

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

CAMILA CALADO DE VASCONCELOS

# INVESTIGAÇÃO DA ATIVAÇÃO REDOX E DE INTERAÇÕES SUPRAMOLECULARES: O CASO DA BERGENINA E DE NITROAROMÁTICOS SUBSTITUÍDOS

# Universidade Federal de Alagoas

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



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

# CAMILA CALADO DE VASCONCELOS

# INVESTIGAÇÃO DA ATIVAÇÃO REDOX E DE INTERAÇÕES SUPRAMOLECULARES: O CASO DA BERGENINA E DE NITROAROMÁTICOS SUBSTITUÍDOS

Maceió-AL 2015

### CAMILA CALADO DE VASCONCELOS

# INVESTIGAÇÃO DA ATIVAÇÃO REDOX E DE INTERAÇÕES SUPRAMOLECULARES: O CASO DA BERGENINA E DE NITROAROMÁTICOS SUBSTITUÍDOS

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília Oliveira Fonseca Goulart

Maceió-AL 2015

# Catalogação na fonte Universidade Federal de Alagoas Biblioteca Central Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

V331i Vasconcelos, Camila Calado de. Investigação da ativação redox e de interações supramoleculares : o caso da bergenina e de nitroaromáticos substituídos / Camila Calado de Vasconcelos. – 2015. 162 f. : il. tabs., grafs.
Orientador: Marília Oliveira Fonseca Goulart. Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2015. Bibliografia: f. 144-162.
1. Bergenina. 2. Derivados nitrobenzílicos. 3. β-ciclodextrina. 4. Eletroquímica. 5. Produtos naturais. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins 57072-970, Maceió-AL, Brasil Fone: (82) 3214-1144 Email: ppgqb.ufal@gmail.com

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Doutoranda Camila Calado de Vasconcelos, intitulada: "Investigação da ativação redox e interações supramoleculares: o caso da bergenina e de nitroaromáticos substituídos", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 26 de agosto de 2015, às 14h, na Sala de Aulas do PPGQB, na Universidade Federal de Alagoas.

COMISSÃO JULGADORA

Profa. Dra. Marilia Oliveira Fonseca Goulart (UFAL/IQB/PPGQB) – Orientadora

marab avan

Prof. Dr. Marcelo Navarro (UFPE/Recife)

Prof. Dr. Josealdo Tonholo (UFAL/IQB/PPGQB)

Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior (UFAL/ESENFAR/PPGOB)

Prof. Dr. Antonio Albuquerque de Souza ((IFAL/Maceió)

Can C

Prof. Dr. Vinicius Del Colle (UFAL/Arapiraca)

"Ninguém conhece os mistérios da vida nem o seu sentido definitivo, no entanto, para aqueles que desejarem acreditar em seus sonhos e em si mesmo, a vida é uma dádiva preciosa na qual tudo é possível..."

# Legrand

### AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Benedito Carlos e Maria Dolores, pelo alicerce a mim fornecido, sempre primando pela minha educação.

Aos meus irmãos, Carla e Diogo, por me darem oportunidade de desfrutar momentos de imensa alegria na compainha dos meus sobrinhos, Maria Clara, Gabriela e João Carlos.

Ao meu namorado, Gustavo Correia, pelo companheirismo de longa data e amor incondicional, por me compreender mesmo a distância, por saber exatamente o que estou passando sem precisar estar ao meu lado todos os dias. Obrigada pela presença constante na minha mente e no meu coração, e por tornar esta caminhada mais suave.

À Universidade Federal de Alagoas, por permitir trilhar o caminho que escolhi ainda durante o curso de graduação em Farmácia.

À minha orientadora, Profa. Dra. Marília Oliveira Fonseca Goulart pelos ensinamentos transmitidos, oportunidades concedidas e fonte de inspiração na busca do conhecimento.

Aos professores, Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), e Dr. Sérgio Massayoshi Nunomura do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, por disponibilizar a amostra da bergenina.

Aos professores Dra. Renata Barbosa de Oliveira e Dr. Ricardo José Alves da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pela concessão dos nitrocompostos trabalhadas durante a tese.

Aos professores, Dr. Carlos Frontana do Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica (CIDETEC), Querétaro/México e Dr. Felipe J.

González do Departamento de Química do Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Distrito Federal/México, pelo acolhimento em seus laboratórios durante a realização dos ensaios de Ressonância do Spin do Elétron (ESR), que apesar de não terem sido promissores, contribuíram imensamente para minha formação. Agradeço ainda a hospitalidade dos pais e alunas (Georgina e Rutely) do Prof. Carlos Frontana, que me acolheram em seus lares e me permitiram conhecer a cultura mexicana. Obrigada por todas as gentilezas.

Aos colaboradores, Prof. Dr. Davi Alexsandro Cardoso Ferreira do Instituto de Química da Universidade de Brasília (UnB) e Me. Sara Figueirêdo de Alcântara Morais pela colaboração na realização dos estudos teóricos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia que compartilharam seus conhecimentos durante esta trajetória, em especial à Profa. Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino, pelas frutíferas discussões.

Aos que fizeram parte do Grupo de Eletroquímica durante esta jornada, pela convivência harmoniosa, em especial, ao Antonio, pelo conhecimento transmitido e por me permitir desfrutar de sua amizade. Aos meus compadres, Marília e Victor, pelo apoio nos momentos mais decisivos que vivenciei durante estes últimos anos, por me acolher em sua família e me proporcionar imensa felicidade com a chegada de Vinicius. À lara Valentim, pelo exemplo de profissionalismo. À Emanuella Gomes, por compartilhar o conhecimento sobre DNA. À Thaissa, pelo apoio fundamental nestes últimos meses. Enfim, a todos que contribuiram, a seu modo, com este momento.

À Eduarda Omena, aluna de iniciação científica, por toda dedicação e companheirismo durante a execução de parte deste trabalho.

Ao Aldir, pela prontidão e exemplo de generosidade.

À CAPES, pela concessão da bolsa durante a realização deste trabalho.

Aos órgãos financiadores CNPq, FAPEAL e CAPES pelos recursos financeiro.

#### RESUMO

Há forte interesse a cerca de compostos fenólicos e nitrocompostos em função de suas diversas e significativas atividades biológicas. Tais compostos podem participar de reações de transferência de elétrons e produzir metabólitos que influenciam o estado redox em nível celular, com consequente efeito em processos bioquímicos vitais. Deste modo, este trabalho teve como obietivo determinar o mecanismo eletródico envolvido na oxidação da bergenina e na redução dos derivados nitrobenzílicos e avaliar possíveis interações supramoleculares da bergenina com  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e ácido desoxirribonucléico (DNA), a fim de aumentar sua solubilidade em meio aquoso e auxiliar no entendimento do mecanismo molecular de ação biológica. Os estudos eletroquímicos em meio prótico e aprótico foram realizados em potenciostato PGSTAT302 (AUT 73222) da Autolab® através de técnicas voltamétricas. A influência da interação de diferentes ciclodextrinas sobre a solubilidade da bergenina em meio aquoso foi verificada através do estudo de transferência de fase por voltametria cíclica. O complexo bergenina:β-CD foi preparado nas proporções 1:1 e 1:2 através da técnica de co-evaporação e caracterizado através de técnicas espectroscópicas. Os estudos teóricos foram realizados através do programa Gaussian 09. A bergenina na forma livre e complexada foram avaliadas frente à capacidade antioxidante (ensaios de peroxidação lipídica), citotoxicidade (viabilidade celular frente a macrófagos), e a interação com DNA estimada através da utilização de sensor eletroquímico de dsDNA (fita dupla) e com ssDNA (fita simples) e espectrofotometria UV-Vis, em solução. Os resultados eletroquímicos obtidos para bergenina demonstraram que seu mecanismo de oxidação em meio aprótico e prótico envolve, respectivamente, a perda de 1e/1H<sup>+</sup> e de 2e/2H<sup>+</sup>, ao utilizar eletrodo de carbono vítreo. Os dados teóricos contribuiram para esclarecer que os mecanismos oxidativos envolvem as hidroxilas fenólicas. A atividade antioxidante da bergenina verificada nos ensaios de inibição de lipoperoxidação foi favorecida em sua forma complexada com β-CD na proporção 1:1. A citotoxicidade da bergenina avaliada em macrófagos também sofreu influência da interação com β-CD. Os estudos eletroquímicos envolvendo ssDNA demonstraram interação entre bergenina e as bases constituintes do DNA. sugerindo um possível mecanismo de ação biológico. Já os estudos com biossensor de dsDNA, não demonstraram interação. A investigação da interação com dsDNA através da espectrofotometria UV-Vis resultou numa constante de ligação entre DNA e bergenina na forma livre e complexada na ordem de  $10^3$  e  $10^4$  M<sup>-1</sup>. respectivamente. O comportamento eletroquímico dos derivados nitrobezílicos obtidos em meio aprótico apresentaram um perfil voltamétrico de grande complexidade, envolvendo padrões relacionados a reações de autoprotonação e de transferência de elétrons dissociativa. A ordem de facilidade de redução, baseada em valores de potencial de primeira onda de redução, encontrada foi: ANB > EANBEN > EANB > AANB > ANOH > ATN = ENF > ANBNa > ENM > ANF, obtendose correlação positiva entre os compostos com maior potencial de redução (menos negativos) com atividade biológica mais pronunciada (atividades leishmanicida e antitumoral), já descritas na literatura, o que justifica a importância da investigação eletroquímica de compostos bioativos como ferramenta em química medicinal, em processos relacionados à transferência de elétrons.

**Palavras-chave:** Bergenina; Derivados nitrobenzílicos; Interações supramoleculares; β-ciclodextrina; Ácido desoxirribonucléico; Eletroquímica.

### ABSTRACT

There is a strong interest in phenolic compounds and nitrocompounds in the function of their diverse and significant biological activities. Such compounds can participate in electron transfer reactions and produce metabolites that influence the redox state at the cellular level, with consequent effect on vital biochemical processes. This work aimed to determine the electrodic mechanism involved in the oxidation of bergenin and the reduction of nitrobenzyl derivatives and to evaluate possible supramolecular interactions of bergenin with  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) and deoxyribonucleic acid (DNA) in order to increase its solubility in aqueous medium and help in understanding the molecular mechanism of biological action. The electrochemical studies in protic and aprotic medium were performed in potentiostat PGSTAT302 (AUT 73222) from Autolab® using voltammetric techniques. The influence of the interaction of different cyclodextrins on the solubility of bergenin in aqueous medium was verified through the phase transfer study by cyclic voltammetry. The bergenin:β-CD complex was prepared in 1:1 and 1:2 proportions by the coevaporation technique and characterized by spectroscopic techniques. The theoretical studies were performed through the Gaussian program 09. Bergenin in the free and complexed form were evaluated against antioxidant capacity (lipid peroxidation assays), cytotoxicity (cell viability versus macrophages), and interaction with estimated DNA through the use of dsDNA (double strand) electrochemical sensor and with ssDNA (single strand) for UV-Vis spectrophotometry in solution. The electrochemical results obtained for bergenin demonstrated that its oxidation mechanism in aprotic and protic environments involves, respectively, loss of 1e/1H<sup>+</sup> and 2e/2H<sup>+</sup>, when using a glassy carbon electrode. Theoretical data contributed to clarify that oxidative mechanisms involve phenolic hydroxyls. The antioxidant activity of bergenin in the lipoperoxidation inhibition assays was favored in its complexed form with  $\beta$ -CD 1:1. The cytotoxicity of bergenin evaluated in macrophages was also influenced by interaction with  $\beta$ -CD. The electrochemical studies involving ssDNA demonstrated interaction between bergenin and the constituent bases of DNA, suggesting a possible mechanism of biological action. However, the dsDNA biosensor studies showed no interaction. Investigation of the interaction with dsDNA through UV-Vis spectrophotometry resulted in a binding constant between DNA and bergenin in the free and complexed form on the order of 10<sup>3</sup> and 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>, respectively. The electrochemical behavior of the nitrobenzyl derivatives obtained in aprotic medium presented a voltammetric profile of great complexity, involving patterns related to autoprotonation and dissociative electron transfer reactions. The order of ease of reduction, based on values of first wave reduction potential, was found: ANB > EANBEN > EANB > AANB > ANOH > ATN = ENF > ANBNa > ENM > ANF, obtaining a positive correlation between the compounds with (less negative) with more pronounced biological activity (leishmanicidal and antitumor activities), already described in the literature, which justifies the importance of the electrochemical investigation of bioactive compounds as a tool in medical chemistry, in processes related to the transfer of electrons.

