de ligação pode ser estimada a partir do coeficientes angular e linear da reta.

3.4 Estudos da fluorescência

Uma análise quantitativa do potencial de interação entre os compostos e o DNA foi realizada por titulação fluorimétrica. A técnica baseia-se no deslocamento e decréscimo da fluorescência do BE resultante da competição e deslocamento do BE intercalado no DNA, por um composto que compete pelo mesmo sítio (SILVA et al., 2013).

A concentração da solução estoque de CT-DNA foi inicialmente determinada por UV-Vis e uma solução de brometo de etídio foi preparada, ambos em tampão Triz-HCl (pH 7,2), de modo que, tanto o CT-DNA como o brometo de etídio estivessem à 10 mmol L^{-1} na cubeta, em 10 ou 30% de etanol P.A., dependendo da substância a ser estudada. A concentração das amostras na solução de BE-DNA variou de $10 - 100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (SILVA et al., 2013)

Os experimentos de fluorescência foram realizados em espectrofotômetro RF-5301PC (Shimadzu, Japão). O espectro gerado seguiu os parâmetros de leitura de emissão na faixa de 560 à 750, com $\lambda_{\text{ex.}} = 546 \text{ nm}$ (JENKINS, 1997).

Os cálculos das constantes foram baseados nos dados de fluorescência para $\lambda_{\text{em.}} = 600 \text{ nm}$ à $25 \text{ }^\circ\text{C}$, a constante de extinção de Stern-Volmer, K_{SV} , foi obtida usando a clássica equação de Stern-Volmer, equação 15:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad \text{Eq.15}$$

em que F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e presença do composto avaliado, $[Q]$ é a concentração do composto e K_{SV} é a inclinação obtida pelo ajuste linear entre F_0/F vs $[Q]$.

Os valores da constante de ligação K_a e a estequiometria de ligação n foram calculados usando a equação de Scatchard, equação 16:

$$\text{Log} \frac{F_0 - F}{F} = \text{Log} K_a + n \text{Log} [Q] \quad \text{Eq.16}$$

onde K_a é o antilogarítmo do intercepto e n é o coeficiente angular obtido da reta gerada da relação entre $\text{log}[(F_0-F)/F]$ e $[Q]$.

A constante de ligação aparente também foi calculada pela equação 17:

$$K_{BE}[BE] = K_{app}[Composto] \quad \text{Eq.17}$$

Onde K_{BE} é $1,0 \times 10^7 \text{ L mol}^{-1}$, $[BE] = 10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e $[Composto]$ é a concentração do composto quando a intensidade de fluorescência do BE está

reduzida à 50%. Este valor é adquirido da relação linear entre F_0/F vs $[Q]$, quando $F_0/F = 2,0$.

3.5 Eletroforese em Gel de Agarose

Para o ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética, foi utilizado o DNA plasmídico pUC19, em gel de agarose à 1% em tampão Tris-HCl pH 7,2, a corrida eletroforética foi realizada em tampão TBE 0,5X concentrado.

Os compostos foram previamente solubilizados em DMF, respeitando o limite de 5% de DMF na concentração final, e incubados com DNA ambos a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão Tris-HCl 7,2, por 24 h à 37°C (SILVA et al., 2013). Após incubação uma alíquota de $10 \mu\text{L}$ da mistura de $5 \mu\text{L}$ de Loading die e $10 \mu\text{L}$ de cada uma das amostras foram adicionados nos poços.

A fonte utilizada foi a Eletrophoresis Power Supply- EPS 601GE, nos parâmetros de 5 W; 54 mA e 100 V, num tempo de corrida de 30 min. Para revelação, foi utilizada uma alíquota de $80 \mu\text{L}$ de solução de brometo de etídio (10 mg/mL) em 500 mL de TBE 0,5X concentrado e nela deixado o gel por uma hora. A leitura do gel foi feita em um transiluminador UV.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudos eletroquímicos

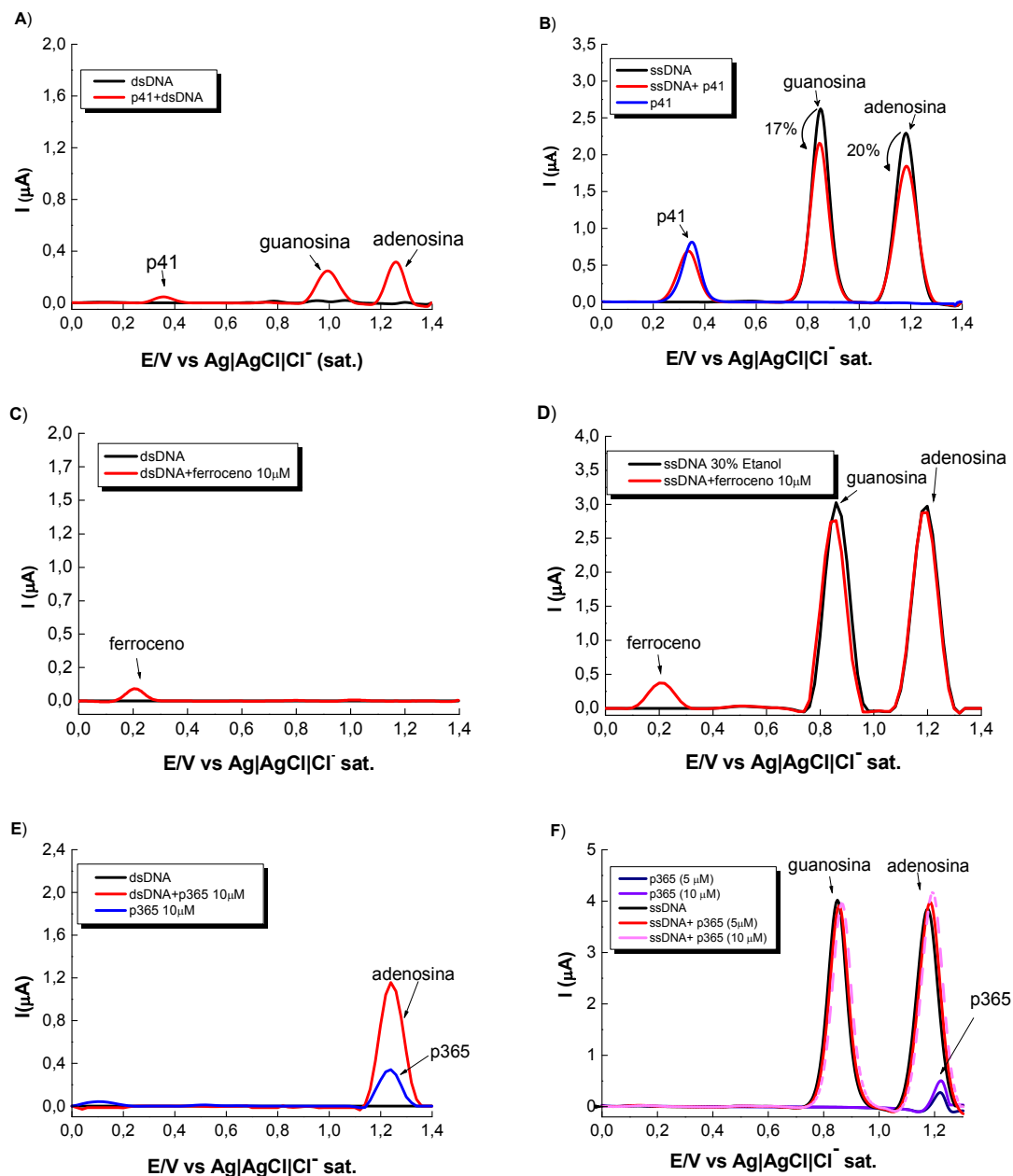
4.1.1 Biossensor de *dsDNA* e *ssDNA* em solução

O CT-DNA foi utilizado para estudos do comportamento eletroquímico, por voltametria de pulso diferencial em eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de *dsDNA* e com *ssDNA* em solução, conforme Figura 23. Assim, nos referimos às bases como seus nucleosídeos, por estarem ligadas covalentemente a pentose, e não como uma mistura de bases livres, pois não se trata de uma mistura de bases livres. Os analítos de escolha foram o P41, seu correspondente composto orgânico, o P365, e o ferroceno usado como substituinte funcional.

Pode-se observar uma mudança no comportamento voltamétrico do *dsDNA*, quando em presença de P41, Figura 23A, sendo este um indicativo de interação com o *dsDNA*, onde além da presença da onda de oxidação de P41, $E_{p_a} = + 0,36$ V, em um processo reversível de oxidação do grupo ferroceno, mostrou o aparecimento das ondas de oxidação características das bases guanina em aproximadamente + 1,0 V e a adenina em + 1,26 V que são os picos diagnósticos.

Os precursores de P41, ferroceno e P365 foram avaliados nas concentrações de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, apresentando potencial de oxidação 0,2 e 1,2 V, respectivamente. Não foi evidenciado interação do ferroceno com *dsDNA*, pelo método, devido a ausência de picos nos potenciais de oxidação correspondentes aos resíduos das bases (Figura 23C), enquanto que P41 interagiu com *dsDNA* (Figura 23E) expondo a adenina à oxidação, mesmo seu sinal de oxidação sobrepondo-se ao da base, observa-se uma diferença de corrente considerável para admitir interação (BARROS et al., 2012).

Figura 23 - Voltamogramas de pulso diferencial de biossensor de *dsDNA* e *ssDNA* em solução na ausência e presença (A) $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de P41 (B) $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de P41, (C) e (D) $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ferroceno, (E) e (F) $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de P41, $v=10 \text{ mV/s}$.



Fonte: Autora, 2014.

O voltamograma do *ssDNA* em solução mostra os dois picos característicos referentes à oxidação do resíduo de guanina e adenina nos potenciais 0,8 e 1,1 V respectivamente. Quando P41 é adicionado à solução, ocorre diminuição da I_{p_a} de ambas as bases nitrogenadas, 17 e 20% guanina e adenina respectivamente,

cálculo com base na lp_a sem a presença do analito, devendo ser realizados estudos com padrões como doxorubicina para avaliar a significância dos valores de diminuição (Figura 23B). O resultado indica interação com as bases expostas do ssDNA, diminuindo sua disponibilidade à oxidação.

Tanto em presença de ferroceno como de P41 no meio, não há diminuição perceptível da lp_a dos nucleosídeos, o que caracteriza a ausência de interação direta com os mesmos (Figura 23D e F). Há um aumento do sinal da adenina proporcional à concentração de P41 no meio, sendo esse aumento atribuído à presença do composto cujo potencial de oxidação é próximo ao da adenina. Em relação ao resíduo de guanina, não houve alteração de lp_a . Tais dados sugerem que não há interação significativa entre ferroceno e P41 com as bases do ssDNA, nas concentrações pesquisadas.

Porém, levando em consideração serem essas informações “SIM ou NÃO” quanto à interação, estudos com curvas analíticas utilizando razões molares entre o DNA e o composto, tanto *ds* como ssDNA, são uma boa opção, tornando possível a determinação de constante e esta comparada às obtidas nos estudos espectroscópicos. Com esse intuito, foi testada essa metodologia em eletrodo de carbono vítreo sem sucesso, devido à adsorção do analito na superfície do eletrodo e mesmo após limpeza, houve variação na área eletroativa deste nas concentrações escolhidas. Uma alternativa é reproduzir uma metodologia que descreve um estudo similar com eletrodos descartáveis (RADI; EI-NAGGAR; NASSEF, 2014).

4.1.2 Avaliação da interação de P41 com *ds*DNA por Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo (MECQ).

A Figura 24 mostra o monitoramento em tempo real da formação da SAM de AET pela massa aparente, como também para o *ds*DNA, depositadas sobre um cristal de quartzo recoberto com TiO_2/Au e caracterizado por MECQ.

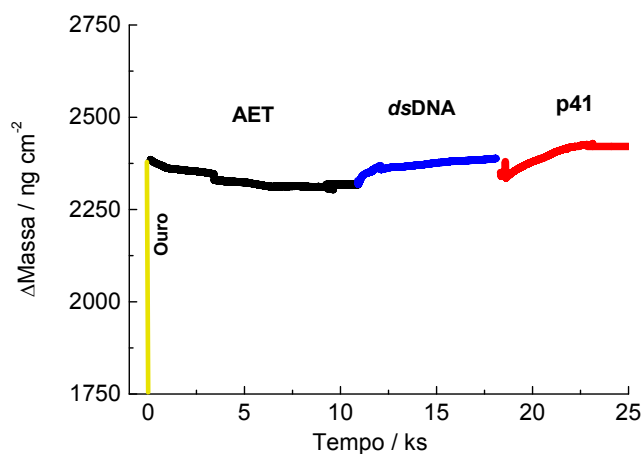
Como o processo envolve deposição de camada a camada, vê-se um aumento progressivo da massa nas três etapas. Inicialmente o resultado sugere um processo de interação do composto com a molécula de DNA, onde a massa após a

adição de P41 aumentou quando comparada ao patamar da massa da SAM AET/*dsDNA*.

Deste experimento foram quantificadas as moléculas por cm^2 do cristal, os valores para AET com $1,2 \times 10^{14}$ moléculas, DNA $5,5 \times 10^8$ moléculas ligadas a SAM de AET que foram depositadas por cm^2 da superfície do ouro, tomando a massa molar do CT-DNA como $6,6 \times 10^7 \text{ g.mol}^{-1}$ e P41 com $6,1 \times 10^{13}$ moléculas que possivelmente interagiram com AET/*dsDNA*.

A SAM de AET/*dsDNA* ainda não está com uma boa deposição de DNA, pois devido a seu alto peso molecular era esperado um aumento mais significativo deste. Isso pode estar relacionado ao processo de lixiviação ou hidrólise do intermediário usado (EDC) para favorecer a ligação fosforamida entre o AET e o *dsDNA* (FERREIRA, 2013).

Figura 24 - Massograma da formação de SAM AET/*dsDNA* e interação com o composto P41 ($2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Cristal de quartzo com cobertura de ouro em amarelo; 2-aminoetanotiol (AET) em preto; AET/*dsDNA* em azul e AET/*dsDNA*/P41 em vermelho.

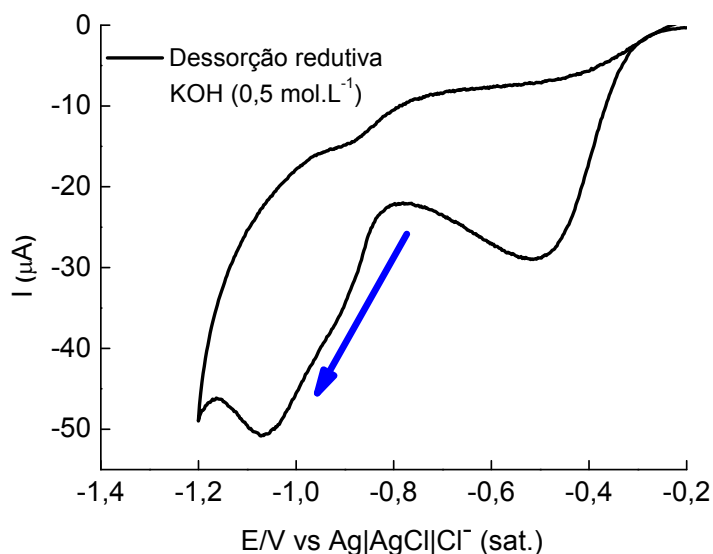


Fonte: Autora, 2014.

A dessorção redutiva da monocamada foi realizada após o procedimento de formação da SAM, para os cálculos de excesso superficial da SAM de AET, mostrou uma onda catódica irreversível $E_{p_c} = -1,07 \text{ V vs. Ag|AgCl|Cl}^- (\text{sat.})$ para a primeira varredura, como mostra a Figura 25, os voltamogramas posteriores mostraram

redução abrupta do sinal. Após a dessorção foi realizado um teste com a sonda ferricianeto de potássio $K_3Fe(CN)_6$ para verificar a área eletroativa do cristal e comparar com a anterior à formação da SAM mostrou uma baixa eficiência do cristal ao tratamento em meio básico (KOH), sendo a reação de Fenton uma alternativa a ser testada para a remoção dos tióis e reutilização dos cristais, dado seu custo.

Figura 25 - Voltamograma cíclico da dessorção redutiva em eletrodo de ouro dos grupos tióis de monocamada mista de AET; KOH 0,5 mol L⁻¹; $\nu = 0,05$ V.s⁻¹.



Fonte: Autora, 2014.

De acordo com os dados experimentais o valor de Γ , obtido da primeira varredura redutiva do cristal modificado, para a dessorção da monocamada de AET apresenta um valor de recobrimento de $6,2 \times 10^{-10}$ mol cm⁻², valor muito semelhante aos descritos $8,46 \times 10^{-9}$ mol cm⁻² (FERREIRA, 2009) e $1,90 \times 10^{-10}$ mol cm⁻² da literatura (CHOI et al., 2005), para SAM's de ciclodextrina tiolada em eletrodo de ouro.

4.2 Análise da interação dos analitos com dsDNA por espectrofotometria

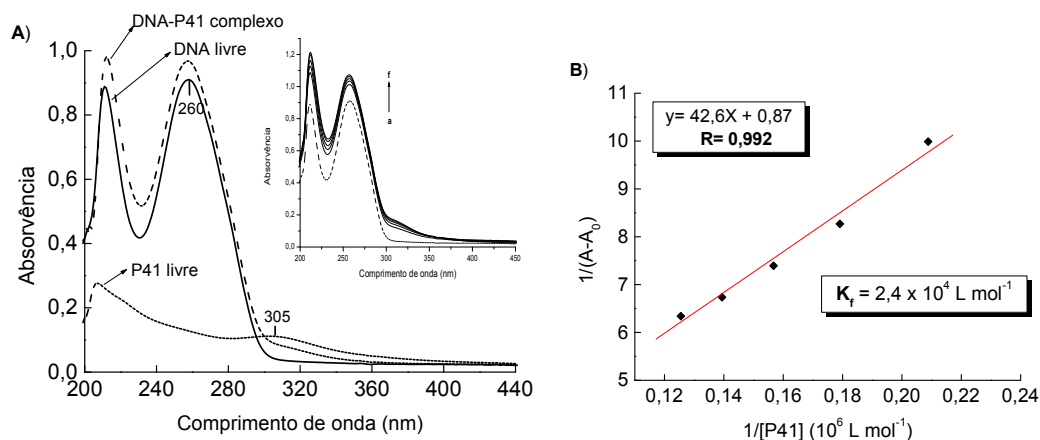
A técnica de titulação espectrofotométrica usada para os estudos de formação de complexo, leva em consideração a formação de um único complexo 1:1 a partir do dsDNA e da substância. Isto porque, se dois ou mais complexos são formados, podem ocorrer sucessivas variações na inclinação do gráfico, podendo mostrar

diferentes absorvidades molares e diferentes constantes de formação (SKOOG et al., 2009).

Dentre os meios testados, o tampão Tris-HCl foi o de escolha para estudo, pois se sabe que este tampão protege o DNA contra a radiação da luz ultravioleta (KEJNOVSKÝ; KYPR, 1993).

O espectro no UV representado na Figura 26A mostra o DNA complexado com P41 em tampão Tris-HCl justificado pelo aumento nos valores de absorção em 260 nm (II banda) quando comparado ao espectro de DNA sozinho, efeito hiperacrômico. Esta é uma clara indicação de que P41 interage e perturba a estrutura do DNA nativo, sugerindo possível intercalação, onde as bases aromáticas ficam mais expostas à radiação UV, resultando num aumento da intensidade da absorção (HEGDE et al., 2012). O efeito da concentração de P41 ($3,2\text{--}8\ \mu\text{mol L}^{-1}$) no perfil espectrofotométrico do dsDNA está apresentado na inserção da Figura 26A.

Figura 26 - A) Espectro de UV para DNA ($130\ \mu\text{mol L}^{-1}$) em ausência e presença de P41 nas concentrações 3,2; 4,0; 4,8; 5,6; 6,4; 7,2 e $8\ \mu\text{mol L}^{-1}$. B) Gráfico dos valores de $1/C$ vs. $1/(A-A_0)$, com o valor de $K_f = 2 \times 10^4\ \text{L mol}^{-1}$ de P41 ao DNA. Onde A_0 é a absorção inicial do DNA livre e A é a absorção nas diferentes concentrações de P41 em 260 nm. C é a concentração de P41 em solução.



Fonte: Autora, 2014.

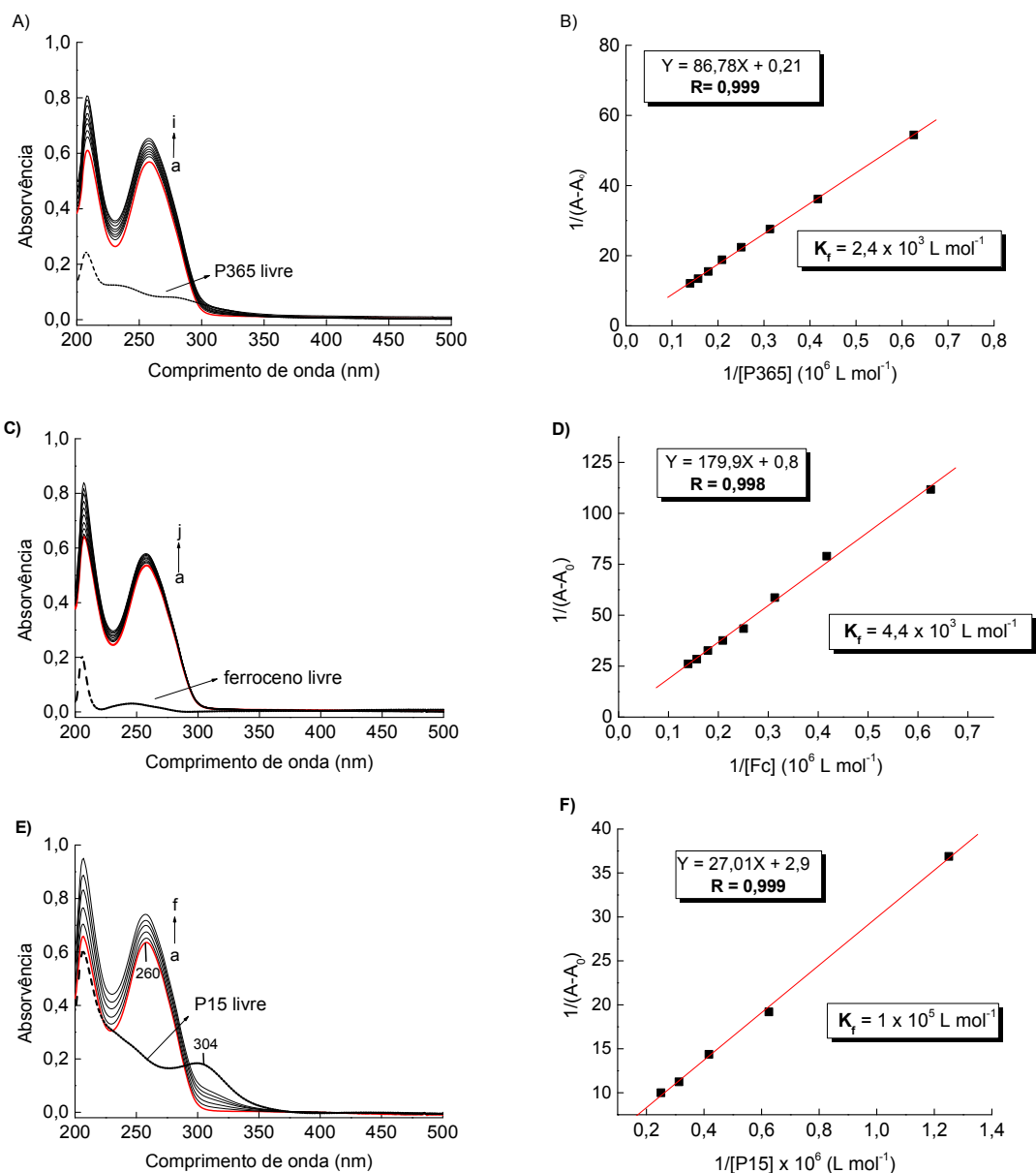
A regressão linear do gráfico duplo recíproco da Figura 26 B foi usada para obter a constante de ligação para esta interação, calculada com valor de $2,4 \times 10^4\ \text{L mol}^{-1}$ indicando que P41 tem afinidade com a dupla hélice do DNA. O valor calculado

é similar a dados registrados na literatura, a partir de substâncias com forte interação pelo DNA, inclusive outras moléculas com ferroceno como substituinte em sua estrutura, conforme Tabela 2 (ordem de grandeza 10^4 e 10^5).

A importância do núcleo ferrocênico em P41 pode ser verificada por comparação com as substâncias P365 e ferroceno. Estes também foram avaliados quanto à sua interação com CT-DNA, com respectivos comportamentos representados na Figura 27. Outro composto também avaliado foi o P15 (Figura 27E e F), por apresentar atividade em linhagem de células tumorais SF-295, HCT-8 e HL-60 com valores de $CI_{50} < 8 \mu\text{mol L}^{-1}$, tão bons quanto P41, e células de MDA-MB, sobre as quais P41 não apresentou atividade (OLIVEIRA, 2011).

Para o estudo com P365, o DNA a $85 \mu\text{mol L}^{-1}$, foi deixado em contato com as seguintes concentrações do composto: 1,6; 2,4; 3,2; 4,0; 4,8; 5,6; 6,4 e $7,2 \mu\text{mol L}^{-1}$. Já com o ferroceno, o DNA estava a $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ e seguiu as mesmas concentrações. Em P15 o DNA estava a $95 \mu\text{mol L}^{-1}$ e suas concentrações foram 0,8; 1,6; 2,4; 3,2 e $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. A escolha das concentrações das amostras deu-se devido à baixa solubilidade, sendo escolhidos os melhores pontos da variação de $0,8 - 8,0 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 27 - Espectro no UV de DNA (a) na ausência e (b-j) em presença de concentrações crescentes de P365 (A), ferroceno (C) e P15 (E). O gráfico dos valores de $1/[\text{Composto}]$ vs. $1/(A-A_0)$ de cada composto está representado em (B), (D) e (F), respectivamente.



Fonte: Autora, 2014.

Pela análise dos espectros acima (Figura 27 A e C), em comparação com os resultados de P41, ambos os precursores (P365 e ferroceno) evidenciaram interação com CT-DNA, o que demonstra um sinergismo, onde P41 tem maior afinidade ao DNA. A literatura traz valores de constante para o ferroceno protonado próximos do obtido. Em tampão fosfato pH 7,2 foi $1,74 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ (IBRAHIM et al., 2002) e $3,45 \times 10^2 \text{ L mol}^{-1}$ em tampão fosfato pH 4,5 (SHAH et al., 2008), porém com

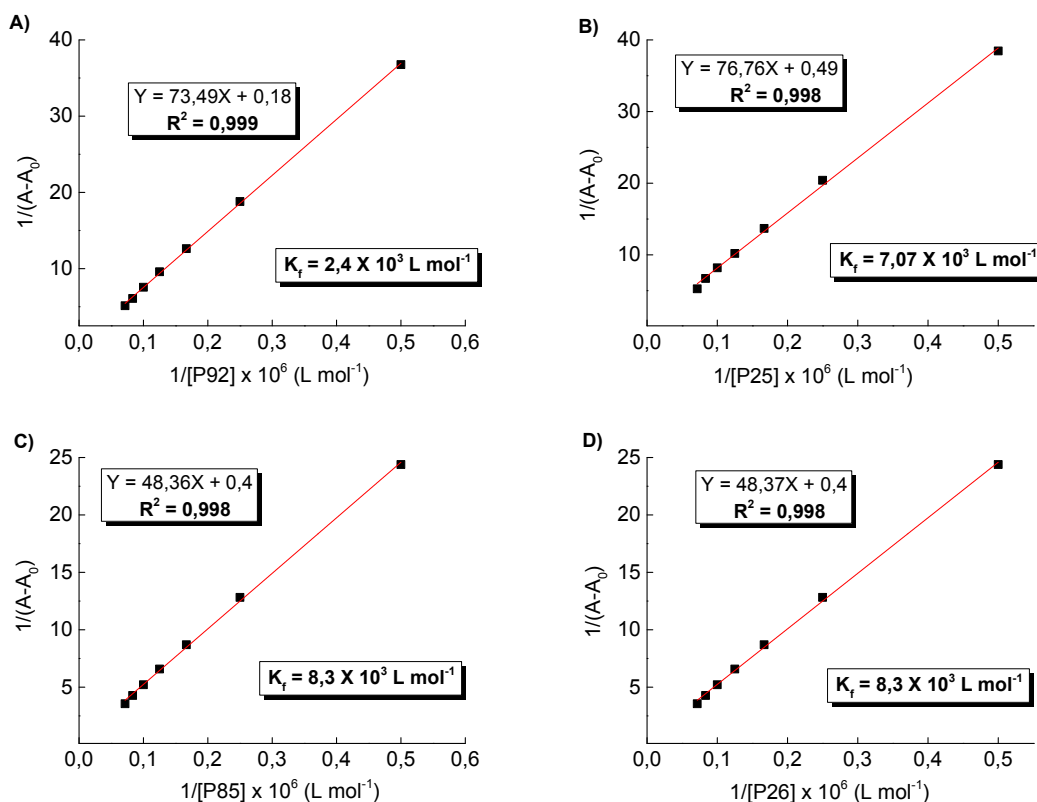
DNA de origens diferentes. As constantes K_f de ligação entre as substâncias estudadas estão na Tabela 6.

Os dados das Figura 27 E e F corroboram com os biológicos, onde P15 é mais reativo que P41 ao DNA. Dadas as informações, diferentes substâncias também foram avaliadas espectrofotometricamente no UV quanto à possível interação do CT-DNA e apresentaram resultados positivos. Foram selecionadas para comparação da estrutura/atividade com P41, sem a presença da cadeia alifática de P15 ($R-O(CH_2)_3N(CH_3)_2$), por atribuir hemólise, mas com presença de hidroxilas em posições diferentes.

Até então, não houve uma atenção quanto à manutenção da quantidade de DNA e variação das substâncias em razão molar, tendo em vista exemplos descritos na literatura (JANJUA et al, 2011; RADI; EI-NAGGAR; NASSEF, 2014). A partir daqui as análises foram realizadas seguindo esses critérios.

Na Figura 28 estão representadas as relações lineares, obtidas a partir de DNA a $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e dos compostos P92, P25, P85 e P26 a 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0 e $14,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. As concentrações foram escolhidas com base na variação de razão molar de 1:10 até 1:1, composto:DNA.

Figura 28 - O gráfico dos valores de $1/[Composto]$ vs. $1/(A-A_0)$ para determinação da constante K_f dos composto P92, P25, P85 e P26 estão representados em (A), (B), (C) e (D), respectivamente.



Fonte: Autora, 2014.

De acordo com os resultados expostos, a Tabela 6 nos auxilia nas correlações, ao mostrar as constantes estimadas por UV-Vis, em ordem decrescente. Vê-se a importância do ferroceno na reatividade ao DNA desta série, quando comparado com P365 e P92, cujas estruturas não apresentam o organometálico, se diferenciando apenas pela presença, em P92, de duas hidroxilas *para*-substituídas Tabela 4. Ambas as moléculas apresentaram o mesmo valor de constante.

Não foram constatadas grandes diferenças de constantes para os derivados ferrocênicos com hidroxilas, sejam *meta* substituídas no anel aromático que está na posição *E* ao ferroceno; *para*-substituídas no anel aromático que está na posição *Z* ao ferroceno; ou ambas. Mas, P25, cuja estrutura tem uma hidroxila *meta* substituída no anel aromático que está na posição *E* ao ferroceno, teve menor constante que P85 e P26, que apresentaram valores idênticos. Em comparação às demais, P41,

que não contém hidroxilas, possui um valor de constante relativamente maior em relação à P25, P85 e P26, sendo um indicativo de que as hidroxilas na estrutura primária não estão diretamente ligadas à reatividade ao DNA. Entretanto deve se considerar que não estão nas mesmas condições de estudo.