**Keywords:** Bergenin; Nitrobenzylic derivatives; Supramolecular interactions; β-cyclodextrin; Deoxyribonucleic acid; Electrochemistry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Correlação entre ativação redox e química medicinal21
Figura 2 – Comparação do escopo de sistemas multi-componentes envolvidos
na química molecular e supramolecular
Figura 3 – Aplicações biomédicas envolvendo sistemas supramoleculares 25
Figura 4 – Áreas de atuação das ciclodextrinas26
Figura 5 – Estrutura química das ciclodextrinas mais comuns27
Figura 6 – Estereoconfiguração, representação geométrica e tridimensional da
β-CD e suas dimensões28
Figura 7 – Representação esquemática da formação de um típico complexo de
inclusão com CDs em meio aquoso na proporção 1:1 (a) e 1:2 (b). 34
Figura 8 – Perfil voltamétrico do ácido úsnico (AU) na ausência e na presença
de β-CD utilizando tampão fosfato pH 7,0 como eletrólito suporte e
eletrodo de CV a 50 mV s <sup>-1</sup> 37
Figura 9 – Estrutura química do nucleotídeo e suas bases nitrogenadas38
Figura 10 – Ilustração dos tipos de modificação que moléculas ligantes podem
formar no DNA, incluindo ligações cruzadas, intercalação, quebra
da dupla fita do DNA e moléculas leitoras de códigos genéticos. A
hélice do DNA é também mostrada associada com proteínas, como
a topoisomerase II, e com estruturas secundárias do DNA40
Figura 11 – Estrutura química da mecloretamina (a) e da doxorrubicina (b)40
Figura 12 – Mecanismo de oxidação da guanina e da adenina
Figura 13 – Perfil voltamétrico do ssDNA (linha em vermelho) e dsDNA (linha
em preto) em tampão acetato, pH 4,5 utilizando eletrodo de carbono
vítreo43
Figura 14 – Esquema geral da biossíntese da bergenina a partir do ácido
chiquímico47
Figura 15 – Estrutura tridimensional atribuída à bergenina em conformação de
energia mínima48
Figura 16 – Danos celulares associados ao desequilíbrio redox
Figura 17 – Processo de peroxidação lipídica e ação antioxidante do $\alpha$ -
tocoferol. Na iniciação, pró-oxidantes abstraem o hidrogênio alílico

formando o radical lipídico e o carbono radicalar tende a estabilizar a molécula por rearranjo para formar o dieno conjugado (etapa 1). Na fase de propagação, o radical lipídico reage rapidamente com oxigênio para formar o radical peroxila (etapa 2) que abstrai um hidrogênio de outra molécula de lipídio gerando um novo radical lipídico e hidroperóxido (etapa 3). Na reação de terminação, antioxidantes doam um átomo de hidrogênio ao radical peroxila resultando na formação de produtos não radicalares (etapa 4)......56

- Figura 18 Provável mecanismo biorredutivo de nitroaromáticos......61
- Figura 19 Sonda fluorescente C11-Bodipy ancorada a um lipossoma. Reação de geração de radicais durante o ensaio de peroxidação lipídica. .76
- Figura 20 Conversão do MTT para formazana pela succinil desidrogenase. .78
- Figura 22 (a) VPD e (b) VOQ da bergenina em meio aprótico. [Bergenina] =  $1,0 \text{ mmol } L^{-1} \text{ em } DMF/TBABF_4(0,1 \text{ mol } L^{-1});$  eletrodo de CV......84
- Figura 24 Voltamogramas cíclicos da bergenina em diferentes soluções etanólicas (10% v/v) tamponadas. (a) Tampão acetato, pH 4,5; (b) Tampão fosfato, pH 7,0; Tampão carbonato, pH 10,0. [Bergenina] = 2,0 mmol L<sup>-1</sup>; eletrodo de CV; v = 0,05 V s<sup>-1</sup>......87
- Figura 26 Voltamogramas de pulso diferencial (a) e de onda quadrada (b) da bergenina em meio prótico. [Bergenina] = 2,0 mmolL<sup>-1</sup> em solução etanólica (10%) tamponada, pH 4,5; eletrodo de CV......90

Figura 28 – Provável mecanismo de oxidação da bergenina em meio prótico, tampão acetato, pH 4,5......92

Figura 29 – Vias metabólicas in vivo propostas para bergenina em ratos. ......94

- Figura 30 Voltamogramas cíclicos da bergenina (massa equivamente a 0,5 mmol L<sup>-1</sup>) em tampão acetato pH 4,5 na presença de massas equivalente a 0,05 mmol L<sup>-1</sup>, 0,5 mmol L<sup>-1</sup> e 5 mmol L<sup>-1</sup> de α-CD (a), β-CD (b) e HP-γ-CD (c); eletrodo de CV, v = 0,10 V s<sup>-1</sup>. Inserção: *I*p<sub>a</sub> *vs.* [CD].
- Figura 32 Espectros de RMN-H<sup>1</sup> da bergenina (a), β-CD (b) e do complexo bergenina:β-CD nas proporções 1:1 (c) e 1:2 (d) obtidos por coevaporação e solubilizados em D<sub>2</sub>O......101

Figura 36 – Coordenada de reação da oxidação da bergenina a bergenina radical e sua complexação com β-CD.

- Figura 37 Coordenada intrínseca de reação da formação da bergenina radical usando a água como solvente explícito.......112
- Figura 38 Proteção contra a peroxidação lipídica (%) proporcionada pela bergenina (♦) (100 µmol L<sup>-1</sup>) e complexo bergenina:β-CD 1:1 (∗) e 1:2 (■) (100 µmol L<sup>-1</sup>). Tampão fosfato pH 7,4 (▲) e β-CD (▼) (100 µmol L<sup>-1</sup>) como controle negativo, e Trolox (●) como controle positivo (100 µmol L<sup>-1</sup>).
- Figura 39 Efeito da bergenina, β-CD e complexo bergenina:β-CD nas proporções 1:1 e 1:2 na viabilidade de linhagem de macrófagos J774 usando o ensaio MTT. Os dados foram expressos como % de células viáveis comparados ao grupo de células viáveis e

- Figura 41 Comparação dos voltamogramas de pulso diferencial da bergenina,  $\beta$ -CD e complexo bergenina: $\beta$ -CD nas proporções 1:1 (c) e 1:2 (d) em solução etanólica (10% v/v) de ssDNA em tampão acetato pH 4,5 após exposição de 15 minutos na concentração de 100 µmol L<sup>-1</sup>. CV:  $\nu = 5$  mV s<sup>-1</sup>.....120

- Figura 45 Espectro de absorção UV-Vis de dsDNA (98 μmol L<sup>-1</sup>) em solução etanólica (10% v/v) tamponada (Tris-HCI) na ausência e na presença de concentrações crescentes de β-CD (1,6 – 4,8 μmol L<sup>-1</sup>) (a e b). Gráfico de 1/ΔA versus 1/[β-CD] (c)......124
- Figura 46 Espectro de absorção UV-Vis de dsDNA (98 µmol L<sup>-1</sup>) em solução etanólica (10% v/v) tamponada (Tris-HCI) na ausência e na presença de concentrações crescentes do complexo bergenina:β-CD 1:1 (2,0

– 4,4 μmol L <sup>-1</sup> ) (a e b). Gráfico de 1/ΔA versus 1/[bergenina:β-CD
1:1] (c)
Figura 47 – Espectro de absorção UV-Vis de dsDNA (98 µmol L <sup>-1</sup> ) em solução
etanólica (10% v/v) tamponada (Tris-HCI) na ausência e na presença
de concentrações crescentes do complexo bergenina:β-CD 1:2 (2,8
– 6,4 µmol L <sup>-1</sup> ) (a e b). Gráfico de 1/ $\Delta A$ versus 1/[bergenina: $\beta$ -CD
1:2] (c)
Figura 48 – Voltamogramas cíclicos em meio aprótico (DMF/TBABF <sub>4</sub>
0,1 mol L <sup>-1</sup> ) dos derivados nitrobenzílicos. Eletrodo de CV. $\nu$ =
100 mV s <sup>-1</sup> 129
Figura 49 – Mecanismo típico de redução de nitrocompostos em meio aprótico.
Figura 50 – Voltamogramas cíclicos e mecanismo de redução proposto para o
composto ENM em meio aprótico131
Figura 51 – Voltamogramas cíclicos dos compostos EANBEN (a e b), EANB (c e
d) e AANB (e e f) pertencentes ao grupo 2 em meio aprótico133
Figura 52 – Esquema mecanístico de transferência de elétrons dissociativa
proposto para os haletos benzílicos do grupo 2
Figura 53 – Voltamogramas cíclicos dos compostos ATN (a e b) e ANOH (c e d)
pertencentes ao grupo 3 em meio aprótico
Figura 54 – Mecanismo típico de autoprotonação observado para os
compostos do grupo 3 (ATN e ANOH)136
Figura 55 – Voltamogramas cíclicos dos compostos ANB (a e b), ENF (c e d) e
ANF (e e f) pertencentes ao grupo 4 em meio aprótico138
Figura 56 – Voltamogramas cíclicos do composto ANBNa (grupo 5) em meio
aprótico139

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estrutura química da bergenina (a) e dos derivados nitrobenzílicos
estudados (b)20
Tabela 2 – Forças propulsoras para formação de estruturas supramoleculares.
Tabela 3 – Efeitos supramoleculares de ciclodextrinas (CDs) sobre a redução
eletroquímica de diferentes compostos
Tabela 4 – Efeitos supramoleculares de ciclodextrinas (CDs) sobre a oxidação
eletroquímica de diferentes compostos
Tabela 5 – Solubilidade em água, toxicidade e custo das principais CDs33
Tabela 6 – Métodos mais comuns utilizados para o preparo de complexos de
inclusão envolvendo CDs35
Tabela 7 – Exemplos de compostos fenólicos que tiveram sua interação com
DNA avaliada através de técnicas eletroquímicas e/ou
espectroscópicas45
Tabela 8 – Exemplos de nitroaromáticos que tiveram sua interação com DNA
avaliada através de técnicas eletroquímicas e/ou espectroscópicas.
Tabela 9 – Resultados da capacidade antioxidante da bergenina, expressos em
Cl₅₀ (µg mL⁻¹), descritos na literatura por diferentes métodos53
Tabela 10 – Aplicações clínicas de alguns nitrocompostos58
Tabela 11 – Atividade antiparasitária e citotóxica (Cl <sub>50</sub> $\mu$ mol L <sup>-1</sup> ±DP) dos
derivados nitrobenzílicos estudados64
Tabela 12 – Estrutura química dos derivados nitrobenzílicos em estudo67
Tabela 13 – Fundamentos e finalidade das técnicas eletroquímicas utilizadas.
Tabela 14 – Parâmetros eletroquímicos obtidos a partir da VC da bergenina em
meio aprótico. Estudo em função da velocidade de varredura. <i>E</i> pa
vs.Ag/AgCl/Cl (sat.)84
Tabela 15 – Parâmetros eletroquímicos obtidos a partir da VC da bergenina em
solução etanólica (10%) tamponada, pH 4,5. Estudo em função da
velocidade de varredura. <i>E</i> pa <i>vs</i> . <i>Ag AgCl Cl</i> (sat.)