Como a Tabela 6 deixa claro, P15 é o composto com maior valor de K_f , o que se deve, provavelmente, à sua cadeia alifática, principal diferença estrutural das demais substâncias.

Tabela 6 - Valores das constantes de ligação K_f dos compostos com CT-DNA, por UV-Vis.

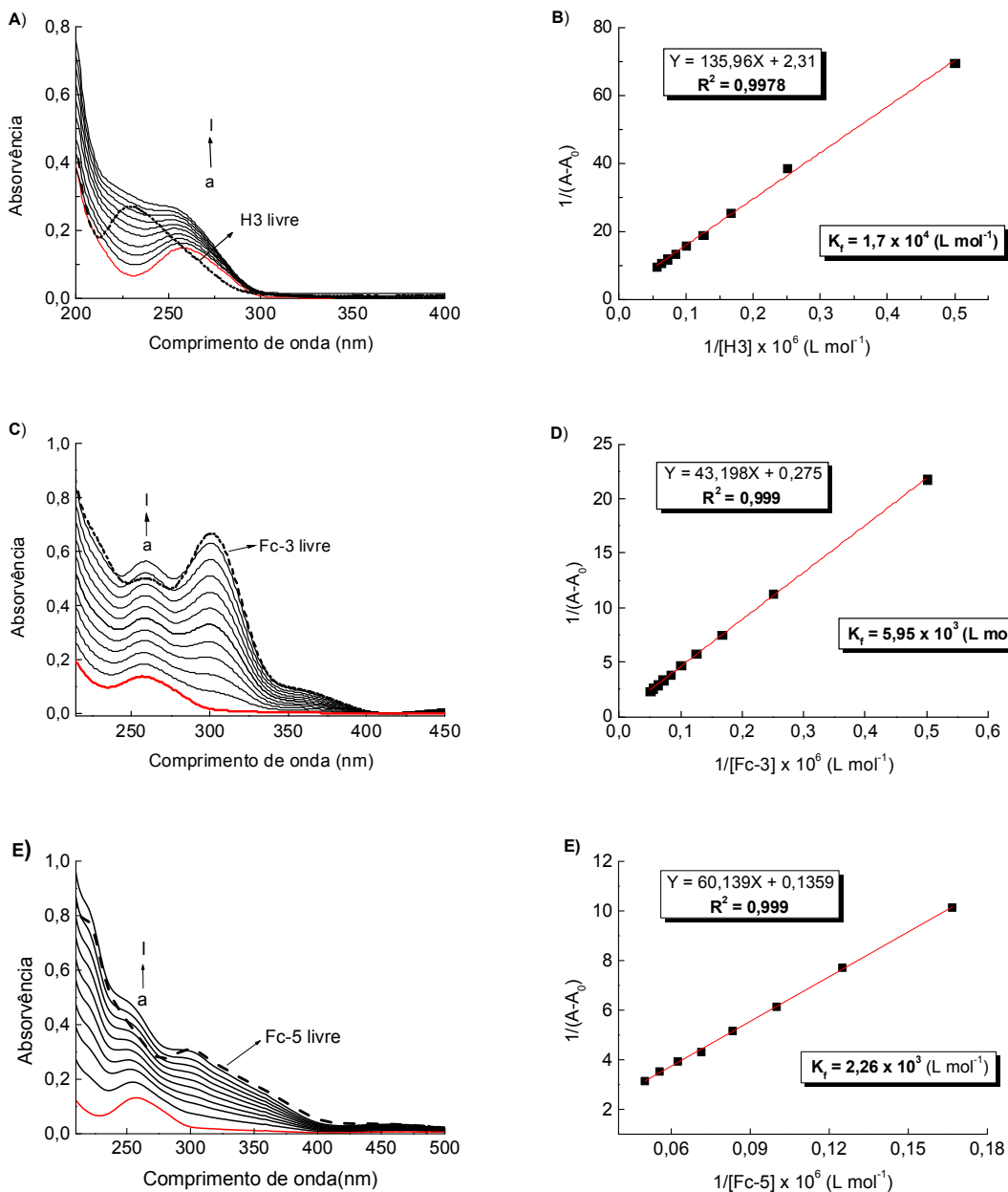
Compostos	K_f (L mol ⁻¹)
P15	1,0 x 10 ⁵
P41	2,4 x 10 ⁴
P85	8,3 x 10 ³
P26	8,3 x 10 ³
P25	6,4 x 10 ³
Fc	4,4 x 10 ³
P365	2,4 x 10 ³
P92	2,4 x 10 ³

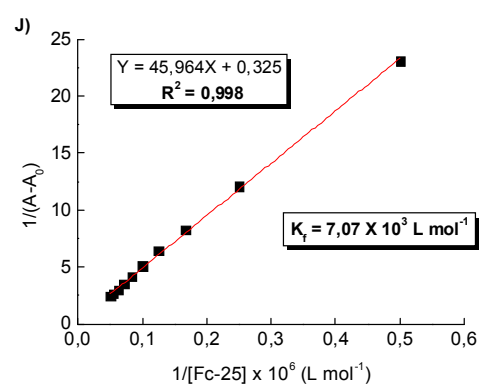
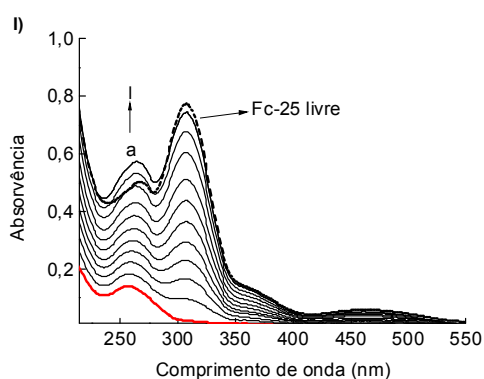
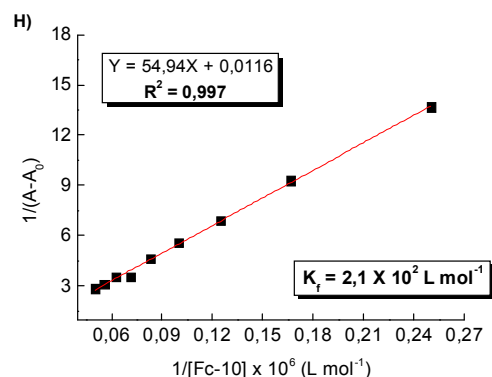
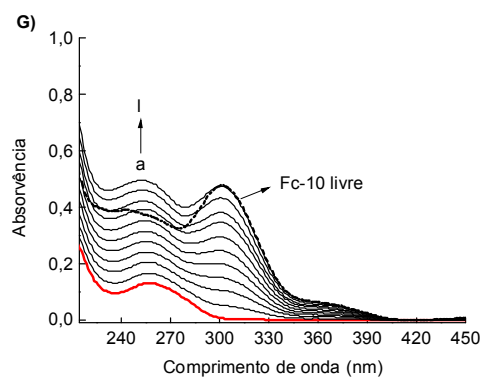
Fonte: Autora, 2014.

Na sequência dos estudos, foi avaliada outra série de compostos ferrocênicos, os derivados de H3 (Figura 28).

O critério de razão molar se manteve e os espectros foram obtidos da solução de DNA a 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e demais compostos variando de 2,0 à 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O perfil dos espectros de DNA na ausência e presença das substâncias é semelhante aos anteriores, exibindo efeito hipercrômico na banda do DNA. Seu aumento pode determinar as constantes K_f para a formação do complexo proposto, segundo as relações lineares da Figura 29.

Figura 29 - (A), (C), (E), (G) e (I) Espectros no UV de DNA $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ na ausência (a) e presença dos compostos H3 e seus derivados nas concentrações 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0; 14,0; 16,0; 18,0; 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (b-l). O gráfico dos valores de $1/[\text{Composto}]$ vs. $1/(A-A_0)$ de cada composto está representado em (B), (D), (F), (H) e (J), respectivamente.





Fonte: Autora, 2014.

As constantes de ligação determinadas acima apresentaram a seguinte ordem: H3 ($1,7 \times 10^4$) > Fc-25 ($7,07 \times 10^3$) > Fc-3 ($5,95 \times 10^3$) > Fc-5 ($2,26 \times 10^3$) > Fc-10 ($2,1 \times 10^2$). Desta série, a substância que evidencia maior valor de afinidade é a precursora H3 que não contém ferroceno, como substituinte estrutural.

De posse das informações adquiridas, outras metodologias foram aplicadas, com o intuito de auxiliar na elucidação do mecanismo de reatividade ao DNA, visto que a eletroquímica mostrou que P41 e P365 interagem com *ds*DNA de tal modo que deixam uma ou as duas bases-diagnóstico passíveis (guanina e adenina) para serem oxidadas, o que não impede o ferroceno de interagir com as demais estruturas do DNA, ou como um todo, por meio de interações mais fracas.

Como a espectroscopia de UV-Vis para DNA é abrangente, não se pode determinar mecanismo de interação direta, apenas um indicativo de intercalação não específica. Para tanto, optou-se por realizar estudos de fluorescência para direcionar ou excluir o mecanismo de intercalação do brometo de etídio para as substâncias supracitadas.

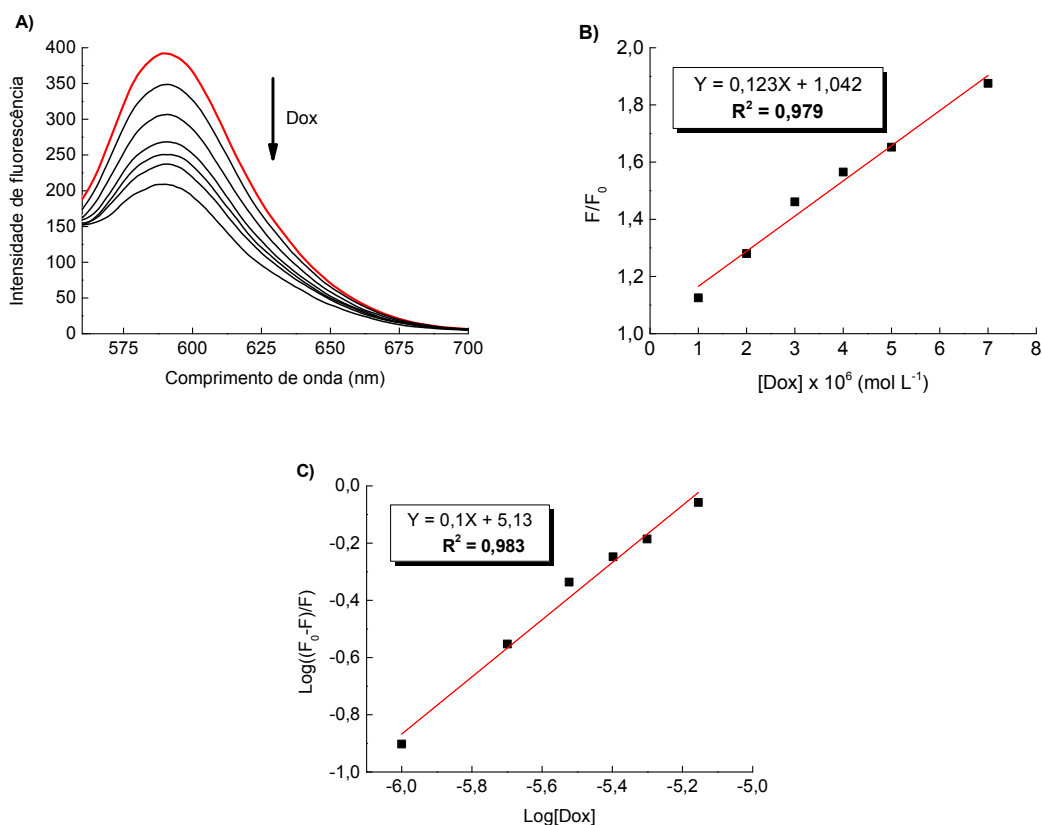
4.3 Avaliação da ligação competitiva com brometo de etídio intercalado ao CT-DNA

O brometo de etídio (BE) intercala-se entre os pares de bases da hélice dupla de DNA e o complexo formado é estabilizado pela interação por empilhamento entre as bases e o BE (HEGDE et al., 2012). Esta propriedade somada ao fato de que a fluorescência do BE aumenta após a adição de DNA é o fundamento da metodologia, já que esta fluorescência pode ser neutralizada, pelo menos em parte, pela adição de uma segunda molécula que compete pelo mesmo sítio. O grau de inibição da fluorescência do BE ligado ao DNA foi utilizado para determinar a extensão da ligação entre a segunda molécula e o DNA.

A fim de encontrar o modo de interação entre os compostos de trabalho e o DNA, foram realizados experimentos de extinção de fluorescência do sistema de BE-DNA e a constante de ligação destes ao DNA na presença de EB foi calculada, usando os dados de intensidade de fluorescência no $\lambda_{em.}$ máximo de cada espectro. Os $\lambda_{em.}$ variaram de acordo com a condição do experimento, onde, para a doxorrubicina (Dox), o meio foi apenas tampão Tris-HCl pH 7,2 ($\lambda_{em.} = 590$ nm), mas para a série da benzo-hidrazida, foi necessário um meio misto com presença de 10% de etanol ($\lambda_{em.} = 592$ nm), P.A. e para a série análoga ao tamoxifeno e seus precursores orgânicos em presença de 30% de etanol ($\lambda_{em.} = 598$ nm). Essa variação provou deslocamento batocrômico, de 8,0 nm.

Para o estudo de extinção da fluorescência foi escolhida a Dox como controle positivo, para comparação com as demais substâncias. O espectro de emissão do complexo BE-DNA em presença de Dox está representado na Figura 30 A, em que a seta indica as alterações na intensidade de emissão com o aumento da concentração de dox. As devidas correlações lineares estão expressas na Figura 30 B e C, para cálculo das constantes e sítios de ligação, presentes na Tabela 7.

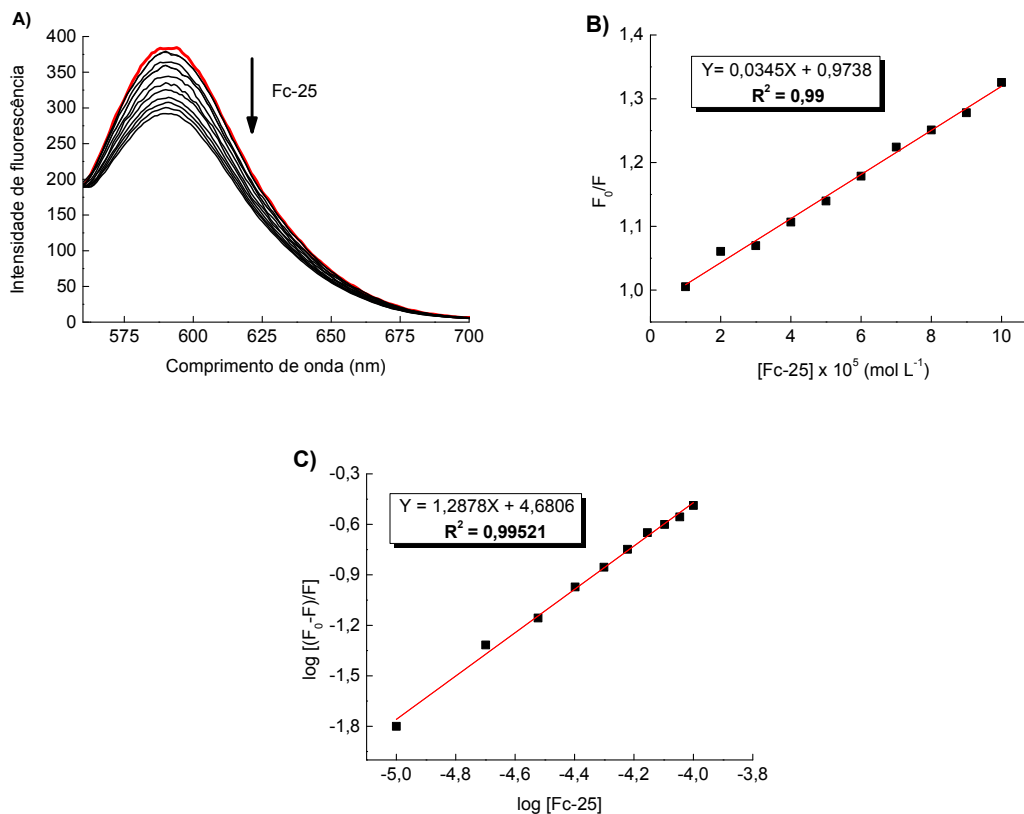
Figura 30 - (A) Espectro de emissão de BE e CT-DNA, na ausência e presença de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Dox. (B) Regressão linear de F_0/F vs $[\text{Dox}]$ ($\lambda_{\text{em.}} = 590$ nm). (C) Regressão linear de $\text{Log}[(F_0-F)/F]$ vs $\text{Log}[\text{Dox}]$ ($\lambda_{\text{em.}} = 590$ nm)



Fonte: Autora, 2014.

Na sequência, os testes com os demais compostos foram realizados com êxito. A Figura 31A ilustra o espectro de fluorescência do Fc-25, selecionado em meio aos demais por evidenciar maiores valores de constante, e apresentar um perfil linear nas curvas (Figura 31 B e C) nas dez concentrações correspondentes a razão molar de 1:1 à 10:1, de BE:Ligante. Diferentemente das outras substâncias cujos gráfico se comportam como assíntota horizontal, alcançando um valor limite de $70,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (série da benzo-hidrazida) e $60,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (série das substâncias análogas ao tamoxifeno), enquanto que Fc-25 não apresenta esse comportamento à $100 \mu\text{mol L}^{-1}$.

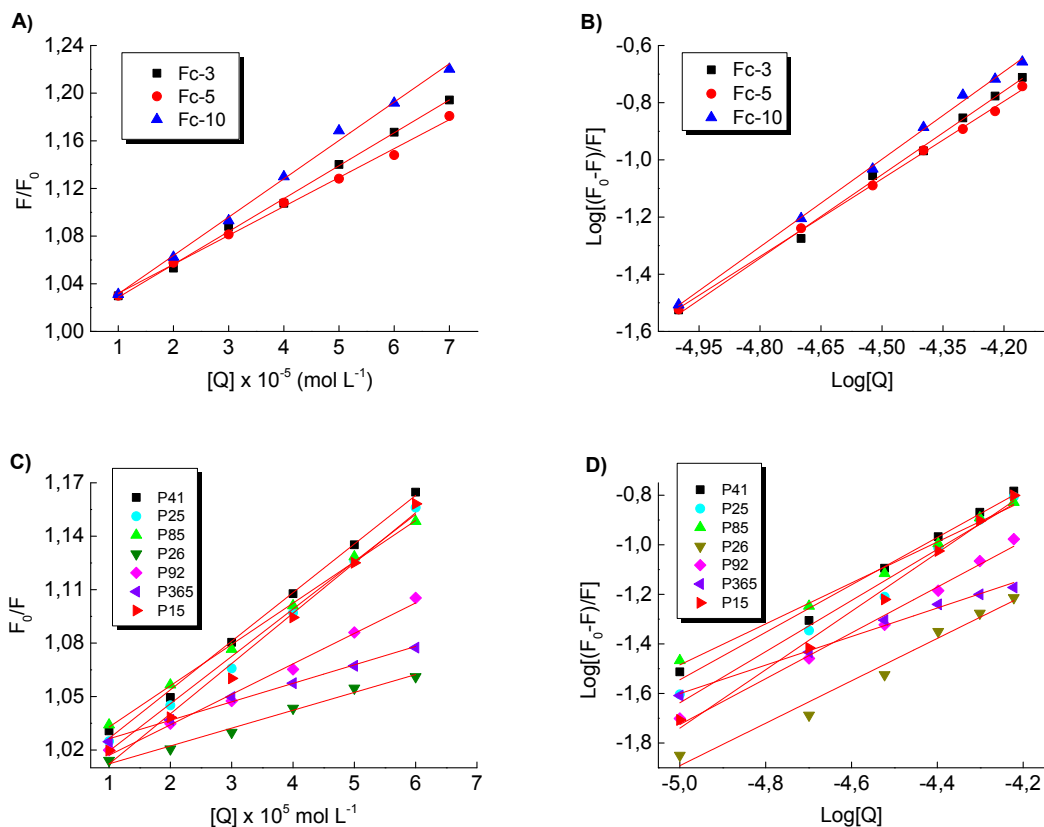
Figura 31 - (A) Espectro de emissão de BE e CT-DNA, na ausência e presença de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Fc-25. (B) Regressão linear de F_0/F vs $[\text{Fc-25}]$ ($\lambda_{\text{em.}} = 591 \text{ nm}$). (C) Regressão linear de $\text{Log}[(F_0-F)/F]$ vs $\text{Log}[\text{Fc-25}]$ ($\lambda_{\text{em.}} = 591 \text{ nm}$).



Fonte: Autora, 2014.

As relações de linearidade verificadas na Figura 32 serviram como base de cálculo para as constantes demonstradas na Tabela 7. Como se vê, os compostos da série da benzo-hidrazida têm perfil muito semelhante, na série dos análogos ao tamoxifeno há uma variação mais acentuada.

Figura 32 - Curvas com base na emissão de BE e CT-DNA, na ausência e presença de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ no $\lambda_{\text{em.}} = 591 \text{ nm}$ (A e B) e $\lambda_{\text{em.}} = 598 \text{ nm}$ (C e D). Onde (A e C) regressão linear de F_0/F vs $[\text{Composto}]$. (B e D) regressão linear de $\text{Log}[(F_0-F)/F]$ vs $\text{Log}[\text{Composto}]$.



Fonte: Autora, 2014.

Os parâmetros de ligação com DNA estão listados na Tabela 7. Todos os compostos apresentaram estequiometria de complexação 1:1 com DNA. O percentual de diminuição da fluorescência (%F) do complexo BE-DNA foi calculado à concentração de $60,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ dos analitos, concentração escolhida para comparação tendo em vista que alguns compostos da série de derivados ferrocênicos do tamoxifeno não solubilizaram em maiores concentrações.

A constante aparente K_{app} é obtida a partir da concentração do ligante que reduz a intensidade de fluorescência em 50%. Nenhum dos compostos estudados mostrou essa redução ou próxima, para cálculo por extrapolação, na faixa de concentração usada Tabela 7.

Tabela 7 - As constantes de extinção de Sterne Volmer (K_{sv}), constante de ligação aparente (K_{app}), constante de ligação (K_a), a estequiometria de ligação (n) e o percentual de diminuição da fluorescência (%F) para a ligação competitiva entre BE ligado ao CT-DNA entre os compostos estudados.

Compostos	K_{sv} (L mol ⁻¹)	K_{app} (L mol ⁻¹)	Log K_a (L mol ⁻¹)	n	R_1^2	R_2^2	%F
Dox	$(1,3 \pm 0,08) \times 10^4$	$1,3 \times 10^7$	$(5,1 \pm 0,3) \times 10^6$	$0,99 \pm 0,06$	0,98	0,98	46,7
P41	$(2,8 \pm 0,05) \times 10^3$	—	$(3,44 \pm 0,15) \times 10^5$	$1 \pm 0,03$	0,99	0,99	14
P15	$(2,8 \pm 0,1) \times 10^3$	—	$(4,15 \pm 0,24) \times 10^5$	$1,2 \pm 0,05$	0,99	0,99	13,2
P25	$(2,6 \pm 0,1) \times 10^3$	—	$(3,52 \pm 0,22) \times 10^5$	$1,03 \pm 0,05$	0,99	0,98	13,5
P26	$(9,8 \pm 0,3) \times 10^2$	—	$(2,48 \pm 0,12) \times 10^5$	$0,88 \pm 0,03$	0,99	0,99	6,0
P85	$(2,4 \pm 0,05) \times 10^3$	—	$(2,92 \pm 0,06) \times 10^5$	$0,89 \pm 0,01$	0,99	0,99	13,0
P92	$(1,7 \pm 0,07) \times 10^3$	—	$(2,9 \pm 0,2) \times 10^5$	$0,92 \pm 0,05$	0,99	0,98	9,5
P365	$(8,5 \pm 0,9) \times 10^2$	—	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^5$	$0,57 \pm 0,03$	0,95	0,98	6,3
*H3	—	—	—	—	—	—	0
Fc-3	$(2,8 \pm 0,06) \times 10^3$	—	$(3,3 \pm 0,1) \times 10^5$	$0,97 \pm 0,02$	0,99	0,99	14,3
Fc-5	$(2,4 \pm 0,05) \times 10^3$	—	$(3,04 \pm 0,06) \times 10^5$	$0,91 \pm 0,01$	0,99	0,99	13,0
Fc-10	$(3,2 \pm 0,08) \times 10^3$	—	$(3,6 \pm 0,08) \times 10^5$	$1,02 \pm 0,02$	0,99	0,99	18,0
Fc-25	$(3,5 \pm 0,09) \times 10^3$	—	$(4,7 \pm 0,13) \times 10^5$	$1,3 \pm 0,03$	0,99	0,99	15,2

*H3 houve uma sobreposição dos espectros. R_1^2 = coeficiente de correlação de K_{sv} ; R_2^2 = coeficiente de correlação de Log K .

Fonte: Autora, 2014.

Com base na literatura, valores de K_{sv} em torno de $3,0 \times 10^4$ L mol⁻¹ e $K_a = 2,0 \times 10^6$ L mol⁻¹ são vistos como fortes intercaladores de DNA (HEGDE et al., 2012; SILVA, 2013). Apesar de possuírem constantes mais baixas, todos os compostos estudados, demonstraram mecanismo de intercalação, uns mais, como Fc-25; outros menos, como P365.

Vale salientar que são vários os tipos de interações não covalentes que podem desempenhar um papel na ligação de um ligante a uma biomolécula e incluem ligações de hidrogênio, van der Waals, eletrostática e interações hidrofóbicas. Geralmente, o complexo de intercalação é estabilizado por forças de van der Waals, enquanto que no complexo do sulco menor, a ligação é estabilizada principalmente por interações hidrofóbicas. Assim, faz-se necessário a realização de estudos termodinâmicos para a devida afirmação de ligação por intercalação, pela mudança na entalpia e entropia em favorecimento à formação do complexo (HEGDE et al., 2012).

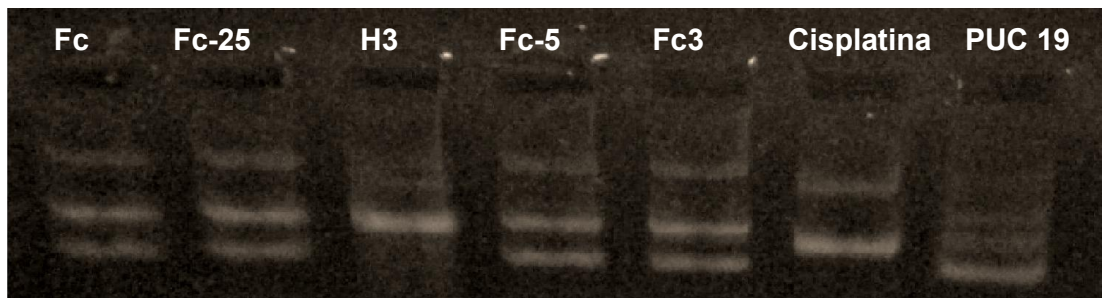
Para o estudo descrito, a adição de H3 para o sistema BE-DNA não alterou o pico de fluorescência, não se observando diminuição de sua intensidade com adições sucessivas do composto. Conclui-se, assim que H3 não intercala no *dsDNA*, mesmo em concentração 10 vezes maior que BE, não sendo este seu mecanismo de reatividade. Assim sendo, outro experimento é sugerido para avaliar uma possível formação de adutos com *dsDNA* juntamente com seus derivados ferrocênicos.

4.4 Estudo da interação com DNA plasmídico por eletroforese em gel

O estudo da mobilidade eletroforética do DNA plasmídico pUC 19 pelos compostos em questão é de grande importância, pois contribui para o entendimento do mecanismo de ação molecular e pode indicar reatividade ao DNA. Esses parâmetros foram investigados por eletroforese em gel de agarose para o DNA plasmídico PUC 19 em presença de 5% de DMF (SILVA et al., 2013).

Como mostrado na Figura 33, o ferroceno e a série de compostos derivados da benzoidrazina (H3) não alteraram a mobilidade eletroforética do DNA plasmídico pUC 19, o que sugere que estes compostos não fazem adutos estáveis com o DNA na concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. Enquanto que a cisplatina, controle positivo, promoveu uma forte modificação em relação ao DNA livre, devido a seu mecanismo de interação de ligações cruzadas intracadeia. O composto precursor da série, H3, apresentou diminuição de mobilidade em menor grau, podendo ser atribuído a ligações de hidrogênio entre o nitrogênio e o oxigênio das bases azotas do DNA (RAJSKI; WILLIAMS, 1998).

Figura 33 - Gel de agarose 1%, após incubação dos compostos com DNA pUC 19 por 24h à 37 °C, concentração das amostras à $100 \mu\text{mol L}^{-1}$.



Diante dos resultados, a técnica de eletroforese em gel de agarose nos forneceu um dado importante que corrobora com os estudos de espectroscopia no UV-Vis e fluorescência para H3, onde há uma interação direta, o composto perturba a estrutura do *dsDNA*, porém não é intercalante. Para os demais compostos, provavelmente não há ligação direta com DNA.

Vale ressaltar que géis nativos são executados, de modo que a estrutura natural do analito é mantida, permitindo uma análise nos quatro níveis da estrutura biomolecular. Isto consente com o tamanho físico do complexo montado afetar a mobilidade. Uma desvantagem, no entanto, é que os complexos não podem ser separados de forma limpa ou previsível, uma vez que é difícil prever como forma e tamanho da molécula vão afetar a sua mobilidade, onde interações mais fracas são pouco perceptíveis (KASTENHOLZ et al., 2006).

Excepcionalmente, o composto Fc-10 desta série, juntamente com a série de derivados ferrocênicos análogos ao tamoxifeno não puderam ser avaliadas por essa metodologia, devido a sua baixa solubilidade. Assim. Não foi possível solubilizá-los a uma concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em apenas 5% de DMF. Concentrações menores foram testadas, entretanto a concentração do DNA que respeitou a relação 1:1 com as amostras não foi suficiente para uma visualização clara após revelação com brometo de etídio.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, as alterações conformacionais do CT-DNA induzidas pelos compostos supracitados foram investigadas por eletroquímica, espectroscopia de absorção, espectroscopia de fluorescência e eletroforese de DNA pUC 19.

De posse dos resultados, por meio do biossensor eletroquímico foi evidenciada interação com *dsDNA*, pela modificação de sua conformação natural, expondo à oxidação guanina e adenina por P41, e adenina por P365. Nos estudos com *ssDNA* em solução, foi evidenciada interação apenas com P41, o qual provocou uma diminuição de 17% na oxidação da guanina e 20% da adenina. O ferroceno não apresentou interação com *ds* e *ssDNA* por eletroquímica na concentração testada. A microbalança de cristal de quartzo demonstrou interação de P41 com SAM de AET/*dsDNA*, pelo aumento da massa aparente.

Os estudos espectrofotométricos possibilitaram determinar valores de constante de formação de complexos entre CT-DNA de fita dupla para os compostos de ambas as séries em Tampão Tris-HCl pH 7,2. Dentre os compostos, P15, P41 e H3 exibiram maior interação com CT-DNA em solução.

Por meio do método de inibição da fluorescência do complexo BE-DNA os compostos estudados demonstraram mecanismo de intercalação parcial, onde Fc-25 exibe as maiores constantes $K_{sv} = (3,5 \pm 0,09) \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ e $K_a = 6,7 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$. Os demais compostos avaliados apresentaram estequiometria de ligação 1:1 com CT-DNA. Apenas H3 mostrou retardamento da mobilidade eletroforética do DNA plasmídico pUC 19.

Podemos sugerir que o mecanismo de ação envolva dano ao DNA por intercalação, para tanto, os resultados de estudos termodinâmicos e FTIR poderão auxiliar nesta confirmação.

PERSPECTIVAS

Continuidade ao projeto.