Tabela 16 – Bandas de absorção no UV-Vis observadas para bergenina e seu produto de eletrólise em meio prótico (tampão acetato, pH 4,5).....92

Tabela 18 – Deslocamentos químicos dos hidrogênios H3 e H5 da β-CD e suas variações ( $\Delta \delta = \delta_{complexada} - \delta_{livre}$ ) em presença de bergenina. ..... 100

Tabela 19 – Valores de densidade de spin da bergenina radical antes e depoisda complexação com a ciclodextrina.108

- Tabela 21 Constante de ligação (*K*<sub>DS</sub>) obtida para a interação do complexo bergenina:β-CD nas proporções 1:1 e 1:2 com dsDNA.......127
- Tabela 23 Potenciais de redução da primeira onda catódica (*E*plc) dos derivados nitrobenzílicos estudados em meio aprótico (DMF/TBABF<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>); eletrodo de CV;  $\nu$  = 100 mV s<sup>-1</sup> e correlação com suas atividades leishmanicida e citotóxica (CI<sub>50</sub> µmol L<sup>-1</sup>±DP) já descritas por Lopes e cols (2011; 2015).......141

# LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

k <sub>2</sub>	Constante para reação de segunda ordem							
ν	Velocidade de varredura de potencial.							
$v^{1/2}$	Raiz quadrada da velocidade de varredura.							
ΔE	Altura do salto de potencial							
⊿E <sub>p</sub>	Diferença de potencial de pico							
⊿G	Energia livre Gibbs							
AAPH	2,2'-azobis-(2-metilpropionamida)di-hidrocloreto							
ABTS	2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico							
CD	Ciclodextrina							
CDs	Ciclodextrinas							
CI <sub>50</sub>	Concentração inibitória mínima capaz de provocar 50% de efeito							
	máximo							
CV	Carbono Vítreo							
DMF	N,N-Dimetilformamida							
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil							
DMSO	Dimetilsulfóxido							
DNA	Ácido desoxirribonucléico							
dsDNA	Ácido desoxirribonucléico em fita dupla (ou dupla hélice)							
E <sub>ap</sub>	Potencial aplicado							
EO	Estresse Oxidativo							
<i>E</i> <sub>p1/2</sub>	Potencial a meia altura da onda							
<i>E</i> p <sub>a</sub>	Potencial de pico anódico							
<i>E</i> p <sub>c</sub>	Potencial de pico catódico							
EPR	Ressonância do Spin de Elétron							
E <sub>redox</sub>	Potencial redox							
ERN	Espécies reativas de nitrogênio							
ERO	Espécies reativas de oxigênio							
ECS	Eletrodo de Calomelano Saturado							
$E_{\lambda}$	Potencial de inversão							
F	Contante de Faraday (96485 C)							
GM	Gota de mercúrio							

GME	Gota de mercúrio estática
GMS	Gota de mercúrio suspensa
Ι	Corrente
<i>l</i> p <sub>a</sub>	Corrente de pico anódica
<i>l</i> p <sub>c</sub>	Corrente de pico catódica
K <sub>app</sub>	Constante aparente de reatividade com o oxigênio molecular
MM	Massa molecular
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolina bromido
n	Número de elétrons
Ni	Níquel
NTC	Nanotubo de carbono
p-NDA	<i>p</i> -nitroso- <i>N,N</i> -dimetilanilina
PC	Pasta de carbono
рН	Potencial hidrogeniônico
Pt	Platina
R	Constante dos gases
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
ssDNA	Ácido desoxirribonucléico em fita simples
т	Temperatura em Kelvin
t <sub>1/2</sub>	Tempo de meia-vida do radical
$TBABF_4$	Tetrafluorborato de Tetrabutilamônio
v/v	Volume por volume
VC	Voltametria Cíclica
VOQ	Voltametria de Onda Quadrada
VPD	Voltametria de Pulso Diferencial
μA	Microampère
τ	Constante de tempo entre o potencial a meia altura da onda e
	potencial de inversão

# SUMÁRIO

1 IN	ITRODUÇÃO	18
2 Re	evisão da literatura	23
2.1	Interações supramoleculares	23
2.1.1	Ciclodextrinas	26
2.1.2	2 DNA	37
2.2	Bergenina	47
2.2.1	Atividade antioxidante	50
2.3	Nitrocompostos	57
2.3.1	Eletroquímica de nitroaromáticos	59
2.3.2	2 Atividade biológica dos derivados nitrobenzílicos em estudo	62
3 OI	BJETIVOS	65
3.1	Geral	65
3.2	Específicos	65
4 E)	XPERIMENTAL	67
4.1	Reagentes e solventes	67
4.2	Estudos eletroquímicos	68
4.2.1	Limpeza padrão do eletrodo de carbono vítreo	71
4.2.2	2 Meio aprótico	71
4.2.3	3 Meio prótico	72
4.2.3	3.1 Eletrólise da bergenina em potencial controlado	72
4.3	Estudos de interação da bergenina com ciclodextrinas	73
4.3.1	Estudo de transferência de fase por voltametria cíclica	73
4.3.2	Preparo do complexo bergenina:β-CD por co-evaporação	74
4.3.3	<sup>3</sup> Caracterização físico-química do complexo bergenina:β-CD	74
4.4	Estudos teóricos para bergenina e para o complexo be	rgenina:β-CD
		75
4.5	Monitoramento da inibição da lipoperoxidação pela bergenina	a e complexo
Berg	genina:β-CD	76
4.6	Ensaio de viabilidade celular	77
4.7	Interação com DNA	78
4.7.1	Estudos de interação com ssDNA via eletroquímica	78
4.7.2	2 Estudos em biossensor de dsDNA	79

4.7.3 Estudo da interação da bergenina e do complexo bergenina:β-CD com DN	IA
por espectroscopia UV-Vis	30
4.7.3.1 Medidas de absorsão no UV-VIs	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 Parte I	32
5.1.1 Estudos eletroquímicos	32
5.1.1.1 Meio aprótico8	2
5.1.1.2 Meio prótico8	6
5.1.1.2.1 Eletrólise em potencial controlado	90
5.1.2 Estudos de interação com ciclodextrinas	<del>)</del> 5
5.1.2.1 Estudo de transferência de fase por voltametria cíclica	<del>)</del> 5
5.1.2.2 Caracterização físico-química bergenina:β-CD	97
5.1.2.3 Estudos teóricos10	6
5.1.2.4 Capacidade antioxidante em sistemas biomiméticos de membrana11	3
5.1.2.5 Ensaio de viabilidade celular11	5
5.1.2.6 Estudos de interação com DNA11	7
5.1.2.6.1 Estudos em sensor eletroquímico11	7
5.1.2.6.2 Estudos em espectroscopia no UV-Vis12	2
5.2 Parte II	28
5.2.1 Estudos eletroquímicos em meio aprótico12	28
5.2.2 Correlação dos parâmetros eletroquímicos obtidos com atividad	le
biológica13	39
6 CONCLUSÃO14	12
7 PERSPECTIVAS14	13
REFERÊNCIAS14	4

### 1 INTRODUÇÃO

Estudos envolvendo a transferência de elétrons são úteis para compreensão dos processos vitais que ocorrem no meio biológico, contribuindo para o entendimento e desenvolvimento de diferentes áreas no domínio da biociência (ABREU, DE et al., 2002; KOVACIC; HALL, 2010).

Diversos processos biológicos baseiam-se em reações de oxirredução, que são responsáveis pela manutenção do fluxo de elétrons indispensável para produzir a energia necessária à execução das funções vitais e de manutenção da integridade celular. Deste modo, a transferência de elétrons entre pares redox promove um ambiente redox em fluidos biológicos, organelas, células e tecidos capaz de fornecer o gradiente eletroquímico ideal para operação dos sistemas bioquímicos (SCHAFER; BUETTNER, 2001; HILLARD et al., 2008; KOVACIC; HALL, 2010). Um exemplo clássico é a cadeia respiratória ou cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e a ação de várias enzimas capazes de oxidar substratos durante o metabolismo de carboidratos, proteínas e lípidios para obtenção de energia (ALMEIDA et al., 2014).

O balanço redox, na célula, é resultante do estado redox de pares de substâncias com capacidade redutora/oxidante que atuam com função sinalizadora frente ao estresse oxidativo ou nitrosativo e, desta forma, o termo estado redox celular encontra-se associado à razão entre as formas reduzida e oxidada de um par redox específico, como GSSG/2GSH, NADP<sup>+</sup>/NADPH e NAD<sup>+</sup>/NADH (SCHAFER; BUETTNER, 2001; VASCONCELOS et al., 2007; SCHWARZLÄNDER et al., 2009). Assim, a capacidade redutora de um par redox pode ser determinada pela concentração das espécies reduzidas e, o potencial de redução, obtido a partir da equação de Nernst:

$$\Delta E = \Delta E^0 - \frac{\mathrm{RT}}{\mathrm{nF}} \ln \mathrm{Q}$$

onde  $\Delta E$  é a diferença de potencial de uma célula eletroquímica em Volts (V), R é a constante dos gases (R = 8,314 J mol<sup>-1</sup>K<sup>-1</sup>), T é a temperatura em Kelvin (K), *n* é o número de elétrons transferidos na reação redox, F é a constante de Faraday (F = 96485 Cmol<sup>-1</sup>) e Q é a expressão de ação das massas.

O estresse oxidativo, por sua vez, acarreta severas alterações nos processos bioquímicos, como o desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidante resultando

no predomínio dos oxidantes, além de alterações nos processos de síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA) e ácido ribonucléico (RNA), síntese de proteínas, ativação de enzimas e regulação do ciclo celular (SCHAFER; BUETTNER, 2001; VALKO et al., 2007).

Vários outros fatores influenciam o mecanismo de ação de compostos bioativos, tais como estereoquímica, solubilidade, permeabilidade da membrana, biodisponibilidade e outros. Entretanto, a transferência de elétrons desempenha um papel fundamental na descrição de mecanismos moleculares como, por exemplo, a bioalquilação redutiva ou oxidativa ou a geração de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, após transferência de elétrons e o metabolismo de xenobióticos (ABREU, DE et al., 2002; ALMEIDA et al., 2014).

A mimetização das diferentes propriedades físico-químicas dos compartimentos celulares requer a realização de estudos eletroquímicos em soluções que imitem a lipofilia (membranas celulares) e a hidrofilia celulares (citoplasma e meio extracelular). Na tentativa de simular tais condições, os estudos da transferência de elétrons são realizados em meios prótico, aprótico e misto, micelar, em miméticos de membrana (HILLARD et al., 2008; PAIVA et al., 2015), organelas e células (SEENIVASAN et al., 2015).

Estudos eletroquímicos envolvendo compostos bioativos fornecem parâmetros termodinâmicos e cinéticos que têm sido correlacionados com dados de atividade biológica para diferentes classes de compostos, como fenóis, quinonas e nitroaromáticos (ABREU, DE et al., 2002; 2011). Informações termodinâmicas como  $Ep_c$  (potencial de pico catódico),  $Ep_a$  (potencial de pico anódico),  $E_{1/2}$  (potencial a meia altura de onda) ou  $E_{redox}$  (( $Ep_c + Ep_a$ )/2) para sistemas reversíveis ou  $Ep_c$  – Ep<sub>a</sub>/2 para processos irreversíveis) e dados cinéticos de reações de transferência de elétrons heterogênea e reações químicas acopladas, como  $k_2$  (constante para é reacão de segunda ordem onde 0 processo caracterizado como desproporcionamento ou dimerização),  $t_{1/2}$  (tempo de meia-vida do radical),  $\tau$  (constante de tempo entre o potencial a meia altura da onda e o potencial de inversão) e Kapp (constante aparente de reatividade com o oxigênio molecular), permitem obter informações sobre a viabillidade de processos de transferência de elétrons in vivo ou in vitro (SUPRUN et al., 2014).

Deste modo, diante da importância da ativação redox na Química Medicinal, há forte interesse acerca de compostos fenólicos e nitrocompostos, visto que apresentam propriedades redox e estão associados a diversas atividades biológicas. Tais compostos, obtidos de origem natural ou sintética, podem participar de reações de transferência de elétrons e produzir metabólitos que podem influenciar o estado redox em nível celular, com consequente efeito em processos bioquímicos vitais (PAULA et al., 2009; KOVACIC, 2012; PEREIRA; CARDOSO, 2012; ANDRES et al., 2013; KOVACIC; SOMANATHAN, 2014).

A bergenina (Tabela 1a), composto fenólico natural, e nitrobenzílicos substituídos (Tabela 1b) de origem sintética são compostos bioativos detentores de propriedades redox e, portanto passíveis de bio-oxidação e biorredução, respectivamente. Conforme descrito por Bajracharya (2015), a bergenina apresenta atividade antiviral, antifúngica, antiplasmódica, anti-inflamatória, hepatoprotetora, anti-arrítmica, antitumoral, anti-ulcerogênica, antidiabética, antioxidante e cicatrizante, entre outras. Já os derivados nitrobenzílicos em estudo apresentam atividade leishmanicida e antitumoral (LOPES et al., 2011, 2015).

Tabela 1 – Estrutura química da bergenina (a) e dos derivados nitrobenzílicos estudados (b).



Fonte: AUTORA, 2015.

Portanto, devido ao amplo potencial terapêutico apresentado pelos compostos supracitados, o presente trabalho visa investigar o comportamento eletroquímico dos mesmos, analisar possíveis interações supramoleculares com ciclodextrinas (CDs) e DNA, de alguns deles, e correlacionar os parâmetros eletroquímicos obtidos com as atividades biológicas já descritas na literatura, visando destacar a importância da ativação redox na Química Medicinal, visto que a eletroquímica fornece informações cinéticas e termodinâmicas que contribuem para elucidação do mecanismo molecular de ação de fármacos, corroboram com evidências em relação aos processos metabólicos, e contribuem para o planejamento de compostos biologicamente ativos, bem como, na compreensão de possíveis mecanismos de interação com macromoléculas alvo como o DNA, enzimas e outras (Figura 1) (HONORIO et al., 2008; ANDRES et al., 2013; PAIVA et al., 2015).





A seguir, será apresentada uma revisão de literatura envolvendo interações supramoleculares, especialmente, com CDs e DNA, seguida de uma abordagem descritiva sobre os compostos de interesse, bergenina e derivados nitrobenzílicos. Os resultados obtidos serão apresentados em duas seções, sendo a parte I referente à bergenina e a parte II, aos derivados nitrobenzílicos.

### 2 REVISÃO DA LITERATURA

#### 2.1 Interações supramoleculares

Durante as últimas décadas, esforços consideráveis têm sido utilizados para o desenvolvimento de numerosos sistemas supramoleculares, bem como na investigação de suas aplicações em catálise, materiais funcionalizados, dispositivos eletrônicos, sensores, nanomedicina e outros (MA; ZHAO, 2015).

Em contraste com a química molecular, que se baseia predominantemente em ligações covalentes, a química supramolecular fundamenta-se em interações intermoleculares, ou seja, associação de dois ou mais blocos de construção que se mantêm unidos por interações não covalentes (Figura 2), tais como ligações de hidrogênio, empilhamento π-π, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e efeitos eletrostáticos. Estas são as mesmas forças que sistemas biológicos utilizam para que associações moleculares sejam favorecidas (ARAKI; TOMA, 2002; ARAÚJO, 2007; LI; LOH, 2008; PINTO, 2012; REINHOUDT, 2013).



Figura 2 – Comparação do escopo de sistemas multi-componentes envolvidos na química molecular e supramolecular.

Fonte: Adaptado de LEHN, 1993.

Em comparação com a maioria das ligações não covalentes, as ligações covalentes são altamente dependentes de orientação, requerem elevada energia de ligação e curtas distâncias entre os átomos, como por exemplo, a energia requerida para ligação C-O é de 340 KJ mol<sup>-1</sup> com distância de 1,43 Å, enquanto as interações não covalentes envolvem baixas energias (Tabela 2) (LEHN, 1993).

Tipo de interação	Energia (kJ mol <sup>-1</sup> )
Hidrofóbica	<40
Eletrostática	~20
Ligação de hidrogênio	12-30
van der Waals	0,4-4
Cátion-π	5-80
Empilhamento π- π	0-50

Tabela 2 – Forças propulsoras para formação de estruturas supramoleculares.

Fonte: Adaptado de LEHN, 1993.

As interações não covalentes apresentam diversas vantagens em relação às ligações covalentes, como a capacidade de fornecer abordagens simples e fáceis para a construção de estruturas supramoleculares, o que evita a síntese em múltiplas etapas e um processo de purificação complicado. Assim, tais ligações propiciam a formação de sistemas dinâmicos, favorecendo a reversibilidade das interações provenientes da dissociação e reconstrução dos sistemas supramoleculares, visto que demandam baixo custo energético (MA; ZHAO, 2015).

A construção de sistemas supramoleculares fornece uma variedade de plataformas de diagnóstico e terapêutica para aplicações em nanomedicina (Figura 4). Para isso, princípios da química supramolecular proporcionam grandes avanços na área da nanotecnologia, incluindo imagem e detecção, usando, por exemplo, reconhecimento molecular do tipo hóspede-hospedeiro de biomoléculas. A literatura também tem enfatizado a aplicabilidade de plataformas nanoestruturadas para vetorização de biocompostos, juntamente com métodos físicos, como microscopia eletrônica e espectroscopia (BOISSELIER; ASTRUC, 2009; MA; ZHAO, 2015).

Assim, um dos maiores desafios da atualidade consiste no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos eficazes e que atuem em alvos terapêuticos de forma seletiva. Blocos de construção com características supramoleculares, como ciclodextrinas, lipossomas, dendrímeros, hidrogéis, nanopartículas entre outros

(Figura 3), são utilizados como moléculas direcionadoras, sinalizadoras, de reconhecimento molecular e como estratégia farmacêutica para otimização das propriedades físico-químicas de compostos bioativos (BUDAL, 2003; MA; ZHAO, 2015; SABOKTAKIN; TABATABAEI, 2015).

Figura 3 – Aplicações biomédicas envolvendo sistemas supramoleculares.



Fonte: AUTORA, 2015.

Neste contexto, um dos recursos mais empregados pela indústria farmacêutica no encapsulamento molecular de princípios ativos é a aplicação de ciclodextrinas, visando o desenvolvimento de formulações farmacêuticas mais estáveis e com maior efeito terapêutico (SABOKTAKIN; TABATABAEI, 2015). Assim, interações moleculares com agregados supramoleculares biomiméticos, como ciclodextrinas e DNA, podem ser investigadas através de técnicas espectroscópicas e eletroquímicas (WANG et al., 2013; PAIVA et al., 2015).

#### 2.1.1 Ciclodextrinas

Entre as diversas moléculas hospedeiras (calixarenos, éteres de coroa, ciclodextrinas, ciclofanos, cucurbiturilas, pilararenos e outros) descobertas e utilizadas para construção de sistemas supramoleculares, as ciclodextrinas (CDs) pertencem a uma classe de anéis macrocíclicos que tem atraído muita atenção, especialmente, pelas aplicações biológicas. Descobertas por Villiers em 1981, as CDs são continuamente estudadas por diversas áreas de atuação, como mostrado na Figura 4 (MA; ZHAO, 2015).

#### Figura 4 – Áreas de atuação das ciclodextrinas.



Fonte: AUTORA, 2015.

A capacidade de formar complexos de inclusão com uma ampla variedade de moléculas é uma das propriedades mais interessantes das CDs. De fato, o encapsulamento molecular afeta positivamente as propriedades fisico-químicas da molécula hóspede, conferindo numerosos benefícios (PINHO et al., 2014; POÓR et al., 2015). Além disso, a complexação com CDs pode ser explorada para mascarar sabores ou odores desagradáveis, reduzir a evaporação e estabilizar substâncias voláteis, proteger moléculas sensíveis à luz ou ao oxigênio, reduzir irritação gástrica,

cutânea ou ocular e prevenir incompatibilidades e interações entre substâncias. As inúmeras vantagens relacionadas à utilização de CDs deve-se à facilidade de acesso aos diferentes tipos de CDs, além de desempenhar um papel decisivo e exitoso, particularmente, na área farmacêutica (MURA, 2014; PINHO et al., 2014; SRINIVASAN et al., 2014).

Em particular, no campo farmacêutico, a complexação com CDs é utilizada principalmente para aumentar a solubilidade e a taxa de dissolução em meio aquoso de fármacos pouco solúveis, e para incrementar sua biodisponibilidade e estabilidade, bem como sua eficácia terapêutica (PASSOS et al., 2013; JAHED et al., 2014; SCHMIDT et al., 2014).

Conceitualmente, ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos de ocorrência natural ou semissintética formados por unidades de D(+)-glicopiranose em ligações  $\alpha$ -1,4. O número de unidades de glicopiranose diferencia as ciclodextrinas em  $\alpha$ -,  $\beta$ -, e  $\gamma$ -CD, com 6, 7 e 8 unidades, respectivamente (Figura 5) (VENTURINI et al., 2008; SALÚSTIO et al., 2009; STALIN et al., 2014).

### Figura 5 – Estrutura química das ciclodextrinas mais comuns.



Fonte: Adaptado de VENTURINI et al., 2008.

O arranjo estrutural de tais unidades gera uma forma de cone truncado, como consequência da conformação de cadeira das unidades D-glicopiranose. As funções hidroxilas são orientadas para o exterior da cavidade, com as hidroxilas secundárias situadas na extremidade mais larga, e as primárias na extremidade mais estreita. Na cavidade central, por sua vez, tem-se a presença átomos de hidrogênio e oxigênio glicosídico em ligação, conferindo-lhe caráter lipofílico. Embora a profundidade das cavidades para os três CDs mais comuns seja semelhante (0,79 nm), seus

diâmetros de cavidade variam de 0,47-0,53, 0,60-0,65 e 0,75-0,83 nm, para  $\alpha$ -,  $\beta$ -, e  $\gamma$ -CD, respectivamente (Figura 6) (SZEJTLI; SZENTE, 2005; MURA, 2014; SRINIVASAN et al., 2014).

Figura 6 – Estereoconfiguração, representação geométrica e tridimensional da  $\beta$ -CD e suas dimensões.



Fonte: Adaptado de MURA, 2014; SRINIVASAN et al., 2014.

Assim, as CDs são caracterizadas por apresentarem uma superfície externa hidrofílica, e uma cavidade interna relativamente hidrofóbica, responsável pela sua solubilidade em água e capacidade de encapsular, parcialmente ou totalmente, moléculas hidrofóbicas de tamanho adequado, originando complexo de inclusão (MURA, 2014).

As ciclodextrinas, portanto, são adequadas para formar complexos de inclusão com moléculas lipofílicas através de interações não covalentes, como forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações eletrostáticas, dipolo-dipolo e por redução da tensão conformacional (Tabela 2) (STALIN et al., 2014).

O complexo de inclusão está presente em equilíbrio dinâmico em solução com seus constituintes, e os tipos de interações que contribuem para formação do mesmo dependem do tipo de CD e da natureza química da mólecula hóspede, uma vez que influencia a estabilidade do sistema. Entretanto, a principal força motriz considerada para formação do complexo hóspede-hospedeiro envolve interações desfavoráveis do tipo polar-apolar entre as moléculas de água e o hóspede, incluídos na cavidade da CD, e, por outro lado, interações favoráveis do tipo apolar-apolar entre o hóspede e a cavidade da CD (MURA, 2014).

De acordo com Schmidt e cols (2014), nos últimos anos, as CDs têm provado ser uma ferramenta útil para a geração de arquiteturas macromoleculares complexas. As CDs são elementos de design atraente, pois formam complexos de inclusão com moléculas hóspedes hidrofóbicas em solução aquosa e oferecem a possibilidade de combinar uma grande variedade de blocos de construção para formar novas arquiteturas macromoleculares com funções específicas. Esse processo somente é possível porque as CDs possuem um grande número de grupos funcionais, hidroxilas primárias (C-6) e secundárias (C-2 e C3), que apresentam reatividades diferentes, direcionando reações específicas (Figura 6).

Nesse contexto, a construção de sistemas supramoleculares utilizando CDs para a formação de novos materiais na superfície eletródica tem permitido a ampliação da utilização de métodos eletroquímicos para análises qualitativas e quantitativas de analitos de interesse biológico, alimentar e ambiental (PALOMAR-PARDAVÉ et al., 2014). A aplicação de diferentes tipos de CDs, inclusive CDs funcionalizadas, com efeitos supramoleculares distintos tem sido registrada na literatura, envolvendo substâncias detentoras de propriedades redutoras (Tabela 2) ou oxidantes (Tabela 3). As referidas tabelas foram elaboradas a partir de pesquisa nas bases de dados disponíveis nos períodicos CAPES/UFAL, utilizando as palavras-chave "cyclodextrin" e "electrochemistry" sem limitação de ano. Vale salientar que apenas as publicações que utilizaram a técnica eletroquímica como ferramenta de análise foram selecionadas para construção das Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 – Efeitos supramoleculares de ciclodextrinas (CDs) sobre a redução eletroquímica de diferentes compostos.

(continua)

TIPO DE CD	MEIO	ELETRODO	OBJETIVO	COMPOSTO	REFERÊNCIA
α-CD, β-CD, M-β-CD	Aprótico, prótico, misto	CV	Estabilidade radicalar	Acetofenona, 4-Cloroacetofenona, 4-Bromobenzofenona, 4-Clorobenzofenona	Amatore et al., 2008
β-CD	Prótico	Pt	Estabilidade radicalar	Riboflavina	Wang; Chen, 1996
α-CD, β-CD	Prótico	CV	Reações de coproporcionamento	Metil-heptilviologenio, Dibenzilviologenio	Lee et al., 1994
β-CD funcionalizada com SBA-15 <sup>a</sup>	Prótico	β-CD-SBA/PC	Seletividade	Orto-, meta-, para-nitrofenol	Xu et al., 2011
β-CD	Prótico	Pt	Reação de complexação	Barbitona de sódio	Wang et al., 1994
β-CD	Prótico	β-CDP/rGO/CV	Quantificação	Imidacloprida	Chen; Meng; et al., 2013; Chen; Wang; et al., 2013
β-CD	Prótico	Ni	Hidrogenação eletrocatalítica	Benzaldeído e derivados	Vilar; Navarro, 2012
β-CD, DM-β-CD	Prótico	CV	Solubilidade	5-Nitroindazol e derivados	Jullian et al., 2008
α-CD, β-CD, M-β-CD, HP-β-CD	Prótico	Grafite em pó	Materiais ionóforos	Ibuprofeno	Sousa et al., 2013
β-CD	Aprótico	CV	Hospedeiro supramolecular	CD-[60]fulereno e conjugados	Giacalone et al., 2006
α-CD, β-CD	Prótico	CV	Estabilidade radicalar	Benzaldeído e acetofenona derivados	Vilar; Navarro, 2010
α-CD	Prótico	GMS	Estabilidade radicalar	Ânion p-nitrofenolato	Kano et al., 1990
β-CD, Μ-β-CD	Prótico	GME	Estabilidade radicalar	Nitrofenil glicosídicos	Gubica et al., 2013
β-CD	Aprótico	GME, GMS	Estabilidade radicalar	Vinclozolina	Pospísil et al., 2001
β-CD, ΗΡ-β-CD	Aprótico, prótico	GMS	Estabilidade radicalar	Triazolopiridilcetona e dipiridilcetona e derivados	Olea-Azar et al., 2008
β-CD	Aprótico	GME, GMS	Estabilidade radicalar	Iprodiona, procimidona	Hromadová et al., 2002
β-CD	Prótico	CV	Estabilidade radicalar	2,4-Dinitrofenol	Srinivasan et al., 2012
β-CD	Prótico	CV	Estabilidade radicalar	2,6-Dinitrofenol	Srinivasan et al., 2013
β,-CD, DM-β-CD e HP-β-CD	Aprótico, prótico	GM	Estabilidade radicalar	Nitrooxoisoaporfina	Pérez-Cruz et al., 2013
α-CD, β-CD, γ-CD	Prótico	CV	Estabilidade radicalar	Metilviologenio	Sivagnanam; Palaniandavar, 1992
HP-β-CD, TRIMEB <sup>▷</sup>	Prótico	Filme de Hg	Solubilidade; Sistema de liberação	Clorofila a	Dentuto et al., 2004