- I. Buscar alternativas para melhorar a solubilidade da amostras;
- II. Variar a concentração nos estudos de ssDNA, para avaliar o efeito da concentração;
- III. Determinar constante de ligação ao DNA em solução, via VPD, por eletrodo descartável de carbono vítreo e comparar aos valores obtidos por UV-Vis;
- IV. Otimizar a metodologia de SAM de DNA para estudos com Microbalança Eletroquímica de cristal de quartzo;
- V. Investigar a interação dos compostos mais ativos com DNA em nível estrutural, com auxílio de métodos como FTIR-ATR, espectroscopia RAMAN e Ressonância Magnética Nuclear;
- VI. Investigar a reatividade de outros compostos organometálicos, como derivados de rutênio, frente ao dsDNA.

REFERÊNCIAS

ABBASPOUR, A.; NOORI, A. Electrochemical studies on the oxidation of guanine and adenine at cyclodextrin modified electrodes. **Analyst**. v.133, p. 1664 - 1672, 2008.

ABD-ELGAWAD, R. et al. Electrochemical and spectroscopic studies on the interaction of Gatifloxacin, Moxifloxacin and Sparfloxacin with DNA and their analytical applications. **Electroanalysis**. v. 22 p. 2665 – 2671, 2010.

ABREU, F. C. et al. **A importância de parâmetros eletroquímicos em química medicinal**. In: Montanari. (Org.). Química Medicinal. Métodos e Fundamentos em planejamento de fármacos. São Paulo: EDUSP, v. 1, p. 186-229, 2011.

AGARWAL, S. et al. Spectroscopic studies of the effects of anticancer drug mitoxantrone interaction with calf-thymus DNA. **J. Photochem. Photobiol. B: Biology**. v. 120, p. 177 – 182, 2013.

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.

AMATORE, C. et al. Evidences for the generation of alpha-alkoxy and alpha-alkylthioalkyl radicals upon reduction of alpha-functionalized alkyl phenyl sulfones - investigation of the reduction-mechanism by electrochemistry. **Bull. Soc. Chim. Fr.**, v. 130, p. 371 – 381, 1993.

ARYANPOUR, N. et al. Cytotoxicity of Diimine Palladium (II) Complexes of Alkyldithiocarbamate Derivatives on Human Lung, Ovary and Liver Cells. **Iranian J. Pharma. Res**. V. 11 p. 689 – 695, 2012.

BANDYOPADHYAY, D. et al. Polycyclic aromatic compounds as anticancer agents: evaluation of synthesis and *in vitro* cytotoxicity, **Oncol. Lett**. v. 3, 45 – 49, 2012.

BARICATTI, R. A. **Estudos sobre a estabilidade e a estrutura do DNA através da fotofísica de corantes intercalados**, Tese de Doutorado, UNICAMP, 1998.

BARROS, F. W. A. Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. **Bioorg. & Med. Chem.** v. 20, p. 3533 – 3539, 2012.

BIOT, C.; FRANCOIS, N.; MACIEJEWSKI, L.; BROCARD, J.; POULAIN, D. **Bioorg. Med. Chem. Lett**. 10, 839, 2000

BOLLO, S. et al. Cyclic Voltammetric and Scanning Electrochemical Microscopic Study of Thiolated b-Cyclodextrin Adsorbed on a Gold Electrode. **Langmuir**. v. 19, p. 3365, 2003.

BOLT, A.W.; **Cur.Separ.**, 1997, 16 (1), 23.

BOULIKAS T.; VOUGIOUKA M Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. **Oncol Rep** v. 10, p. 1663 - 1682, 2003.

BOULIKAS, T. et al. Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanisms. **Cancer Therapy**. v. 5, p. 537-583, 2007.

BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Eletroquímica: Princípios, métodos e aplicações**. Coimbra, Almedina. 1996.

BROWN, M; WITTEWER, C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. **Clin Chem**. v.46, p. 1221 -1229, 2000.

BURIEZ, O. et al. Reactivity and Antiproliferative Activity of Ferrocenyl–Tamoxifen Adducts with Cyclodextrins against Hormone-Independent Breast-Cancer Cell Lines. **Chem. Eur. J**. v. 14, p. 8195 – 8203, 2008.

CALIL, S.S; SILVA, P.R.Q. **Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade**. (Curso de Pós-graduação em Farmácia e Química Forense) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás- PUC. Goiás, 2011.

CANCINO, J.C. **Eletrodos modificados com monocamadas auto-organizadas de alcanotóis: Uma abordagem sobre a transferência eletrônica**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, 2008.

CHANG, B. ZHAO, T. **Quartz crystal microbalance study of dna immobilization and hybridization for dna sensor development**. Michigan State University, 2008.

CHARAK, S. et al. Interaction studies of Epirubicin with DNA using spectroscopic techniques. **J. Molec. Struct.** v. 1000, p. 150 – 154, 2011.

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

COELHO, D. **Caracterização eletroquímica de uma monocamada auto-organizada mista composta por ácido 3-mercaptopropiônico e ácido 11-mercaptopundecanóico**. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

COLLINS, A. R. et al. "Comet assay for DNA DAMAGE and repair: principles, application and limitations." **Mol. Biotechnol**. V. 24, p. 249 – 261, 2004.

De novos fármacos

DEVITA, V.T. CHU, E. **A history of cancer chemotherapy**, *Cancer Res*. v. 68,p. 8643 – 8653, 2008.

DOGAN-TOPAL, B. et al. 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. **Biosens. Bioelect**. V. 24, p. 2358–2364, 2009.

DORRAJI, P. S. et al. Investigation of the interaction of sertraline with calf thymus DNA by spectroscopic methods. **J. Braz. Chem. Soc.** v.24, p. 1 -10, 2013.

DRUMMOND, T. G. Electrochemical DNA sensors. **Nature Biotechnology.** V. 21, p. 1192 – 1199, 2003.

DUBAR, F. **Avancées dans la compréhension des mécanismes d'action d'agents anti-apicomplexes : de la conception à l'imagerie *in vitro*.** Doctorat Chimie Organique et Macromoléculaire, Université Lille 1 – sciences et technologies, 2012.

ENSAFI, A. A.; HEYDARI-BAFROOEI, E.; REZAEI, B. Different interaction of codeine and morphine with DNA: A concept for simultaneous determination. **Biosens. Bioelect.** v.41, p. 627 – 633, 2013.

EPTON, R.; HOBSON, M.E.; MARR, G. Catalytic activity of poly(acryloyl morpholine)-immobilized horseradish peroxidase in organic/aqueous solvent mixtures **J. Organomet. Chem.**, 134, C23, 1977.

ERDEM, A. et al Electrochemical dna sensor technology for Monitoring of drug–dna interactions. **NANO: Brief Reports and Reviews** .v. 3, p. 229 – 232, 2008.

FERREIRA, F. R. **Emprego de técnicas avançadas em estudos bioeletroquímicos De substâncias de interesse biológico.** Tese de doutorado, Universidade Federal de Alagoas, 2013.

FILHO, J. M. S. Mild, Stereoselective, and Highly Efficient Synthesis of N-Acylhydrazones Mediated by CeCl₃.7H₂O in a Broad Range of Solvents. **Eur. J. Org. Chem.** P. 1 – 8, 2014.

FIORINA, V. J.; DUBOIS, R. J.; BRYNES, S. Ferrocenyl polyamines as agents for the chemoimmunotherapy of cancer, **J. Med. Chem.**v. 21, p. 393 – 395, 1978.

FRANCISCO, A. I.; VARGAS, M. D. Ferroquina: o antimalárico do futuro. **Rev. Virtual Quim.** v. 2, p. 118 - 129, 2010.

GREEF, R. et al. **Instrumental Methods in Electrochemistry**, John Wiley & Sons Ltd, Ellis Horwood Limited, New York, 1985.

HADJILIADIS, N.; SLETTEN, E. **Metal Complex-DNA Interactions**, Wiley-Blackwell: Hoboken, New Jersey, USA, 2009.

HANLON, E. B. Prospects for in vivo Raman Spectroscopy. **Phys. Med. Biol.** v. 45, 2000.

HEGDE, A. H.; PRASHANTH, S. N.; SEETHARAMAPPA, J. Interaction of antioxidant flavonoids with calf thymus DNA analyzed by spectroscopic and electrochemical methods. **J. Pharm. Biom. Analysis.** v. 63, p. 40 – 46, 2012.

HEYDARI, S.; HAGHAYEGH, G. H. Application of Nanoparticles in Quartz Crystal Microbalance Biosensors. **J. Sensor Techn.**, v. 4, p. 81 – 100, 2014.

HILLARD, E. A. et al. The influence of phenolic hydroxy substitution on the electron transfer and anti-cancer properties of compounds based on the 2-ferrocenyl-1-phenyl-but-1-ene motif. **Dalton trans.** V. 43, p. 5073 – 5081, 2007.

HILLARD, E. et al. Facile synthesis and strong antiproliferative activity of disubstituted diphenylmethylidene-[3]ferrocenophanes on breast and prostate cancer cell lines. **Angew. Chem. Int.** v. 45, p. 285 – 290, 2006.

HYUN K-M. Can energy transfer be an indicator for DNA intercalation? **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1334, p. 312 – 316, 1997.

IBRAHIM, M. S. et al. Comparison of the voltammetric studies at Mercury and glassy carbon electrodes for the interaction of lumichrome with DNA and analytical applications. **Anal. Bioanal. Chem.** v. 375, p. 1024–1030, 2003.

JANJUA, N. K. et al. Flavonoid–DNA binding studies and thermodynamic parameters. **Spectrochim. Acta Part A.** v. 79, p. 1600 – 1604, 2011.

JAOUEN, G. et al. Organometallic cyclic polyphenols derived from 1,2-(α -keto tri or tetramethylene) ferrocene show strong antiproliferative activity on hormone-independent breast cancer cells. **Curr. Med. Chem.** V. 11, p. 2505 – 2517, 2004.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics, CA Cancer. **J. Clin.** v. 61, p.69 – 90, 2011.

JENKINS, T. C. **Optical absorbance and fluorescence techniques for measuring DNA-drug interactions.** In: Keith: Drug–DNA interaction protocols. Methods in molecular biology. Humana Press, v. 90, p. 195-218, 1997.

JIA, SUPING; ZHU, BEN-ZHAN; GUO, LIANG-HONG. Detection and mechanistic investigation of halogenated benzoquinone induced DNA damage by photoelectrochemical DNA sensor. **Anal Bioanal Chem.** v. 397, p. 2395 – 2400, 2010.

KANAKIS, C. D. et al. An overview of structural features of DNA and RNA complexes with saffron compounds: Models and antioxidant activity. **J. Photochem. Photobiol. B: Biology.** v. 95 p. 204 – 212, 2009.

KEALY, T. J; PAUSON, P. L. A New Type of Organo-Iron Compound. **Nature.** v.168, p. 1039 – 1040, 1951.

KIDANI, Y.; MASAHAIDE, N. Cytostatic platinum organic complexes. **U.S. Patent Office** v. 4, p. 710 – 577, 1987.

LI, L. et al. Ruthenium complexes containing 2,6-bis(benzimidazolyl)pyridine derivatives induce cancer cell apoptosis by triggering DNA damage-mediated p53 phosphorylation **Dalton Trans.** v. 41, 12766 – 12772, 2012.

LI, Y. H.; Waang, B.D.; Yang, Z.Y. Infrared and DNA-binding on ultraviolet and fluorescence spectra of new copper and zinc complexes with a naringenin Schiff-base ligand, **Spectrochim. Acta A** v.67, p. 395 – 401, 2007.

LIPPERT B. **Cisplatin. Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug**, Ed. Wiley-VCH, Weinheim, 1999.

LUÍS. D. V. A. **Caracterização do efeito anti-tumoral de complexos organometálicos contendo 1,10-fenantroline-5,6-diona**. Dissertação de mestrado, Universidade Nova de Lisboa, 2011.

MAHLER, H. R.; KLINE, B.; MEHROTRA, B. D. Some observation on the hypochromism of DNA. **J. Mol. Biol.** 9, p. 801-811, 1964.

MARTINEZ, R.; CHACON-GARCIA, L. The search of DNA-intercalators as antitumoral drugs: what it worked and what did not work. **Curr Med Chem.** v. 12, p. 127 – 151, 2005

MIAW, L.H.L.; BOUDREAU, P.A.; PICHLER, M.A.; PERONE, S.P.; **Analytical Chemistry**, 1978, 50, 1988.

MJOS, K. D.; ORVIG, C. Metallodrugs in Medicinal Inorganic Chemistry. **Chem. Rev.** V. 114, p. 4540 – 4563, 2014,

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

NEAULT, J. F. Aspirin-DNA interaction studied by FTIR and laser Raman differencespectroscopy. **FEBS Letters** v. 382, p. 26 – 30, 1996.

NEUSE, E. W. J. Macromolecular Ferrocene Compounds as Cancer Drug Models. **J.Inorg. Organomet. Polymer Mater.** v. 15, p. 3 – 32, 2005.

NOWICKA, AM; ZABOST, E; KLIM, B; MAZERSKA, Z; STOJEK, Z. Interactions of Dissolved dsDNA with Intercalating Drug by Anodic Voltammetry and Spectroscopy. Influence of pH. **Electroanal.** v.21, p. 52 – 60, 2009.

OLIVEIRA, A. C. **Avaliação da atividade antineoplásica de derivados ferrocênicos do tamoxifeno: contribuição para o desenvolvimento de novos fármacos**. Tese de doutorado, Universidade Federal de Alagoas, 2011.

OLIVEIRA, A. C. et al. Molecular mechanism of action of 2-ferrocenyl-1,1-diphenylbut-1-ene on HL-60 leukemia cells. **Chem. Med. Chem.** p. 1 - 8, 2014.

OLIVEIRA, S. C. B. et al. Electrochemical oxidation of ochratoxin A at a glassy carbon electrode and *in situ* evaluation of the interaction with deoxyribonucleic acid using an electrochemical deoxyribonucleic acid-biosensor. **Analyt. Chim. Acta.** v. 588p. 283–291, 2007.

OLIVEIRA-BRETT, A. M. et al. Voltammetric determination of all DNA nucleotides. **Analyt. Biochem.** V. 332, p. 21 – 329, 2004.

ORNELAS, C. Application of ferrocene and its derivatives in cancer research. **New J. Chem.** v. 35, p. 1973 – 1985, 2011.

OZKAN-ARIKSOYSAL, D. et al. New Electroactive Hybridization Indicators 2-Phthalimido-N-Substitutedphenylethanesulfonamide Derivatives for Biosensor Applications: Ring Substituent Effect on Interaction between Compound and DNA. **Electroanal.** v.22, p. 2225 – 2234, 2010.

PAITANDI, R. P. ET AL..Interaction of ferrocene appended Ru(II), Rh(III) and Ir(III) dipyrinato complexes with DNA/protein, molecular docking and antitumor activity. **Europ. J. Med. Chem.** v. 84, p. 17 – 29, 2014.

PALASKA, P.; ARITZOGLU, E.; GIROUSI, S. Sensitive detection of cyclophosphamide using DNA-modified carbon paste, pencil graphite and hanging mercury drop electrodes. **Talanta.** v. 72, p. 1199 – 1206

PALCHAUDHURI, R.; HERGENROTHER, P.J. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. **Cur. Opin. Biotechnol.** v. 18, p. 497 – 503, 2007.

PARRILHA, G. L. et al. Metal complexes with 2-acetylpyridine-N(4)-ortho-chlorophenylthiosemicarbazone: Cytotoxicity and effect on the enzymatic activity of thioredoxin reductase and glutathione reductase. **Europ. J. Medic. Chem.** 84 (2014) 537 – 544.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.N.; KRIZ, G.S. E VYVYAN, K.J. – **Introdução à Espectroscopia**, 1ª ed. Editora Cengage Learning, - Tradução da Quarta Edição Americana, 2010.

PEÑA, B. et al. Cytotoxicity Studies of Cyclometallated Ruthenium(II) Compounds: New Applications for Ruthenium Dyes. **Organometallics**, v. 33, p. 1100 – 1103, 2014.

PEREIRA, C. M. P. Synthesis of bioactive heterocyclic ferrocene derivatives. **Quím. Nova.** vol.36, 2013.

PIGEON, P. et al. Metal complex SERMs (selective oestrogen receptor modulators). The influence of different metal units on breast cancer cell antiproliferative effects. **J. Med. Chem.**, v. 48, p. 2814 – 2821, 2005.

PILCH DS, et al. Characterization of a triple helix-specific ligand: BePI {3-methoxy-7H-8-methyl-11-[(30-amino)propylamino]-benzo[e]pyrido[4,3-b]indole} intercalates into both double-helical and triple-helical DNA. **J. Mol. Biol.** v. 232, p. 926 – 946, 1993.

PONTINHA, A. D. R. et al. *In situ* evaluation of anticancer drug methotrexate–DNA interaction using a DNA-electrochemical biosensor and AFM characterization. **Phys. Chem. Chem. Phys.** v. 13, p. 5227 – 5234, 2011.

QUEIROZ, M-J. R. P. et al. New tetracyclic heteroaromatic compounds based on dehydroamino acids: photophysical and electrochemical studies of interaction with DNA. **Tetrahedron.** v. 64 p. 382 – 391, 2008.

RADI, A.; EL-NAGGAR, A.; NASSEF, H. M. Electrochemical and Spectral studies on the Interaction of the Antiparasitic Drug Nitazoxanide with DNA. **Electrochimica Acta.** v. 129, p. 259 –265, 2014.

RAJSKI, S. R.; WILLIAMS, R. M. DNA Cross-Linking Agents as Antitumor Drugs. **Chem. Rev.** v. 98, p. 2723 – 2795, 1998.

REN J, JENKINS TC, CHAIRES JB: Energetics of DNA intercalation reactions. **Biochem.** v. 39, p. 8439 – 8447, 2000.

RESCIFINA, A. et al. Recent advances in small organic molecules as DNA intercalating agents: Synthesis, activity, and modeling. **Europ. J. Med. Chem.**, v. 74, p. 95 – 115, 2014.

ROJAS, M.T. et al. Supported Monolayers Containing Preformed Binding Sites. Synthesis and Interfacial Binding Properties of a Thiolated β -Cyclodextrin Derivative. **J. Am. Chem. Soc.** v. 117, p. 336, 1995.

ROSEMBLUM, M.; **Chemistry of the Iron-Group Metallocenes**, Part I, Interscience: New York, 1965.

SAITO, S. T. et al. Study of DNA–emodin interaction by FTIR and UV–vis spectroscopy. **J. Photochem. and Photobiol. B: Biol.** v. 111, p. 59 – 63, 2012.

SCHLESENER, C.J. et al. Rates and mechanism of proton-transfer from transient carbon acids - the acidities of methylbenzene cations. **J. Am. Chem. Soc.** v. 106, 7472 - 7482, 1984.

SCHNEIDER, M R; E. von Angerer, H. Schonenberger, R. T. Michel, H. P. Fortmeyer, J. **Med. Chem.**, v. 25, p. 1070 – 1077, 1982.

SHAH, A. et al. Electrochemical Behavior of 1-Ferrocenyl-3-phenyl-2-propen-1-one on Glassy carbon Electrode and Evaluation of its Interaction Parameters with DNA. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 21, p. 447 - 451, 2010.

SHAPIRO, H. M. **“Practical flow cytometry”**. 3^a Ed, New York: Wilwy-Liss, 1995.

SILVA, B. V. Synthesis, electrochemical studies and anticancer activity of ferrocenyl oxindoles. **Dalton Trans.** v. 39, p. 7338 – 7344, 2010.

SILVA, J. G. et al. Cytotoxic activity, albumin and DNA binding of new copper(II) complexes with chalcone-derived thiosemicarbazones. **Europ. J. Medic. Chem.** v. 65, p. 415 – 426, 2013

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T. C; **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**, 5ª ed., Guanabara Koogan, RJ, 1994.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, A. R. Princípios de análise instrumental. Ed. 6ª, Bookman, p. 400 – 402, 2009.

SMITH, A. The Quartz Crystal microbalance. In: GALLANGHER, P. K.; BROWN, M. E. (Ed.). **Handbook of thermal analysis and calorimetry: recent advances, techniques and applications**. Amsterdam: Elsevier, v. 5, p. 133-159, 2008.

STREKOWSKI, L.; WILSON, B. Noncovalent interactions with DNA: An overview. **Mutation Res.** v. 623 p. 3 – 13, 2007.

SUH, D.; CHAIRES, J. B. Criteria for the mode of binding of DNA binding agents. **Bioorg Med Chem**, v. 3, p. 723 – 728, 1995.

SUN, Y-M. et al. Crystal Structure, Supramolecular Self-Assembly and Interaction with DNA of a Mixed Ligand Manganese(II) Complex. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 22, n^o. 6, p. 1089 - 1095, 2011.

TAN, Y.L.K. et al. Ferrocenyl catechols: synthesis, oxidation chemistry and anti-proliferative effects on MDA-MB-231 breast cancer cells. **Dalton Trans.** v.41, p. 7537 – 7549, 2012.

TICIANELLI, E.A.; GONZALEZ, E.R. Eletroquímica, 2ª Ed., Edusp, São Paulo, **2005**.

TOP, D. et al. “ Synthesis, biochemical properties and Molecular modelling studies of organometalic specific estrogen receptor modulators (SERMs), the ferrocifens and hydroferrocifens on both hormone-dependent and hormone-independent breast câncer cell lines”. **Chem. Eur. J.** v. 9, n.21, p. 5223 – 5236, 2003.

TORIGOE, H. et al. Binding of threading intercalator to nucleic acids: thermodynamic analyses, Nucl. **Acids Res. Suppl.** v. 2,p. 55 – 56, 2002.

VARELA, H.; MALTA, M.; TORRESI, R. M. Técnicas *in situ* de baixo custo em eletroquímica: a microbalanço a cristal de quartzo. **Quím. Nova**, v. 23, p. 664, 2000.

WANG, J. From DNA Biosensors to Gene Chips. **Nucleic Acids Res.**, v.28, n.16, p.3011 - 3016, 2000.

WILKINSON, G.; WOODWARD, R. B. The structure of iron bis-cyclopentadienyl, **J. Americ. Chem. Soc.** v. 74, p. 2125 - 2126, 1952.

YU, D. D. et al. Simple and Efficient production of (Z)-4-Hydroxytamofifen, a potent estrogen receptor modulator. **J. Org. Chem.** v. 68, p. 9489 – 9491, 2003.

ZERNER, M. C. et al. An Intermediate Neglect of Differential Overlap Technique for Spectroscopy of Transition-Metal Complexes. Ferrocene. **J. American Chem. Soc.** v. 102:2, p. 589 – 599, 1980.

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

GLOSSÁRIO

Plasmídio: são moléculas circulares duplas de DNA capazes de se reproduzir independentemente do DNA cromossômico. Ocorrem geralmente em bactérias e por vezes também em organismos eucarióticos unicelulares.

Corrente faradáica: corrente produzida por uma reação eletródica, devida à transferência de elétrons que se processa quando oxidação (perda de elétrons) ou redução (ganho de elétrons) ocorre sobre a superfície do eletrodo.

Cromóforo: grupo insaturado covalente responsável pela absorção eletrônica.

Auxocromo: grupo saturado que, quando ligado a um cromóforo, altera tanto o comprimento de onda como a intensidade da absorção.

Deslocamento batocrômico: é o deslocamento de uma absorção para um comprimento de onda maior (deslocamento para vermelho).

Deslocamento hipsocrômico: é o deslocamento de uma absorção para um comprimento de onda menor (deslocamento para azul).

Efeito hiperacrômico: é um aumento da intensidade da absorção.

Efeito hipocrômico: é uma diminuição da intensidade de absorção.

Corrente catódica: corrente de redução é, por convenção, assinalada com um sinal positivo.

Corrente anódica: corrente de oxidação é, por convenção, assinalada com um sinal negativo.

Tampão TBE: é uma solução tampão contendo uma mistura de base T (Tris), B (ácido Bórico) e E (EDTA), usado em procedimentos envolvendo ácidos nucleicos.

Tampão TBE 10X: Isto significa que o rendimento é 10 vezes maior que a solução pronta para uso 1X concentrada, podendo ser 0,5X. Onde o Tris está 10/1 na solução em comparação a soma das concentrações dos demais reagentes.

Nuclease: é uma enzima capaz de quebrar as ligações entre os nucleotídeos, que são subunidades do ácido nucléico.

MTT: Ensaio colorimétrico usado para determinação da citotoxicidade de fármacos por meio da ação de enzimas redutoras de MTT.

ANEXO A

CHEM MED CHEM
FULL PAPERSChemPubSoc
Europe

DOI: 10.1002/cmde.201402219

Molecular Mechanism of Action of 2-Ferrocenyl-1,1-diphenylbut-1-ene on HL-60 Leukemia Cells

Alane Cabral de Oliveira,^{a, b} Emanuella Gomes da Silva,^{c, d} Danilo Damasceno Rocha,^{e, f} Elizabeth A. Hillard,^{g, h} Pascal Pigeon,^{i, j} Gérard Jaouen,^{k, l} Felipe A. R. Rodrigues,^{c, j} Fabiane C. de Abreu,^{k, l} Fabrícia da Rocha Ferreira,^{c, j} Marília O. F. Goulart,^c and Leticia V. Costa-Lotufo^{a, b}

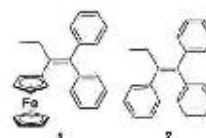
The aim of this work was to investigate the mechanism of action of 2-ferrocenyl-1,1-diphenylbut-1-ene (**1**) on HL-60 human leukemia cells. While inactive against noncancerous cells, **1** provoked a concentration dependent decrease in viable tumor cells, primarily via apoptosis, as evidenced by analysis of cell morphology, activation of caspases 3 and 7, increased DNA fragmentation, and externalization of phosphatidylserine. Necrosis was observed only at the highest tested concentration (4 μ M). Compound **1** interfered with the cell cycle, causing an accumulation of cells in the G₁/G₂ phase.

Interaction of **1** with dsDNA and ssDNA was observed by differential pulse voltammetry and confirmed by hyperchromicity in the UV/Vis spectra of dsDNA, with an interaction constant of $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Both the organic analogue 1,1,2-triphenylbut-1-ene (**2**) and ferrocene were inactive against cancer and noncancer cell lines and did not react with DNA. These results reinforce the idea that the hybrid strategy of conjugating ferrocene to the structure of tamoxifen derivatives is advantageous in finding new substances with antineoplastic activity.

Introduction

Ferrocene (Fc) is receiving considerable attention as a bioisostere in medicinal chemistry, as it can potentiate the biological activity of small molecules used in treatment against cancer¹ and contagious and parasitic diseases,² among others.³ The ferrocenyl cation is known to be moderately cytotoxic,⁴ and the combination of Fc with small molecules that target receptors or enzymes has been shown to be an advantageous strat-

egy in experimental chemotherapy.⁵ A series of ferrocenyl compounds, based on the tamoxifen skeleton, show antiproliferative effects against a variety of cancer cell lines, including hormone dependent and independent breast carcinoma.⁶ Derivatives in which one or both of the geminal phenyl rings are functionalized with an oxidizable group have shown the best (nanomolar) activity, and reactive quinone or aminoquinone methide intermediates have been implicated in antiproliferative effects.^{6,7} Lacking such a functional group, 2-ferrocenyl-1,1-diphenylbut-1-ene (**1**), is only moderately active against



breast cancer cells⁸ and thus has not been studied further in this context. However, we recently showed that **1** demonstrates IC₅₀ values below 2 μ M for SF-765 human glioblastoma, HCT-8 human colon cancer, and HL-60 acute promyelocytic leukemia cell lines after 72 h.⁹ This cytotoxicity, coupled with low hemolytic activity, prompted this further study of **1**.

The present work is devoted to the investigation of the mechanism of biological action of **1** as a cytotoxic agent against HL-60 cells. The influence of **1** on cell morphology, cell membrane integrity, DNA fragmentation, cell cycle, phosphatidylserine

[a] Dr. F. A. Hillard
GIRM UMR 0441, CNRS and Université de Metz
13630 Sarralbe, France
E-mail: F.A.Hillard@univ-metz.fr

[b] Dr. L. V. Costa-Lotufo
Departamento de Farmácia e Farmacologia
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Campus de Papanovaçu, Pavão III, CE 96430-270 (Brazil)
E-mail: lotufo@ufrj.br

[c] Dr. A. C. de Oliveira, F. C. de Abreu, Prof. F. C. de Abreu,
Dr. F. da Rocha Ferreira, Prof. Dr. O. F. Goulart
Instituto de Química e Bioquímica, Universidade Federal de Alagoas
Avenida A. H. Simões 507 (Brazil)

[d] Dr. E. L. de Oliveira
Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Alagoas (Brazil)

[e] Dr. D. D. Rocha, E. A. de Rodrigues
Departamento de Farmácia e Farmacologia
Universidade Federal do Ceará (Brazil)

[f] Dr. G. Jaouen, Prof. G. Jaouen
Chimie des Polymères, Institut Supérieur de Chimie de Paris
11 rue Pierre et Marie Curie, 75231 Paris Cedex 05 (France)

[g] Dr. P. Pigeon, Prof. G. Jaouen
Ecole Normale Supérieure, Université Paris 6, Institut Pasteur de Chimie Moléculaire
Avenue de la Chimie, 75231 Paris Cedex 05 (France)

Supporting information for this article is available on the WWW under
http://dx.doi.org/10.1002/cmde.201402219.

dyserine (f5) externalization, and activation of caspases 3 and 7 was studied. The ability of **1** to interact with DNA was assessed through electrochemical and spectrophotometric experiments using double-stranded DNA (dsDNA)-modified electrodes and dsDNA and single stranded DNA (ssDNA) in solution. To elucidate the role of the ferrocenyl group, the antiproliferative properties of the phenyl analogue, 1,1'-bis(phenylbut-1-ene) (**2**), were also evaluated.

Results

Antiproliferative effects

In the present study, we compared the antiproliferative properties of **1** with its organic analogue, **2**, against cancerous and noncancerous cell lines (Table 1). Compound **1** was not cytotoxic against the glioblastoma histone membrane (GBM) noncancerous cell line, with an IC_{50} value higher than the maximum concentration tested (343 μ M). With IC_{50} values below 4 μ M of HL-60 acute promyelocytic leukemia, HCT-8 human colon cancer, SF-295 human glioblastoma,² and OVCAR-8 ovarian carcinoma, **1** can be considered selective for tumorigenic cells. Compound **2**, lacking the ferrocenyl moiety, was

likewise inactive against the GBM cell line. However, **2** was also inactive against HL-60, SF-295, and OVCAR-8 cell lines, with IC_{50} values above the maximum concentration tested (25 μ M) for all cell lines, showing that the Fe group is essential for anti-proliferative effects.

Mechanistic studies in HL-60 cells

To characterize the cytotoxic effect of **1**, a phenotypic evaluation of treated HL-60 cells after 24 h incubation was performed. The tested concentrations were chosen as 1, 2, and 4 μ M, based on 24 h IC_{50} values. Negative control cells exhibited a typical non-adherent round morphology after 24 h in culture, while several **1**-induced morphological changes typical of apoptosis, including a decrease in cell size and the formation of apoptotic bodies and intracellular vacuoles, were observed (Figure 1A). The severity of the effects increased with concentration, and at 4 μ M, evidence of necrotic cell death was noted.

The cytotoxic effects of compound **1** were confirmed by flow cytometry, demonstrating a concentration dependent decrease in cell density (Figure 1B). The mean number of cells decreased from 4.9×10^5 cells mL⁻¹ in the negative control to 1.5×10^5 cells mL⁻¹ under exposure to **1** at 4 μ M; at this concentration, the effect was similar to that observed in the presence of the positive control doxorubicin at 0.5 μ M (1.4×10^5 cells mL⁻¹, Figure 1C). The effect on cell density was accompanied by a decline in cell membrane integrity (Figure 1C), although the effects on proliferation seemed to be more marked and likely related to more specific pathways than loss of membrane integrity. At the highest tested concentration, **1** decreased the cell number by 70%, whereas cell membrane integrity was affected in only 25% of treated cells.