(conclusão)

Т	IPO DE CD	MEIO	ELETRODO	OBJETIVO	COMPOSTO	REFERÊNCIA
α-Cl	D, β-CD, γ-CD	Aprótico, prótico	GMS	Seletividade, dimerização	Acetofenona	Martre et al., 1991
	DM-β-CD	Prótico	GMS	Solubildade	5-Nitroindazol derivados	Pérez-Cruz et al., 2009
	β-CD	Prótico	CV	Solubilidade	β-lapachona	Abreu, de et al., 2007
	β-CD	Prótico	CV	Quantificação	2,6-Dinitroanilina	Srinivasan et al., 2013, 2014
	β-CD	Prótico	CV	Quantificação	2,4-Dinitroanilina	Stalin et al., 2014
<b>O</b> • • /						

GM (gota de mercúrio); GMS (gota de mercúrio suspensa); GME (gota de mercúrio estática). <sup>a</sup>Sílica mesoporosa hexagonal (SBA-15); <sup>b</sup>Heptakis-(2,3,6-tri-O-metil)-β-ciclodextrina (TRIMEB).

TIPO DE CD	MEIO	ELETRODO	OBJETIVO	COMPOSTO	REFERÊNCIA
β-CD	Prótico	CV	Solubilidade	o-Anisidina	Srinivasan et al., 2011
β-CD	Misto	β-CD-NTC-PE	Quantificação	Nifedipina	Gaichore; Srivastava, 2013
6-deoxi-6-N-(2- metiliminopiridina)-β-CD	Aprótico	CV	Estabilidade	Co (I)	Deunf et al., 2009
β-CD	Prótico	β-CD/PC	Quantificação	Bisfenol A	Yu et al., 2013
HS-β-CD	Prótico	HS-β-CD/ AuNPs/HNCMS/CV	Quantificação	1-Naftol; 2-Naftol	Zhu et al., 2012
HS-β-CD	Prótico	MUA/HS-β-CD/Au	Controle de reconhecimento molecular	Imipramina; clorprotixana	Damos et al., 2007
β-CD	Prótico	CV	Solubilidade	Difenilamina	Srinivasana et al., 2011
β-CD	Prótico	CV	Solubilidade	Ferroceno	Zhang et al., 2011
β-CD; HS-β-CD	Prótico	Alcano tiol /HS-β-CD/Au	Solubilidade	Derivados ferrocênicos do tamoxifeno	Mertins et al., 2009
HS-β-CD	Prótico	MUA/HS-β-CD/Au	Solubilidade	Mangiferina	Ferreira et al., 2010; Ferreira et al., 2013
β-CD funcioalizada	Prótico	CD/GRs/PC	Seletividade quiral	2-Clorofenol; 3-Clorofenol	Wei et al., 2014
HS-β-CD	Prótico	CV	Seletividade quiral	Dopamina	Hendy; Breslin, 2011; 2012
β-CD	Prótico	PC/poli-β-CD	Quantificação	Dopamina	Palomar-Pardavé <b>et al., 2014</b>
β-CD; HS-β-CD	Prótico	DB-β-CD/NTC/CV	Quantificação simultânea	4-Aminofenol; 4-Clorofenol; 4-Nitrofenol	Yang et al., 2015

Tabela 4 – Efeitos supramoleculares de ciclodextrinas (CDs) sobre a oxidação eletroquímica de diferentes compostos.

β-CD-NTC-PE (Nanotubo de carbono eletropolimerizado com β-CD); PC (pasta de carbono); AuNPs/HNCMS (Nanopartículas de ouro/microesferas vazias de carbono dopado com nitrogênio); GRs (Grafeno)
Conforme descrito nas Tabelas 3 e 4, é possível verificar que diferentes tipos de eletrodo de trabalho (CV, Pt, Ni, Au, Hg, grafite, pasta de carbono), modificados ou não, podem ser utilizados para avaliar a performance de diversas substâncias na presença de CDs nos meios prótico, aprótico e misto. A finalidade das interações com CDs varia entre aumento da solubilidade e estabilidade, catálise, seletividade quiral, reconhecimento molecular, hospedeiro supramolecular, materiais ionóforos e quantificação de analitos de interesse, evidenciando a influência dessas interações nos diferentes campos da ciência.

Vale ressaltar que entre as CDs relatadas, a  $\beta$ -CD tem sido extensivamente utilizada, embora apresente solubilidade limitada em água, nefrotoxicidade comprovada e custo elevado (Tabela 5). Portanto, algumas  $\beta$ -CD modificadas sinteticamente têm atraído considerável atenção de pesquisadores por apresentarem perfis de solubilidade e toxicidade otimizados, como a sulfobutil éter- $\beta$ ciclodextrina (SBE- $\beta$ -CD), aplicada em diferentes áreas (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; MURA, 2014; LIU et al., 2015)

TIPO DE CD	α-CD	β-CD	γ <b>-C</b> D
Unidades de glicopirasone	6	7	8
Diâmetro interno (nm)	0,47-0,53	0,60-0,65	0,75-0,83
Solubilidade em água (% m/v) a 25 °C	14,5	1,85	23,2
Moléculas de água na cavidade	6	11	17
Toxicidade via oral (dose diária < 600 mg/kg)	ausente	ausente	ausente
Nefrotoxicidade	1 g/kg	0,67 g/kg	ausente
Custo (R\$)*	2.727,00/100g	1064,00/100g	1.801,00/1g

Tabela 5 – Solubilidade em água, toxicidade e custo das principais CDs.

\*Valores obtidos ao consultar site da Sigma Aldrich em 30/03/2015.

Fonte: Adaptado de BREWSTER; LOFTSSON, 2007; SILVA, 2011; MURA, 2014; www.sigmaaldrich.com.

A interação entre moléculas hóspedes e CDs pode ocorrer espontaneamente, a fim de formar compostos de inclusão quando as espécies químicas isoladas são combinadas. Com base na estrutura e propriedades da molécula hóspede, geralmente, observa-se a formação de complexos nas proporções 1:1 e 1:2, conforme ilustrado na Figura 7 (SAVJANI et al., 2012; PASSOS et al., 2013; SCHMIDT et al., 2014).

Figura 7 – Representação esquemática da formação de um típico complexo de inclusão com CDs em meio aquoso na proporção 1:1 (a) e 1:2 (b).



Fonte: Adaptado de DAVIS; BREWSTER, 2004; MURA, 2014.

Devido às características inerentes a cada sistema binário fármaco-CD, não existe um método geral de preparação. As condições devem ser definidas para cada molécula hóspede. Neste sentido, vários métodos têm sido relatados para preparar complexos de inclusão, envolvendo CDs, incluindo os baseados em mistura física, malaxagem, co-evaporação, co-precipitação, irradiação de microondas, fluidificação supercrítica, spray drying, liofilização, neutralização e entre outros (Tabela 6). Diante das diferentes metodologias descritas para formação do complexo de inclusão, a escolha do método está relacionada à disponibilidade de equipamento, rendimento, consumo de energia, utilização de solventes e custo financeiro (CUNHA FILHO, DA; SÁ-BARRETO, 2007; SALÚSTIO et al., 2009; PASSOS et al., 2013; PINHO et al., 2014; SANTOS et al., 2015).

Tabela 6 – Métodos mais comuns utilizados para o preparo de complexos de inclusão envolvendo CDs.

(continua)

MÉTODO	FUDAMENTAÇÃO	REFERÊNCIA
Mistura física	Baseia-se na mistura dos componentes sem adição de água. Geralmente, são necessários vários dias para detectar a formação do complexo, sendo considerado um método pouco eficiente.	Miletic et al., 2013
Malaxagem	Consiste em formar uma pasta a partir da adição de quantidade mínima de líquido suficiente para umedecer a mistura em pó de fármaco e CD. Em escala laboratorial, é realizada em um almofariz e pistilo. Industrialmente, a mistura é efetuada em uma malaxadora, sendo a secagem do material realizada em estufa ou diretamente na malaxadora. Devido à simplicidade, ao elevado rendimento e à facilidade de transposição de escala, este método é um dos mais utilizados na indústria farmacêutica, ainda que sua eficiência de complexação seja inferior à conseguida com outras técnicas.	Santos et al., 2015; Hedges et al., 2005
Co-evaporação	Quantidades estequiométricas do fármaco e de CD são dissolvidas em água ou mistura de solventes (água/etanol). A solução é mantida sob agitação por determinado tempo e, posteriormente o solvente é eliminado por rotaevaporação a vácuo em temperatura fixa. Desta forma, o complexo de inclusão no estado sólido é obtido em hábil quando comparado a outros métodos, porém limita-se à escala laboratorial.	Hirlekar; Kadam, 2009; Octavia et al., 2015
Co-precipitação	Este método parte de uma solução de fármaco e CD e através de mudanças bruscas de temperatura ou adição de solventes orgânicos, se obtém a precipitação do complexo, sendo os cristais coletados por centrifugação ou filtração. É utilizado em escala laboratorial, no entanto, o baixo rendimento conseguido em escalas maiores, o risco de formação de complexos de inclusão com solventes orgânicos e o longo tempo do processamento (um a três dias) torna-o pouco atrativo em escala industrial.	Periasamy et al., 2014
Irradiação de microondas	A aplicação de radiações eletromagnéticas não-ionizantes em temperatura, pressão e potência controlada favorece a formação de complexos de inclusão com alto rendimento e menor tempo. Permite o uso ou não de solventes.	Wen et al., 2004
Fluidização supercrítica	Consiste em um dos métodos mais inovadores de obtenção de complexos em estado sólido. Emprega-se CO <sub>2</sub> em estado supercrítico, não utiliza solventes orgânicos, é rápido, de baixo custo de manutenção, porém apresenta um custo inicial elevado.	Cunha Filho, Da; Sá-Barreto, 2007
"Spray drying"	Também denominado de secagem por aspersão ou atomização. A mistura parcial do sistema e a rápida eliminação da água propiciam eficiência de complexação elevada. É um método rápido e econômico, capaz de remover solventes, orgânicos ou aquosos ou a mistura deles.Permite controlar o tamanho de partículas, porém o estresse térmico apresenta-se como limitação.	Salústio et al., 2009; Oliveira; Petrovick, 2010; Passos et al., 2013

Tabela 6 – Métodos mais comuns utilizados para o preparo de complexos de inclusão envolvendo CDs.

(conclusão)

MÉTODO	FUDAMENTAÇÃO	REFERÊNCIA
Liofilização	Também conhecido como freezing drying, este método consiste na eliminação de solventes do sistema em solução através do congelamento prévio e posterior secagem à pressão reduzida. Apresenta elevado rendimento e baixo estresse térmico. Entretanto, possui longo tempo de processamento (horas a dias) e, consequentemente, alto consumo de energia, o que limita sua aplicabilidade em nível industrial.	Passos et al., 2013; Santos et al., 2015
Neutralização	A amostra de interesse e a CD são solubilizadas em solução básica (NaOH) e, posteriormente neutralizada com solução ácida (HCI) para formação do precipitado. Este, por sua vez, é separado da solução, lavado com etanol puro absoluto e seco a temperatura ambiente. Este método apresenta limitações quanto à natureza da molécula.	Liu et al., 2010

Já a avaliação da formação do complexo de inclusão entre o hóspede e a cavidade da CD requer o uso de diferentes métodos de análise, cujos resultados devem ser combinados e analisados em conjunto, uma vez que cada método explora características particulares das interações existentes. Os principais métodos utilizados para caracterização do complexo incluem técnicas espectroscópicas (ultravioleta/visível (UV-Vis)), infravermelho (IV), dicroísmo circular, fluorescência, ressonância magnética nuclear (RMN) e ressonância do spin do elétron, analíticas (polarografia, voltametria, potenciometria e condutimetria) e de separação (cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar), além de polarimetria e calorimetria exploratória diferencial (DSC), entre outras (MURA, 2014a; STALIN et al., 2014).