Compd	HL-60	HCT-8	SF-295	MDA/MB-435	OVCAR-8	GBM
1	1.04 ± 0.04 ^a	2.0 ± 0.1 ^a	1.0 ± 0.2 ^a	16 ± 4 ^a	3.4 ± 0.5	> 343.0
2	> 25	ND	> 25	ND	> 25	> 343.0

[a] Data are the 95% confidence interval obtained by nonlinear regression for all cell lines. ND = no independent experiments performed in duplicate after 72 h incubation; ND = no interaction.

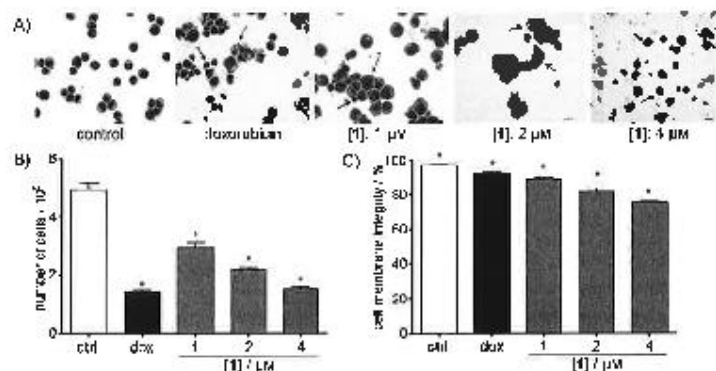


Figure 1. Effect of **1** on HL-60 cell morphology. B) membrane integrity, and C) cell number as determined by application of hematoxylin (H&E) staining and flow cytometry. Data are presented as mean values. 5% of three independent experiments performed in triplicate; * $p < 0.05$ relative to negative control by ANOVA, followed by Dunnett's test. HL-60 cells were treated with controls (ctl) for 24 h at 1, 2, and 4 μ M. DOXO (0.2 μ M) and 0.5 μ M doxorubicin were used as the negative and positive controls, respectively. For H&E staining in panel A), solid-lined boxes denote necrotic cells, dashed arrows denote apoptotic cells, and asterisks and arrowheads indicate intracellular vacuoles. Scale bars: 20 μ m.

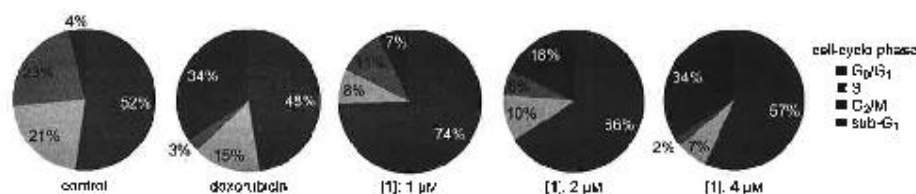


Figure 2. Effect of **1** on the cell cycle distribution of HL-60 cells treated with controls or **1** for 24 h at 1, 2, and 4 μ M. Cell cycle was determined by flow cytometry, and pie graphs depict the percentage of cells in G₀/G₁, S, or G₂/M phases; sub-G₁ denotes fragmented (and/or) DNA. DMF (0.2 M) and 0.15 μ M cisplatin (10⁻⁶) were used as the respective negative and positive controls.

The cell-cycle distribution of HL-60 cells treated with **1** was analyzed by flow cytometry. Results demonstrated that cells were arrested at G₀/G₁, followed by a progressive increase in the number of cells with DNA fragmentation with increasing concentrations of compound **1** (Figure 2). Cell cycle arrest was most evident at 1 μ M, with 74% of cells in G₀/G₁, compared with 52% in the negative control, while DNA fragmentation was maximum at the highest tested concentration (4 μ M), corresponding to 34%, relative to 4% in the negative control.

DNA fragmentation is evidence for an increased number of dead cells, and is a signature of both necrotic and apoptotic processes. The externalization of PS, an in situ biomarker characteristic of the early stages of cell death by apoptosis, was observed in treated cells in a concentration-dependent manner. After 24 h of incubation, only 3% of the negative control cells presented PS externalization, while in cells treated with **1** at 4 μ M, this number increased to 38% (Figure 3A), suggesting that the effects of **1** are related to apoptosis induction. Apoptosis was also reinforced by the analysis of caspase 3 and 7 activation (Figure 3B). After 24 h of exposure to 4 μ M of **1**, HL-60 cells presented an increase from 12 to 14% in caspase 3 and 7 activation, relative to the negative control.

DNA interaction

Evaluation of the interaction of **1** with dsDNA-modified electrodes and with ssDNA in solution was carried out using electrochemical techniques. For dsDNA (Figure 4A), the blank (gray

line) showed no redox processes, as to be expected when the nucleoside bases are trimethyl paired. In the presence of **1** (black line), the appearance of diagnostic peaks corresponding to guanosine and adenosine oxidation represented a conformational change in the dsDNA, resulting from an interaction between **1** and dsDNA. Compound **1** could also interact with ssDNA (Figure 4B); here, the intensities of the adenosine and guanosine current peaks were diminished upon addition of **1** to the solution, without displacement in terms of peak potential. It is worth mentioning that the Fe moiety in **1** underwent oxidation in these experimental conditions, generating a positive charge on the molecule. This might cause an electrostatic attraction toward the phosphate backbone of DNA and could be a drawback in the use of electrochemical sensors for this system. Therefore, we investigated the possible interaction of Fe with dsDNA and ssDNA. Figure 4C shows the differential pulse voltammetry (DPV) scans of a solution containing ssDNA, with and without Fe. In this case, there was only a slight difference in the oxidation currents of guanosine, suggesting negligible interaction with the ferrocenium cation. Furthermore, no interaction of the ferrocenium cation with dsDNA (Figure S1, Supporting Information) was observed, suggesting that the oxidation of the Fe moiety, per se, does not cause a false positive result.

Compound **2** did not interact with ssDNA, behavior that was confirmed by the lack of modification of the oxidation currents of guanosine and adenosine in ssDNA, similar to the behavior of Fe (Figure 4D). The result was ambiguous toward dsDNA, as

the oxidation of compound **2** occurred at a similar potential to that of adenosine in dsDNA; however, the small difference in currents in both voltammograms suggests a slight interaction at most (Figure S2, Supporting Information).

Spectrophotometric studies of the effects of compound **1** in calf thymus dsDNA were carried out to compare with the electrochemical investigation and to clarify the role of the pre-oxidation of Fe (Figure S3). In this experiment, a fixed concentration

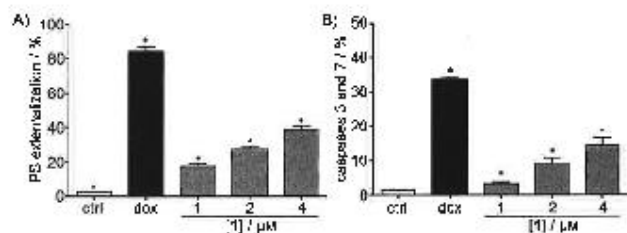


Figure 3. Effect of **1** on (A) phosphatidylserine externalization and (B) activation of caspases 3 and 7 of HL-60 cells treated with controls or **1** for 24 h at 1, 2, and 4 μ M. DMF (0.2 M) and 0.15 μ M cisplatin were used as the respective negative and positive controls. Cells were analyzed by flow cytometry, and bars are presented as mean values \pm SEM of two independent experiments performed in triplicate; * p < 0.05 relative to negative control by ANOVA, followed by Dunnett's test.

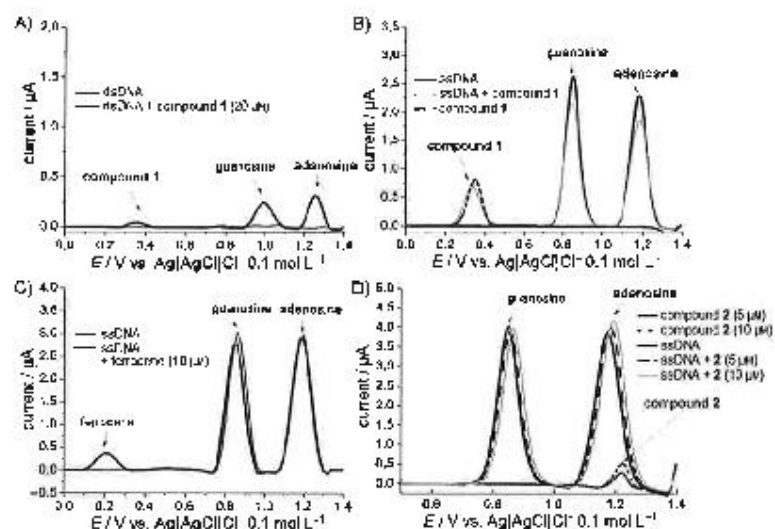


Figure 4. A) DPVs of the electrode modified by 4-4'-DNA-modified GC, in acetate buffer (0.1 M, pH 4.5), in the presence and absence of 1 (20 μM). B) DPVs of the electrode modified by 4-4'-DNA-modified GC, in acetate buffer (0.1 M, pH 4.5), and ssDNA in the presence and absence of 1 (10 μM). C) Differential pulse voltammetry at a GC in acetate buffer (0.1 M, pH 4.5), and ssDNA in the presence and absence of compound 2 (10 μM). D) Differential pulse voltammetry at a GC in acetate buffer (0.1 M, pH 4.5), and ssDNA in the presence and absence of 2 (5 and 10 μM).

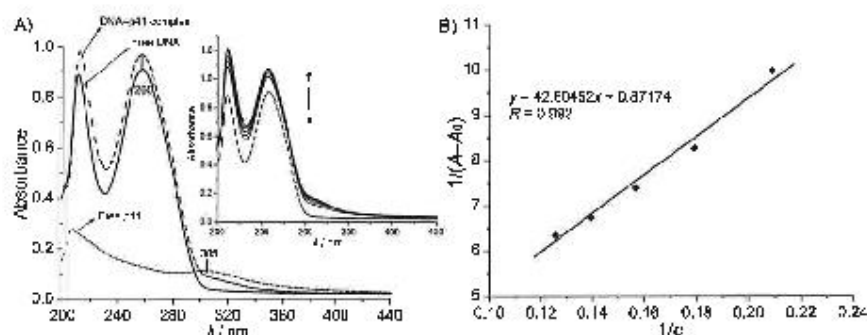


Figure 5. A) UV-Vis spectra for dsDNA (10 μM) in the absence and presence of 1. Inset: The effect of the concentration of 1 (3.2, 4.0, 4.8, 5.6, 6.4, 7.2, and 8.0 μM) on the spectral profile of dsDNA. B) Double-reciprocal plot of 1 binding to DNA, where A is the molar absorptivity of the DNA and A_0 is the absorption at various concentrations (c) of 1 at 260 nm.

of DNA (0.134 mM) in 30% ethanol/TBS solution was treated with different concentrations of 1 (5.2–8 mM). Figure 5A shows the spectra of the free dsDNA and of the complex formed by compound 1 and dsDNA. In order to display only the dsDNA–1 interaction, the spectrum of 1 was subtracted from the spectrum of the complex at the same concentration. An increase in the concentration of 1 provoked a hyperchromic effect on the

dsDNA peak at 260 nm (Figure 5A). Hyperchromicity is typical of DNA interactions^{31b} and has been attributed, for instance, to intercalation interactions with small molecules, which results in exposure of the base pairs to UV-Vis radiation and increasing absorbance.^{32–34} The binding constant (K_b) of the 1–DNA complex was obtained by applying the Benesi-Hildebrand equation [Eq. (1)] to the band at 260 nm.³⁵

$$\frac{1}{AA} = \frac{1}{D_0 \Delta \epsilon_{520} A c_{\text{DNA}} [S]} + \frac{1}{D_0 A c_{\text{DNA}}} \quad (1)$$

in which l is the path length (1 cm), D_0 is the total DNA concentration, $\Delta \epsilon_{520}$ is the molar absorptivity of the interaction complex, $[S]$ is the analyte concentration, and K_{12} is the stability constant for complex formation (DS). Thus, the ratio of the intercept to the slope in the double reciprocal plot in Figure S9 gave the binding constant K_{12} .¹⁸ The binding constant for this interaction was found to be $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, consistent with literature data for interaction of dsDNA with other intercalators,^{19–21} including ferrocenyl compounds.^{18, 19}

Discussion

The anticancer properties of the ferrocenes and derivatives have been well studied, particularly against ER⁺ (MCF-7) and ER⁻ (MDA-MB-231) breast cancer cells.¹⁷ The antiproliferative activity of some of the most potent compounds has been attributed to formation of electrophilic intermediates and requires the presence of an oxidizable group conjugated to the ferrocenyl group.²¹ In this case, **1** possesses no such functional groups and was indeed less active on MDA-MB-231 cells (IC_{50} 7.54 μM)¹⁷ than those compounds possessing phenol functionalities (e.g., IC_{50} 0.8 μM for the 4,4'-dihydroxy analogues).¹⁷ Nonetheless, we felt that **1** merited further study based on a recent discovery of its antiproliferative activity against SF-295, HCT-8, and HL-60 tumor cells in the low micromolar range, the lack of unspecific toxicity on erythrocytes, and its lack of oxidative stress induction properties.¹⁸

Compound **1** was selective toward tumor cells when compared with noncancerous cells: the mean IC_{50} value (4.5 μM) against H1-h1, HCT-8, SF-295, MDA-MB-231,¹⁷ and OVCAR-8 tumor cells compared favorably with that obtained using the noncancerous GBM monkey cell line (IC_{50} > 345.00 μM). Such selectivity toward tumor cells is a key factor in the development of new anticancer agents, with the goal of a decrease in side effects and an improvement in the quality of life of patients under chemotherapy. Often, such selectivity is suggestive of specific interactions with receptors present in cancer cells, such as the estrogen receptor (ER), which is targeted by hydroxytamoxifen. Although there is evidence of the presence of functional membrane ER α and ER β in HL-60 leukemia cells,²² as well as functional ER β for colon cancer cells, including HCT-8,²³ analysis of the molecular data from the NCI¹⁰ showed that all cell lines used in the present work indeed express low levels of ER α relative to some breast (MCF-7 and T47D) and ovarian (SK-OV-3) overexpressing cells. Based on the present findings, the activity of **1** seems to be independent of an ER excess on patients.

Studies on the mechanism of action of **1** suggest that it induces cell-cycle arrest at the G₂/G₁ phase followed by an increasing number of cells with DNA fragmentation. Usually, in the presence of DNA damage, cells can trigger a complex sequence of events, including checkpoint activation, leading to cell-cycle arrest, allowing DNA repair. Depending on the severity

of the damage, cell death pathways can be activated.²⁴ Indeed, cells treated with **1** underwent characteristic apoptotic cell death, as demonstrated by the morphology of the treated cells, the increasing number of cells with DNA fragmentation, and by PS externalization and caspase 3 activation, all phenotypic and biochemical features related to apoptosis.²⁵ It is useful to compare these results with what is already known about the biochemical mechanism of the ferrocenes. The effect on cell cycle progression of the ferrocenyl analogue of hydroxytamoxifen (Fc-OH-TAM) depends on the ER expression pattern of treated cells:^{22, 24} in ER⁺ cells, Fc-OH-TAM provokes arrest in the G₂/G₁ phase, while ER⁻ cells are arrested in the S phase. The authors furthermore linked the antiproliferative effects of Fc-OH-TAM with ROS production and senescence, which apparently is not the case for **1**, as previous studies demonstrated that it was unable to elicit ROS production in HL-60 cells.¹⁸ This observation, as well as the observation that **1** provoked G₂/G₁ arrest in spite of the low ER expression in HL-60 cells, suggest that the mechanism of action for **1** and Fc-OH-TAM differ significantly.

Interestingly, Osella et al.²¹ showed that Fc-OH-TAM cytotoxicity cannot be directly attributed to oxidative stress, although it is known to provoke DNA damage. Indeed, one of the most important aspects in the discovery of antineoplastic agents is the interaction of these substances with DNA. Electrochemical experiments on **1** using a dsDNA biosensor or ssDNA in solution evidenced such an interaction. The obtained binding constant of $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, as well as the hyperchromic effect upon addition of **1** to dsDNA, is consistent with weak intercalation between base pairs.^{24, 26–28} Studies to evaluate the interaction of Fc or the organic moiety **2** with dsDNA and ssDNA gave negative results, reinforcing the importance of the hybrid skeleton on the activity of **1**.¹⁸

Conclusions

2-Ferrocenyl-1,1-diphenylbut-1-ene (**1**) was not cytotoxic toward GBM monkey cells but was able to decrease, in a concentration-dependent manner, the number of viable cells in the HL-60 line. Cell death was caused by apoptosis, as evidenced by morphological analyses, activation of effector caspases 3 and 7, increased DNA fragmentation, externalization of PS, and a necrosis process at the highest concentration. Furthermore, **1** interfered with the cell cycle, leading to accumulation of cells in the G₂/G₁ phase. Interaction with dsDNA and ssDNA suggests that the mechanism of action involves molecular damage to DNA via intercalation.

Experimental Section

Preparation of 2-ferrocenyl-1,1-diphenylbut-1-ene (**1**) and 1,1,2-triphenylbut-1-ene (**2**)

The synthesis of **1** has been previously reported.²¹ Briefly, **1** was obtained by a Friedel-Crafts acylation of Fc, followed by a McMurry cross-coupling of propionyl Fc with benzophenone.

The preparation and characterization of **2** has been reported.²¹ However, we here use a one-step laboratory method, starting from commercially available propiophenone and benzophenone. Triethylamine chloride (7.5 g, 44 mmol, 40 mmol) was added dropwise to a suspension of zinc powder (3.9 g, 60 mmol) in dry THF at 10 °C. The mixture was heated at reflux for 2 h. A second solution was prepared by dissolving propiophenone (1.24 g, 1.33 mL, 10 mmol) and benzophenone (1.82 g, 10 mmol) in dry THF. This latter solution was added dropwise to the first solution, and the solution was stirred at reflux for an additional 2 h. After cooling to room temperature, the mixture was stirred with water and dichloromethane, acidified with dilute hydrochloric acid until the dark color disappeared, and decanted. The aqueous layer was extracted with dichloromethane, and the organic layers were combined and dried over magnesium sulfate. After concentration under reduced pressure, the crude product was separated by preparative HPLC with acetonitrile as the eluent to yield pure **2** in 55% yield. Physicochemical data were identical to those in the literature.²¹

Compounds **1** and **2** were purified by semi-preparative HPLC before use. Elemental analysis of **1** and **2** confirmed 94.9% purity.

Biochemistry

Cell lines: HL-60 (acute promyelocytic leukemia), CVCAR-8 (ovarian carcinoma), and 5F-295 (glioblastoma) cell lines were provided by the J.S. National Cancer Institute (Bethesda, MD); alveolar basal membrane (A549) monkey cells were used as a noncancerous cell line for comparison. Cells were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotics at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air.

Cytotoxicity: Cytotoxicity was determined using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay.²² Accordingly, C6W, HL-60, CVCAR-8, and 5F-295 cell lines were seeded in 96-well plates and incubated with 1 (10, 2–313 μM) or vehicle control (DMSO, 0.5%) for 72 h. After the incubation period, a solution of MTT (1 μM) was added to each well and incubated for 5 h. Plates were spectrophotometrically evaluated at 570 nm, and IC₅₀ values were determined using the GraphPad Prism 5.0 software.

Metabolic studies: For the following experiments, HL-60 cells were seeded at a density of 2×10^5 cells/mL and incubated with 1, 2, or 4, at 1 for 24 h. The vehicle (DMSO, 0.1%) and roxobutrin (3.5 μM) were used as negative and positive controls, respectively. Statistical analysis of results was performed using the GraphPad Prism 5.0 software.

Analysis of morphological changes—DAPI stain: Untreated or 1-treated cells were examined for morphological changes by light microscopy (Olympus, Tokyo, Japan). To evaluate nuclear morphology, cells were harvested, transferred to cytospl slides, fixed with methanol for 1 min, and stained with DAPI and eosin.

Flow cytometry analysis: All experimental procedures adopted in flow cytometry analyses essentially followed the methodology described by Montenegro et al.²³ The evaluated parameters were cell membrane integrity, DNA fragmentation, cell cycle, P53 activation, and caspase 3/7 activation. For all experiments, 5000 events were evaluated using a Guava EasyCyt 5 (Milan, Italy) cytometer and Guava Express Plus software. DNA fragmentation and the cell cycle were analyzed by ModFit LT for Win32 version 3.1.

DNA interaction studies

Electrochromicity with dsDNA biosensors: The ability of **1** and **2** to interact with dsDNA was investigated using an electrochemical approach employing DNA-modified glassy carbon electrode (GCE) biosensors.^{24,25} The electrochemical experiments were performed with a conventional undivided three electrode cell using an Autolab PGSTAT-30 potentiostat (Eco-Chemie, Utrecht, the Netherlands) coupled to a microcomputer, interfaced by GPES 4.9 software. A working GCE (diameter = 3 mm), a Pt wire counter electrode, and a Ag/AgCl (Cl⁻ saturated) reference electrode were used. All experiments were conducted at room temperature (25 ± 2 °C) after purging with argon. The DNA used was type I calf thymus (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), highly polymerized, containing 6.2% Na and 13% H₂O, dried, and stored at 0 °C. The electrochemical procedure for the investigation of dsDNA interaction with compounds **1** and **2** involved three steps: preparation of the GCE surface, immobilization of dsDNA gel, and voltammetric transduction. Initially, the GCE was polished with alumina (BAS polishing kit). The electrode was then electrochemically pre-treated with a sequence of cyclic potential scans from 0 to -1.4 V versus Ag/AgCl, KCl (3.1 M) in acetate buffer, washed thoroughly with distilled or *deion* water, and Glee. In order to immobilize the dsDNA, the surface of the electrode was coated with 10 μL of calf thymus DNA solution (containing 12.0 mg of dsDNA in 1.0 mL of acetate buffer, pH 4.5, stored at -20 °C for 48 h), the gel was allowed to dry at room temperature under a stream of nitrogen, and the biosensor was subsequently immersed in 5 mL of ammonium acetate (5.0%) acetate buffer, pH 4.5. For each series of experiments, an identical dsDNA-GCE was prepared as a reference blank. Before analysis, the modified electrode was left for 10 min in contact with the buffer solution containing either 20 μL of ethanol (negative control), or (10 μM) **1** (20 μM), or **2** (10 μM). DPV scans ($\nu = 10$ mV s⁻¹, pulse amplitude = 50 mV and pulse width = 70 ms) and baseline corrections were performed using GPES 4.9.^{26,27}

Electrochemistry of dsDNA in solution: To produce dsDNA by acid-base treatment, dsDNA (1 mg) was dissolved in 1 mL HCl (100 μL) by heating at 100 °C in a sealed glass tube immersed in a boiling water bath for 1 h, followed by neutralization with 1 M NaOH.^{28,29} A freshly prepared solution, consisting of 4 mL dsDNA and 950 μL of ethanol,^{28,29} was added to the electrochemical cell. Simultaneous DPV experiments were conducted between 0 and -1.4 V versus Ag/AgCl, KCl (3.1 M), $\nu = 10$ mV s⁻¹, pulse amplitude = 50 mV and pulse width = 70 ms. Peaks corresponding to the oxidation of guanine and adenine appeared at +0.815 V and +1.164 V, respectively. After rinsing the surface, the GCE was inserted into a solution containing 1 or 2 (50 μL), corresponding to a concentration of 10 μM or 20 (10 μM), and the DPV experiment was repeated. A clean GCE was also employed in DPV experiments involving a 3.1 mV buffer solution of **1** alone (at 4.5), in order to observe possible interference of oxidation waves from compounds **1** or **2**. Baseline corrections were made using the software GPES 4.9.

Spectrophotometric evaluation of interaction with dsDNA: Spectrophotometric studies were carried out with a Shimadzu Multi-scan 1601 or multi array Hewlett Packard 8453 spectrophotometer. The interaction of compound **1** with dsDNA was monitored by the absorption titration method,^{30,31} in which a fixed concentration of DNA (100 μM) was treated with different concentrations of compound **1** (3.2–8 μM) in Tris-HCl buffer (pH 7.4, 0–100% ethanol). A stock solution of DNA was prepared by dissolving 12 mg of calf thymus DNA per mL of acetate buffer. An aliquot (10 μL) was then dissolved in Tris-HCl buffer and kept at 8 °C for 24 h, stirring at frequent intervals to ensure the homogeneity of the solution. The

final concentration of the cDNA solution was measured spectro-photometrically at 260 nm, using the molar extinction coefficient of $\epsilon_{260} = 6600 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ per nucleotide for calf thymus DNA.^{29,30} The concentration of the DNA solution was adjusted to 130 μM . The ratio between the absorbance values at 260 and 280 nm in the DNA spectra (A_{260}/A_{280}) was measured as 1.81, indication of DNA free of protein contamination.^{29,31} The same procedure was performed for compound 2.

Acknowledgements

This research was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), CAPES, FAPESP/PRONEX, FENGRBRIC, UNICAMP, and the National Cancer Institute of Brazil. The authors are also indebted to FOPONEX-CNPq/FAPEAL and the FMRs.

Keywords: antitumor agents • apoptosis • electrochemistry • ferrocenes • HL-60 cells

- [1] M. F. de Souza, A. A. de Souza, E. N. de Silva Junior, J. D. S. Marinho Filho, M. A. B. T. de Moura, D. D. Batista, M. C. Vazconcelos, C. O. Costa, C. Pessoa, V. O. de Moraes, V. I. Ferreira, C. Abreu, A. V. Pires, R. C. Muniz, L. V. Costa-Lobo, M. U. F. Sculart, *Talanta*, **49**, 2012, 28–35.
- [2] A. C. de Oliveira, L. P. Hillard, R. Pigeon, D. S. Batista, E. A. S. Damasceno, R. L. Montenegro, L. V. Costa-Lobo, M. U. F. Sculart, *Int. J. Pharm.*, **43**, 3778–3787.
- [3] A. A. Shah, R. Qureshi, A. M. Khan, R. A. Khair, S. I. Ansari, *J. Mol. Chem. Sci.*, **2010**, 21, 447–451; B. N. C. Araújo, A. Zhanary, A. Vague, E. Paveson, S. Sabhar, M. Murova, C. Jacob, L. A. En, H. A. Mohammed, *Spectrochim. Acta Part A*, **2013**, 116, 1636–1644; H. S. Aguiar, D. K. Jung, R. Vehrste, *J. Photochem. Photobiol. B*, **2013**, 126, 117–132.
- [4] H. R. Warke, B. Kline, U. F. Venetia, *J. Mol. Biol.*, **1964**, 9, 109–111.
- [5] H. Miyakoshi, M. Koshimizu, H. Saito, *Chem. Lett.*, **1964**, 9, 109–111.
- [6] F. Lajko, T. G. Hinc, *J. Spectrosc.*, **2013**, DOI: 10.1155/2013/262352.
- [7] A. I. Hidalgo, A. R. Pineda, J. Sestrenyaga, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2012**, 63, 49–56.
- [8] A. Rosdilla, C. Zago, M. G. Varro, V. Pitaru, A. Corneo, *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, 74, 65–115.
- [9] F. Aguiar, P. Bakhshi, S. Sult, V. S. Rao, M. I. Ali, M. Y. Tahiri, F. Vashan, Z. M. Khan, F. Qureshi, *J. Organomet. Chem.*, **2012**, 912, 1–11.
- [10] M. Gomes, R. Pigeon, S. Top, S. D. Hillard, M. Hudis, L. G. Hartinger, L. J. Mestayer, V. A. Paimon, A. Vessières, G. Jaouen, *ChemMedChem*, **2010**, 5, 2050–2052.
- [11] M. A. Izumi, S. Vetterli, H. P. Durstler, A. Ven, *Exp. Cell Res.*, **2000**, 174, 209–210.
- [12] G. Francil, L. Piskala, V. Maricic, F. Torcili, M. L. Brandi, *J. Organomet. Chem.*, **2006**, 261, 421–427.
- [13] Molecular Weight Data, NIST/NBS, National Center for Data, <http://www.nist.gov/pml/csr/nist/1917/1917data.html>, accessed July 2014.
- [14] S. H. Okada, T. W. Mak, *Nat. Rev. Cancer*, **2004**, 4, 592–603; B. H. Veder, *Quim. Nova*, **2010**, 33, 150–152.
- [15] K. K. Mishra, C. Venugopal, K. Usha, *Org. Res.*, **2008**, 16, 145–151; B. S. J. Mork, D. R. Green, *Col.*, **1996**, 82, 319–322.
- [16] A. Vessières, C. Corbin, V. Heldt, N. Lortie, F. Joye, J. Lacé, J. Leclercq, G. Lemaire, B. A. Toulon, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 509–511.
- [17] D. Osella, P. Mabbioni, D. Colaninno, C. Cavaliere, A. Vessières, G. Jaouen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 1893–1894.
- [18] U. Pfluer, M. Jansen, I. Lemster, *Chem. Commun.*, **2005**, 12, 2006–2017.
- [19] E. A. Korta, L. Di. *Org. Res. Pharm.*, **2008**, 11, 2006–2017.
- [20] E. A. Korta, L. Di. *Org. Res. Pharm.*, **2008**, 11, 2006–2017.
- [21] W. K. Schneider, L. von Angerer, H. Schumacher, B. T. Nölke, H. P. Frensdorfer, *J. Med. Chem.*, **1992**, 35, 1049–1057.
- [22] T. Moura, *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 53–63.
- [23] R. C. Montenegro, A. J. Araújo, M. T. Molina, J. D. S. Marinho Filho, D. D. Batista, L. Vazconcelos, V. O. de Moraes, F. S. Bahia, A. E. M. M. Aires, C. Pessoa, M. U. F. Moraes, L. V. Costa-Lobo, *Chem. Rev.*, **2010**, 104, 437–448.
- [24] A. I. Araújo, A. A. de Souza, E. N. de Silva Junior, J. D. S. Marinho Filho, M. A. B. T. de Moura, D. D. Batista, M. C. Vazconcelos, C. O. Costa, C. Pessoa, V. O. de Moraes, V. I. Ferreira, C. Abreu, A. V. Pires, R. C. Muniz, L. V. Costa-Lobo, M. U. F. Sculart, *Talanta*, **49**, 2012, 28–35.
- [25] F. C. de Almeida, F. S. de Souza, D. C. M. Fereira, V. S. Nascimento, J. C. D. Lopes, A. M. C. Santos, M. Y. Sestreny, C. F. Sales, M. O. F. Goulart, *Spectrochim. Acta Part B*, **2008**, 53, 1519–1528.
- [26] C. D. L. Costa, E. O. C. Costa, F. R. Fomina, L. S. Maria, I. A. S. Silva, L. L. Almeida, L. M. Figueiredo, Jr., W. Pinho, E. S. Berto, T. L. S. Lemos, U. U. Aguiar, B. Aguiar, *Quim. Nova*, **2012**, 35, 1119–1125.
- [27] J. Braz, *Chem. Soc.*, **2012**, 134, 1119–1125.
- [28] M. A. Izumi, A. Siddiqui, A. Vague, S. Sabhar, R. Qureshi, S. Ull-Haque, *Spectrochim. Acta Part A*, **2009**, 74, 1133–1137.

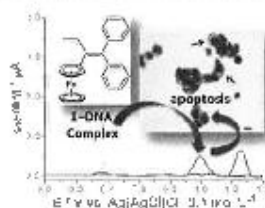
Received: May 27, 2014
Published online: 2014

FULL PAPERS

A. C. de Oliveira, I. G. da Silva,
D. U. Rocha, E. A. Hillard,* P. Pigeon,
S. Jaouen, F. A. R. Rodrigues,
F. C. de Abreu, F. da Rocha Ferreira,
M. O. F. Gualani, L. V. Costa-Lotato*



Molecular Mechanism of Action of 2-Ferrocenyl-1,1-diphenylbut-1-ene on HL-60 Leukemia Cells



Who is the ferrous one of all? 2-Ferrocenyl-1,1-diphenylbut-1-ene, a ferrocene-tamoxifen derivative, provokes DNA fragmentation and apoptosis in HL-60 cells, but is inactive against non-cancerous cells. These results suggest that this ferrocene hybridization strategy may have utility in the future design of antineoplastic therapeutics.