A eletroquímica pode auxiliar no entendimento dos mecanismos de inclusão por meio das mudanças observadas na corrente (Ip) e potencial (Ep) de pico de moléculas hóspedes com propriedades oxidantes ou redutoras (ABREU, DE et al., 2007; FERREIRA et al., 2013). De acordo com a Figura 8, por exemplo, é possível verificar mudanças no perfil voltamétrico do ácido úsnico, derivado fenólico natural de baixa solubilidade em meio aquoso, em presença de  $\beta$ -CD em estudo de transferência de fase, sendo observado aumento na intensidade de Ipa e deslocamento de Epa para potenciais menos positivos, implicando no aumento de solubilidade e favorecimento do processo de oxidação (VASCONCELOS, 2011).

É importante salientar que estudos de interação entre compostos detentores de propriedades redox e CDs, via eletroquímica, sofrem influência da natureza do

solvente (prótico ou aprótico) de co-solventes, do tipo de eletrodo de trabalho, além do mecanismo redox dos compostos que podem contribuir para passivação da superfície do eletrodo, dificultando e demandando maior tempo de análise (VASCONCELOS, 2011).

Portanto, ao longo deste trabalho, serão abordados estudos de interação da bergenina com CDs via eletroquímica, preparo e caracterização dos complexos bergenina- $\beta$ -CD nas proporções 1:1 e 1:2, através do método de co-evaporação e métodos de caracterização moleculares convencionais e estudos computacionais. Tais estudos terão como objetivos verificar o aumento da solubilidade da bergenina na presença de  $\beta$ -CD, e avaliar possível influência frente à sua atividade antioxidante e interação com DNA.

# Figura 8 – Perfil voltamétrico do ácido úsnico (AU) na ausência e na presença de β-CD utilizando tampão fosfato pH 7,0 como eletrólito suporte e eletrodo de CV a 50 mV s<sup>-1</sup>.



Fonte: VASCONCELOS, 2011.

#### 2.1.2 DNA

Atualmente, ensaios que avaliam possíveis interações entre moléculas ligantes e alvos biológicos como enzimas, proteínas, lipídios e ácidos nucléicos apresentam grande relevância para o avanço da ciência que permeia a interface da química e da biologia. A investigação da interação de pequenas moléculas cujo alvo

biológico é o ácido desoxirribonucléico (DNA) está entre os aspectos mais importantes para o planejamento de novos fármacos, compreensão de suas ações terepêuticas e citotoxicidade (HUANG et al., 2001; CATALÁN et al., 2010; MCLAUGHLIN et al., 2011; SIRAJUDDIN et al., 2013; SHAHABADI et al., 2014).

O DNA é a biomolécula responsável pela determinação das características hereditárias, pois é transportador da informação genética, além de instruir a síntese de proteínas e enzimas por meio dos processos de replicação e transcrição da informação genética celular (SHAHABADI; HEIDARI, 2014). Estruturalmente, o DNA é constituído por duas cadeias antiparalelas formadas por unidades monoméricas de nucleotídeos. Cada nucleotídeo é formado por três componentes químicos: um grupo fosfato, uma pentose (desoxirribose), e uma base nitrogenada (Figura 9), sendo as bases púricas, adenina (A) e guanina (G), e as bases pirimídicas, citosina (C) e timina (T), responsáveis pela codificação da informação genética. A dupla hélice de DNA, portanto, é resultante de ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas, A-T e G-C (OLIVEIRA-BRETT et al., 2002; BUORO et al., 2014).





Fonte: Adaptado de YANG; GUO, 1999.

A interação entre moléculas ligantes e DNA, muitas vezes, causa alterações significativas na estrutura e/ou sequência específica das bases, podendo propiciar alterações patológicas nos organismos vivos em função da ação mutagênica ou carcinogênica. A presença de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), por exemplo, podem induzir danos oxidativos ao DNA, onde a guanina é a base mais facilmente oxidada, com formação da 8-hidroxiguanina. Por outro lado, ligantes que exibem um elevado potencial quimioterápico podem suprimir a replicação ou a transcrição gênica em tumores celulares (OLIVEIRA BRETT et al., 2000; IHMELS; OTTO, 2005; BASILI et al., 2007; LABUDA et al., 2010; BENNER et al., 2014).

O DNA tem se destacado como biomolécula alvo de diferentes classes de compostos, tais como, fenóis, ferrocifenos, quinonas, nitrocompostos e outros, visto que ele oferece vários sítios de ligação (PAULA et al., 2009; ZHOU et al., 2010; CHIN CHUNG et al., 2011; SANTARINO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2014). A primeira etapa dos processos carcinogênicos e mutagênicos decorre de interações entre espécies químicas eletrofílicas com o DNA, seja de forma direta ou após ativação metabólica. Os sítios que potencialmente interagem com espécies eletrofílicas são os centros nucleofílicos do DNA: nitrogênio e oxigênio das bases púricas e pirimidicas, assim como o esqueleto fosfato (BENIGNI; BOSSA, 2011).

Moléculas ligantes podem interagir com o DNA por três principais mecanismos: (a) inibição da DNA topoisomerase e inibição da DNA e/ou RNA polimerase, (b) ligação com RNA e (c) ligação direta à dupla hélice de DNA através de interações eletrostáticas, intercalação entre os pares de bases ou ligações covalentes (Figura 10) (HELI et al., 2005; ŠTEFANIŠINOVÁ et al., 2011).

O mecanismo de interação com o DNA, por sua vez, pode variar em função das características do ligante, podendo ocorrer, por exemplo, através de interações hidrofóbicas (fenda menor) ou eletrostáticas (fenda maior), e intercalação entre os pares de bases nitrogenadas (CATALÁN et al., 2010; DOLATABADI et al., 2011). Entre os agentes antineoplásicos que apresentam interação com o DNA, destacam-se os agentes alquilantes, principalmente as mostardas nitrogenadas, como a mecloretamina (SILVA et al., 2012) e a doxorrubicina (Figura 11), como agente intercalante (BRETT et al., 2002).

Desta forma, a investigação da interação entre compostos bioativos e DNA é de grande relevância para o entendimento de suas atividades biológicas e toxicidade

*in vivo* (PAULA et al., 2009; ZHOU et al., 2010; CHIN CHUNG et al., 2011; SANTARINO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2014). Além disso, é importante ressaltar o grande interesse em identificar moléculas que apresentem a capacidade de impedir ou minimizar danos ao DNA (JANJUA et al., 2009; SHAHABADI et al., 2014)

Figura 10 – Ilustração dos tipos de modificação que moléculas ligantes podem formar no DNA, incluindo ligações cruzadas, intercalação, quebra da dupla fita do DNA e moléculas leitoras de códigos genéticos. A hélice do DNA é também mostrada associada com proteínas, como a topoisomerase II, e com estruturas secundárias do DNA.



Fonte: Adaptado de HURLEY, 2002; SILVA et al., 2012.

Figura 11 – Estrutura química da mecloretamina (a) e da doxorrubicina (b).



Fonte: AUTORA, 2015.

Várias técnicas, tais como eletroforese em gel, espectrofotometria UV-Vis, espectrofluorimetria, cristalografia de raio-X, ressonância magnética nuclear (RMN),

infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), dicroísmo circular e modelagem molecular, têm sido utilizados para explorar a interação entre moléculas ligantes e DNA. Técnicas eletroquímicas também são adequadas para investigação rápida e direta dessa interação, e portanto contribuem na química medicinal como ferramenta útil no planejamento de compostos bioativos que apresentam como alvo biológico o DNA, visando acompanhar o seu potencial citotóxico (WANG, Z. et al., 2003; RAUF et al., 2005; CATALÁN et al., 2010; DOGAN-TOPAL; OZKAN, 2011).

Nesse sentido, a eletroquímica pode oferecer uma visão geral sobre a identificação de possíveis interações com o DNA, bem como obter dados analíticos (constante de interação), baseados na resposta eletroquímica do DNA e/ou da molécula eletroativa em questão (CATALÁN et al., 2010; DOLATABADI, 2011).

Biossensores eletroquímicos de DNA permitem mensurar processos onde ocorrem ligações específicas com o DNA. Estes consistem em dispositivos de reconhecimento biológico para o dsDNA (double strand ou fita dupla) ou ssDNA (single strand ou fita simples), imobilizado sobre um transdutor eletroquímico (eletrodo de trabalho). A interpretação dos resultados obtidos é realizada através da comparação dos perfis voltamétricos obtidos para o biossensor em eletrólito suporte e quando em contato com o analito de interesse (MOUSTY, 2004; CHIORCEA-PAQUIM et al., 2009; DOGAN-TOPAL et al., 2009).

Analitos (fármacos, pró-fármacos ou intermediários gerados *in situ*) que interagem com o DNA podem romper as ligações de hidrogênio, que mantém as fitas unidas, resultando na exposição das bases constituintes e, deste modo, técnicas voltamétricas (VPD, VOQ e VC) podem monitorar a oxidação das bases expostas, avaliando-se a alteração causada no DNA (ABREU, DE et al., 2008).

A oxidação eletroquímica do DNA em eletrodo de carbono vítreo através da voltametria de pulso diferencial, meio ácido (pH 4,5), apresenta dois picos de oxidação torno de +0,8V e +1,1V, referentes às bases púricas guanina e adenina, respectivamente, sendo as bases pirimídicas (timina e citosina) eletroinativas, nestas condições. A oxidação da guanina (2-amino-6-hidroxipurina) e adenina (6-aminopurina) envolve a perda de quatro elétrons e quatro prótons e seis elétrons e seis prótons, respectivamente, conforme Figura 12 (OLIVEIRA-BRETT et al., 1995; 2002; LA-SCALEA et al., 1999; WANG et al., 2001; DICULESCU et al., 2005; BENIGNI; BOSSA, 2011).



#### Figura 12 – Mecanismo de oxidação da guanina e da adenina.

Fonte: Adaptado de LA-SCALEA et al. 1999; WANG et al., 2001.

O comportamento eletroquímico obtido para o dsDNA (double strand ou fita dupla) difere do ssDNA (single strand ou fita simples). O dsDNA apresenta dificuldade de transferência de elétrons para a superfície do eletrodo devido à sua forma rígida e, por isso quase nenhuma resposta é observada no perfil voltamétrico. Já o ssDNA, que se encontra em uma forma flexível, suas bases estão mais suscetíveis a processos de oxidação e, portanto, apresenta correntes de pico de alta intensidade de corrente (Figura 13) (BRETT et al., 1999; DICULESCU et al., 2005; DOMÉNECH-CARBÓ et al., 2014).

A interação de pequenas moléculas com DNA pode ser acompanhada via eletroquímica de forma direta, onde o biossensor é mantido em contato com a solução da substância em análise, por um tempo determinado, ou a partir da ativação prévia da substância (redução ou oxidação do grupo eletroativo) com geração de intermediários reativos (ABREU, DE et al., 2002; OLIVEIRA-BRETT et al., 2002). Em ambas situações, a interação será positiva diante de alteração no perfil voltamétrico das bases, observando mudança de intensidade de corrente e deslocamento de potencial de pico.

Figura 13 – Perfil voltamétrico do ssDNA (linha em vermelho) e dsDNA (linha em preto) em tampão acetato, pH 4,5 utilizando eletrodo de carbono vítreo.



Fonte: Adaptado de DISCULESCU et al., 2005.

Métodos espectroscópicos, como a espectroscopia UV-Vis, também são considerados sensíveis para investigar a interação entre pequenas moléculas e DNA. O DNA apresenta um máximo de absortividade molar, referente ao grupamento fosfato dos nucleotídeos, (ε: 6600 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) a 260 nm e, por esta razão, estudos quantitativos podem ser realizados a fim de verificar possíveis interações. Estas, por sua vez, são acompanhadas em função de alterações no espectro UV-Vis do dsDNA e/ou analito. A absorvência do dsDNA aumenta quando as ligações de hidrogênio entre cadeias são rompidas, sendo esse aumento na absortividade molar denominado efeito hipercrômico (SAMUEL et al., 2003; DOLATABADI; KASHANIAN, 2010; ZHANG et al., 2015).

Os deslocamentos batocrômicos (maiores comprimentos de onda) acompanhado de efeito hipocrômico (diminuição da absortividade molar) também são, geralmente, observados no espectro de absorção de moléculas ligantes com o DNA, devido às modificações em sua estrutura eletrônica. Entretanto, quando o espectro da substância de interesse é altamente superponível com o do DNA, é difícil obter informações precisas sobre possíveis interações, sendo necessário a aplicação de outras técnicas capazes de corroborar com o resultado obtido por UV-Vis. Estas alterações espectrais permitem conhecer aspectos como a constante de ligação do complexo e dimensões do sítio de ligação (RAUF et al., 2005).

Portanto, para obter mais informações sobre os mecanismos de citotoxicidade é importante avaliar, além das propriedades eletrônicas de compostos bioativos de origem natural ou sintética, seu ambiente molecular. Para isso, medidas espectroscópicas são adequadas para verificar a ocorrência de possíveis interações intermoleculares com o DNA. Assim, deslocamentos específicos no espectro de absorção refletem a estabilização de grupos moleculares e em seus estados excitados e, consequentemente, nas interações existentes (WANG et al., 2003; JIMENÉZ-ALONSO et al., 2011).

As Tabela 7 e 8 apontam alguns compostos fenólicos e nitroaromáticos, respectivamente, que tiveram sua interação com DNA avaliada através de técnicas eletroquímicas e/ou espectroscópicas. Neste trabalho, tais técnicas foram utilizadas para avaliar possível interação entre bergenina e DNA, já que este composto fenólico detém grupos cromóforos que possuem tanto propriedades redox quanto espectroscópicas. Alguns derivados nitrobenzílicos também foram avaliados através do biossensor de dsDNA e ssDNA.

Tabela 7 – Exemplos de compostos fenólicos que tiveram sua interação com DNA avaliada através de técnicas eletroquímicas e/ou espectroscópicas.

COMPOSTO	MÉTODO/ELETRODO	TIPO DE DNA	TIPO DE INTERAÇÃO	k*(L mol⁻¹)	REFERÊNCIA
Quercetina	VPD/CV	dsDNA	Intercalação		Dolatabadi, 2011
Morina; Quercetina; Rutina	UV-Vis	dsDNA	Intercalação	4,25x10 <sup>3</sup> ; 7,20x10 <sup>4</sup> ; 7,01x10 <sup>4</sup>	Janjua et al., 2009
Kaempferol, Apigenina; Luteolina	UV-Vis	dsDNA	Intercalação		Rusak et al., 2010
Quercetina	UV-Vis; VC; VPD/CV	dsDNA	Intercalação		Zhu et al., 2002
Hidroxianisol butilado; Butilhidroquinone terciária; 2-tert-butil-4-metilfenol; Propilgalato	UV-Vis; VC/CV	dsDNA	Intercalação; Intercalação; Intercalação; Não-intercalador	9,54x10 <sup>4</sup> 2,20x10 <sup>5</sup> 7,69x10 <sup>4</sup> 0,71x10 <sup>2</sup>	Dolatabadi; Kashanian, 2010
Ácido Úrico	VPD/PC	dsDNA	Intercalação		Mohamadi et al., 2014
Magnolol	UV-Vis; CA/CV	dsDNA	Intercalação	1,14x10⁵	Zhou et al., 2010

\*Constante de interação entre o composto de interesse e dsDNA. VC: voltametria cíclica; VPD: voltametria de pulso diferencial; CV: carbono vítreo; PC: pasta de carbono; CA: cronoamperometria.

Tabela 8 – Exemplos de nitroaromáticos que tiveram sua interação com DNA avaliada através de técnicas eletroquímicas e/ou espectroscópicas.

COMPOSTO	MÉTODO/ ELETRODO	TIPO DE DNA	TIPO DE INTERAÇÃO	k*(L mol⁻¹)	REFERÊNCIA
1-Nitro-4- (4- (4-nitrofenoxi) butoxi) benzeno; 1-Nitro-4- (3- (4-nitrofenoxi) propoxi) benzeno; 1-Nitro-4- (5- (4-nitrofenoxi) pentiloxi) benzeno; 1-Nitro-4- (6- (4-nitrofenoxi) hexiloxi) benzeno	VC/CV	dsDNA	Intercalação	7,3×10 <sup>4;</sup> 1,0×10 <sup>5</sup> ; 3,3×10 <sup>4</sup> ; 5,1×10 <sup>4</sup>	Janjua et al., 2014
Niclosamida	VPD/CV	dsDNA	Intercalação		Abreu et al., 2002
2-(2-Nitrofenil)-1H-benzoimidazol; N-benzoil-2-(2-nitrofenil)-benzoimidazol	VPD/CV	dsDNS	Eletrostática	8,22x10 <sup>4</sup> 3,08x10 <sup>6</sup>	Catalán et al., 2010
Nitrofurantoína {1- (amino-hidantoin 5-nitro-2- furfurilideno}	UV-Vis, VC, VPD/EGM	dsDNA	Intercalação	8,22x10 <sup>6</sup>	Yola; Özaltin, 2011
Ácido <i>p</i> -nitrobenzóico	VC/CV	dsDNA/ (Fe (4-TMPyP))	Redução eletrocatalítica		Chen; Chen, 2003
<i>p</i> -Nitrofenol	VC/CV	dsDNA/ (Fe (2-TMPyP))	Redução eletrocatalítica		Chen; Chen, 2003
Dibutil-estanho (IV) bis (4-nitrofenil etanoato)	VC	dsDNA	Intercalação	3,25x10 <sup>3</sup>	Sirajuddin et al., 2013
N´-(2-hidroxibenzilideno) hidrazida fórmica	UV-Vis	dsDNA	Intercalação		Sirajuddin et al., 2013
4-Nitrofenilferroceno	UV-Vis	dsDNA			Sirajuddin et al., 2013

<sup>a</sup>A elaboração desta tabela contou com participação do mestre Anastácio Boane. \*Constante de interação entre o composto de interesse e dsDNA. VC: voltametria cíclica; VPD: voltametria de pulso diferencial; CV: carbono vítreo; EGM: eletrodo de gota de mercúrio; Fe(n-TMPyP) = porfirinas de ferro solúveis em água (n = 2 e 4).

### 2.2 Bergenina

Em geral, compostos C-glicosilados, naturais ou sintéticos, têm despertado interesse da comunidade científica, visto que apresentam elevado potencial bioativo. São estáveis em meio ácido e, portanto, resistentes à hidrólise (TOSS, 2010; AGGARWAL et al., 2014). A bergenina constitui um dos principais metabólitos secundários C-glicosídicos derivados da via do ácido chiquímico, sendo obtida a partir de uma reação de C-glicosilação do ácido gálico com subsequente formação da lactona, seguida de metilação (Figura 14) (HUSSAIN, 2000; SCIO, 2004; CZELUSNIAK et al., 2012).

Figura 14 – Esquema geral da biossíntese da bergenina a partir do ácido chiquímico.



FONTE: Adaptado de HUSSAIN, 2000; TOSS, 2010.

A bergenina (C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>O<sub>6</sub>) é um constituinte ativo que tem sido isolado de diferentes espécies vegetais, tais como: *Astilbe chinensis*, *Ardisia creanta*, *Bergenia crassifolia*, *Bergenia stracheyi*, *Bergenia ligulata*, *Caesalpinia decapetala*, *Caesalpinia digyna*, *Corylopsis spicata*, *Endopleura uchi*, *Mallotus philippinensis*, *Mallotus japonicus*, *Rodgersia sambucifolia*, *Sacoglottis gabonensis*, *Saxifraga stolonifera* e entre outras (YE et al., 2004; CHEN et al., 2008; BORGES et al., 2011; NAZIR et al., 2011; PATEL et al., 2012; SONG et al., 2013; UDDIN et al., 2013; WEI et al., 2013; GANGWAR et al., 2014; GAO et al., 2014; BAJRACHARYA, 2015).

Conforme descrito por Ye e cols (2004), a bergenina é composta por três anéis de seis membros, um aromático, uma  $\delta$ -lactona e uma *D*-glicopiranose (Figura 15). O anel  $\delta$ -lactona apresenta a configuração de meia-cadeira, enquanto o anel *D*-glicopiranose exibe pequenos desvios de uma conformação de cadeira ideal (Figura 15). Os substituintes hidroxila e hidroximetila localizados nos centros quirais (C-11, C-12 e C-13) adotam uma conformação equatorial em relação ao anel glicopiranose (Figura 15b e 15c). As estruturas da bergenina mostradas na Figura 15 admitem a conformação de energia mínima obtida a vácuo pelo programa Chem3D Pro 12.0 software.

Figura 15 – Estrutura tridimensional atribuída à bergenina em conformação de energia mínima.



FONTE: Adaptado de YE et al., 2004; NUNOMURA et al., 2009.

A bergenina contém cinco grupos hidroxila, considerados potencialmente ativos (NAZIR et al., 2011), que se encontram em ligação de hidrogênio. As hidroxilas fenólicas em C-5 e C-7 exibem constantes de dissociação de 5,46 (pKa<sub>1</sub>) e 5,74 (pKa<sub>2</sub>), respectivamente (ZHOU et al., 2008). Este derivado fenólico apresentase sob a forma de um sólido cristalino incolor, obtido após recristalização em metanol, com ponto de fusão em torno de 237 °C e de baixa solubilidade em meio aquoso (LU; WANG, 2003; SRINIVASAN et al., 2007; NASSER et al., 2009; KUMAR et al., 2012; PATEL et al., 2012; CHAUHAN et al., 2013).

Polifenóis naturais de origem vegetal são frequentemente associados com valores medicinais e, muitas vezes, são utilizados como intermediários para produtos industriais e aplicações farmacológicas. Recentes estudos têm demonstrado que a bergenina, derivado do ácido 4-O-metilgálico C-glicosídico, se destaca como um

representante da classe das isocumarinas por apresentar diversas atividades biológicas, poucos efeitos colaterais e baixa toxicidade (TOMÉ, 2010; PAL et al., 2011; PATEL et al., 2012; TACON; FREITAS, 2013; ZHANGA et al., 2013; CHAUHAN et al., 2013; LIANG et al., 2014; BAJRACHARYA, 2015).

Entre as propriedades farmacológicas atribuídas à bergenina, inclui-se atividade anticoagulante (MADUSOLUMUO; OKOYE, 1995), antioxidante (GUPTA; SHARMA, 2006; ABREU, DE et al., 2008; KIM et al., 2013; TACON; FREITAS, 2013; UDDIN et al., 2013; 2014; YUN et al., 2014), neuroprotetora, anti-HIV (PIZZA et al., 1996), hepatoprotetora (KIM et al., 2000), antitussígena (LIM et al., 2000), anti-artrite (NAZIR et al., 2007; BORGES et al., 2011), anti-inflamatória (GAO et al., 2014), antifúngica, imunomoduladora (NUNOMURA et al., 2009; PATEL et al., 2012; GAO et al., 2014), anti-arrítimica (VIJAYA KUMAR et al., 2011), antimicrobiana (POLITE et al., 2011;RAJ et al., 2012), antiplasmódica (UDDIN et al., 2013; LIANG et al., 2014), hipolipidêmica, antidiabética (KUMAR et al., 2012), anti-ulcerogênica (PATEL et al., 2012), antitumoral (SUMINO et al., 2002; WIBOWO et al., 2011; KIM et al., 2013; LIU et al., 2014; YAN et al., 2014) e como inibidor de produtos de glicação avançada (VIJAYA KUMAR et al., 2011).

Apesar da natureza ser uma fonte altamente diversificada de compostos bioativos, raros são os produtos isolados que apresentam potência, seletividade e propriedades farmacocinéticas adequadas. Entretanto, produtos naturais isolados podem ter tais propriedades alteradas a partir da utilizaçãode ciclodextrinas, por exemplo, que atua como adjuvante tecnológico para melhorar a solubilidade, dissolução e biodisponibilidade do fármaco, bem como para otimizar sua ação terapêutica (GUEDES et al., 2008).

Portanto, na tentativa de aumentar a solubilidade da bergenina em meio aquoso, estudos envolvendo CDs ( $\alpha$ ,  $\beta$  e HP- $\gamma$ -CD) foram conduzidos. Os benefícios da interação entre bergenina e  $\beta$ -CD em relação a bergenina livre foram verificados a partir da capacidade de inibir a lipoperoxidação, da interação com DNA, através de estudos eletroquímicos e espectrofotométricos, bem como, da avaliação da atividade citotóxica frente macrófagos (J774).

# 2.2.1 Atividade Antioxidante

Entre as propriedades biológicas apresentadas pela bergenina, a atividade antioxidante vem sendo continuamente estudada (PATEL et al., 2012; BAJRACHARYA, 2015). Diversos componentes biológicos (carboidratos, proteínas, lipídios, enzimas e nucleotídeos) são susceptíveis a processos oxidativos diante da pesença de radicais livres (MURPHY et al., 2011; NIKI, 2012; AYALA et al., 2014). Estes são definidos como qualquer espécie que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, ocupando um orbital atômico ou molecular, sendo quimicamente instáveis e reativos, como por exemplo, o ânion radical superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroxila (HO<sup>-</sup>), o radical do óxido nítrico ('NO) e o radical dióxido de nitrogênio ('NO<sub>2</sub>). No entanto, algumas espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) não são radicais livres (ácido hipocloroso (HOCI), oxigênio singlete ( $^{1}O_{2}$ ), ozônio ( $O_{3}$ ), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e ânion peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>)) mas podem induzir reações radicalares no organismo (LIMA et al., 2001; HALLIWELL, 2011; EL-BELTAGI; MOHAMED, 2013; RAHAL et al., 2014).

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são formadas *in vivo* a partir do metabolismo celular (fontes endógenos) ou por exposição a fontes exógenas (radiação gama, fármacos e cigarro). A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de um sistema de defesa antioxidante para limitar os níveis celulares e impedir a indução de danos (BIANCHI; ANTUNES, 1999; GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010; GUTOWSKI; KOWALCZYK, 2013).

Antioxidantes são substâncias em concentrações presentes baixas, comparadas às concentrações do substrato oxidante. que previnem significativamente ou atrasam a oxidação de substratos susceptíveis. Os principais mecanismos de ação de compostos antioxidantes incluem captura de radicais e supressão de estados excitados, constituindo-se em sistemas catalíticos que neutralizam ou eliminam ERO/ERN e/ou favorecem a ligação de íons metálicos a proteínas, o que torna esses íons, principalmente Fe<sup>2+</sup> e Cu<sup>+</sup>, indisponíveis para a produção de espécies oxidantes (CERQUEIRA et al., 2007; HALLIWELL, 2012).

De acordo com Halliwell (2011), antioxidantes endógenos como as enzimas superóxido dismutase, a catalase e a glutationa peroxidase interagem com os compostos oxidantes minimizando os efeitos deletérios causados pelo estresse oxidativo às células e tecidos. Já os antioxidantes exógenos, são aqueles obtidos, geralmente, através da alimentação como as vitaminas C (ácido ascórbico) e E (α-tocoferol).

O desequlíbrio entre a geração de ERO/ERN e a ação de sistemas de proteção antioxidante, em favor dos oxidantes, é denominado estresse oxidativo, sendo, portanto, uma condição biológica de elevada concentração de espécies reativas que causa danos oxidativos associados às alterações das funções vitais (Figura 16). A maior consequência do estresse oxidativo é o dano aos ácidos nucléicos, lipídios e proteínas, o que pode comprometer severamente o funcionamento e a viabilidade celular ou induzir uma variedade de respostas celulares através da geração de espécies reativas secundárias, levando à morte celular por necrose ou apoptose (HALLIWELL, 2011; GUTOWSKI; KOWALCZYK, 2013).





Fonte: Adaptado de HALLIWELL, 2011.

Os danos celulares e teciduais, induzidos pelas espécies reativas e/ou depleção de antioxidantes, têm sido associados à etiologia de diversas patologias como câncer, cardiopatias, aterosclerose, doenças hepáticas, doenças do sistema imune e neurodegenerativas (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010; HALLIWELL, 2012; NIKI, 2012; REPETTO et al., 2012; RAHAL et al., 2014).

Estudos têm sido realizados em busca de propor mecanismos que relacionam o envolvimento de espécies reativas ao desenvolvimento de patologias. Além disso, tem-se demonstrado grande interesse na descoberta de novos compostos antioxidantes, visando assim, a redução dos danos oxidativos e/ou a prevenção de doenças (NAVA-VILLALBA et al., 2013; AYALA et al., 2014).

Neste contexto, diferentes ensaios têm sido descritos na literatura para avaliar a capacidade antioxidante da bergenina, como a inibição dos radicais DPPH (2,2difenil-1-picrilhidrazil) (TAKAHASHI et al., 2003; SRINIVASAN et al., 2007; ABREU, DE et al., 2008; NAZIR et al., 2011; ZAMARRUD et al., 2011; HABTEMARIAM; COWLEY, 2012; KIM et al., 2013; UDDIN et al., 2013, 2014), ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico), peróxido de hidrogênio e óxido nítrico (SRINIVASAN et al., 2007) e inibição da lipoperoxidação induzida por 2,4-dinitrofenilhidrazina (MADUKA et al., 2002) e por cloreto férrico (SRINIVASAN et al., 2007) (Tabela 8).

De acordo com a Tabela 9, é possível verificar que a bergenina apresentou significativa atividade antioxidante frente ao peróxido de hidrogênio, ABTS, DPPH, e ensaio de inibição da lipoperoxidação com valores de CI<sub>50</sub> (concentração inibitória mínima capaz de provocar 50% de efeito máximo) 32,54, 75,06, 165,35 e 365,12 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Entretanto, baixa atividade antioxidante foi verificada mediante os métodos de óxido nítrico (CI<sub>50</sub> 785,63 µg mL<sup>-1</sup>) e desoxirribose (CI<sub>50</sub> 815,63 µg mL<sup>-1</sup>), além de mostrar-se inativa frente aos radicais hidroxila pelo método p-NDA (*p*-nitroso-*N*,*N*-dimetilanilina) e superóxido pelo método DMSO alcalino.

Tabela 9 – Resultados da capacidade antioxidante da bergenina	, expressos em Cl₅₀ (μg mL⁻¹)	, descritos na literatura por dife	erentes
métodos.			

ENSAIOS ANTIOXIDANTES	BERGENINA	ÁCIDO ASCÓRBICO <sup>a</sup>		ÁCIDO GÁLICO <sup>a</sup>	REFERÊNCIAS
	320,00		4,35		Takahashi et al., 2003
Frente ao radical DPPH	127,30			1,10	Habtemaram; Cowley, 2012
	165,35	4,97			
Frente ao cátion radical ABTS	75,06	11,25			
Frente ao peróxido de hidrogênio	32,54	187,33			
Ensaio de inibição do radical óxido nítrico	785,63				
Atividade inibitória da lipoperoxidação induzida por cloreto férrico	365,12				Srinivasan et al., 2007
Frente ao radical hidroxila pelo método desoxirribose	815,63				
Frente ao radical hidroxila pelo método do <i>p</i> -nitroso dimetil anilina	>1000,00	>1000,00			
Frente ao radical superóxido pelo método de DMSO alcalino	>1000,00				

<sup>a</sup>Padrão utilizado; (-----) Não realizado.

Conforme descrito por Singh e cols (2009), a reação da bergenina com radical hidroxila (°OH) gerado por radiólise de pulso demonstrou a formação de produtos radicalares em função da adição do °OH ao anel fenil da bergenina e abstração do átomo de H. Geralmente, polifenóis reagem com radical °OH para produzir radical fenoxila, entretanto, no caso da bergenina, adutos radicalares reduzidos são formados, podendo reagir com oxigênio e formar radicais peroxila. Desta forma, a bergenina não atua como um potente antioxidante na prevenção de radicais livres induzidos no dano oxidativo, entretanto, pode atuar como pró-oxidante, ou seja, pode induzir o estresse oxidativo por geração de ERO ou inibir sistemas antioxidantes, podendo exibir atividade antitumoral (PALOZZA, 1998; RAHAL et al., 2014; BAJRACHARYA, 2015). Cálculos teóricos envolvendo a formação dos derivados radicalares da bergenina utilizando °H, °OH, °CH<sub>3</sub> e °CCl<sub>3</sub> revelaram que o grupo metoxila na posição 6 é o local mais favorável para um ataque radicalar (DE ABREU et al., 2008).

Dentre os ensaios citados, a inibição da lipoperoxidação pela bergenina é de extrema importância, visto que a oxidação das membranas celulares é utilizada como um indicador do estresse oxidativo (LIMA et al., 2001; GUTOWSKI; KOWALCZYK, 2013).

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação é baseada na ocorrência de diversos processos bioquímicos resultantes da ação de radicais livres sobre os ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares induzindo modificações estruturais nos constituintes celulares (BENZIE, 1996; LIMA et al., 2001; GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010; AYALA et al., 2014). O dano oxidativo celular pode ser inibido por antioxidantes que interrompem a cadeia de peroxidação reagindo com estes radicais e, desta forma, gerando um hidroperóxido e um radical livre formado a partir do antioxidante. De acordo com a literatura, o α-tocoferol (vitamina E) é um exemplo que apresenta seu mecanismo antioxidante bem estabelecido, visto que interrompe a reação em cadeia da peroxidação lipídica sequestrando os radicais alquilperoxila (NIKI, 2012; REPETTO et al., 2012).

O processo global da peroxidação lipídica é constituído por três etapas: iniciação, propagação e terminação (Figura 17). Na etapa de iniciação o grupo metileno de ácidos graxos poli-insaturados é atacado por radicais livres, havendo o rearranjo das duplas ligações na forma de dieno conjugado, onde simultaneamente há formação de um radical alquila (L<sup>•</sup>) no carbono central. Este radical, por sua vez,

reage com  $O_2$  formando alquilperoxila (LOO<sup>•</sup>). Já na etapa de propagação o alquilperoxila ataca outras moléculas de lipídios, desencadeando reações sucessivas. Na etapa de terminação as reações em cadeia são interrompidas por interação entre os próprios radicais (não mostrado na Figura 17) ou entre radicais e  $\alpha$ -tocoferol, originando produtos não-radicalares e o radical tocoferila, sendo este reduzido por ação do ácido ascórbico (CERQUEIRA et al., 2007; EL-BELTAGI; MOHAMED, 2013; AYALA et al., 2014).

A peroxidação lipídica ou reações do oxigênio com lipídios insaturados produz uma variedade de produtos de oxidação. Os principais produtos primários da peroxidação lipídica são hidroperóxidos lipídicos. Entre os diferentes aldeídos que podem ser formados como produtos secundários durante a peroxidação lipídica temse o malonaldeído (MDA), propanal, haxanal e 4-hidroxinonenal (4-HNE), sendo o MDA considerado o produto mais mutagênico, enquanto o 4-HNE é o mais tóxico (AYALA et al., 2014).

Portanto, é de grande interese avaliar a atividade antioxidante da bergenina livre e complexada com  $\beta$ -CD frente à inibição da peroxidação lipídica induzida pelo radical AAPH (2,2'-azobis(2-metilpropionamida)di-hidrocloreto), visando ressaltar seu potencial antioxidante, bem como, comprovar os benefícios atribuídos à complexação com  $\beta$ -CD.

Figura 17 – Processo de peroxidação lipídica e ação antioxidante do α-tocoferol. Na iniciação, pró-oxidantes abstraem o hidrogênio alílico formando o radical lipídico e o carbono radicalar tende a estabilizar a molécula por rearranjo para formar o dieno conjugado (etapa 1). Na fase de propagação, o radical lipídico reage rapidamente com oxigênio para formar o radical peroxila (etapa 2) que abstrai um hidrogênio de outra molécula de lipídio gerando um novo radical lipídico e hidroperóxido (etapa 3). Na reação de terminação, antioxidantes doam um átomo de hidrogênio ao radical peroxila resultando na formação de produtos não radicalares (etapa 4).



Fonte: Adaptado de CERQUEIRA et al., 2007; AYALA et al., 2014.

### 2.3 Nitrocompostos

Os nitrocompostos têm sido amplamente estudados em diferentes áreas, tais como química medicinal, toxicológica, química orgânica, ambiental e eletroquímica. O modo de ação desta classe de compostos está associado às propriedades redox do grupo nitro e, consequentemente, à estabilidade ou reatividade das espécies reduzidas que podem interagir com alvos biológicos, como enzimas, membranas e DNA, fornecendo subsídios para suas atividades biológicas e efeitos adversos (PAULA et al., 2009; KOVACIC; SOMANATHAN, 2014; BUSSY et al., 2014).

A redução do grupo nitro (-NO<sub>2</sub>), em nível molecular, ocorre devido ao seu caráter fortemente aceptor de elétrons (eletrofílico) e pelo efeito de ressonância entre o nitrogênio e os átomos de oxigênio. Entretanto, a estabilidade e reatividade das espécies eletrogeradas dependem da estrutura química do nitrocomposto que, por sua vez, influencia suas propriedades físico-químicas e biológicas (DE ABREU et al., 2002; SQUELLA et al., 2005).

Os nitrocompostos são empregados como agentes terapêuticos com diferentes aplicações clínicas (Tabela 10). Entre as distintas classes de nitrocompostos bioativos, os derivados nitrobenzílicos destacam-se devido à sua capacidade biorredutora, responsável por suas inúmeras atividades biológicas, especialmente, antiparasitária e antitumoral. Isto se deve ao fato dos compostos nitrobenzílicos poderem ser metabolizados *in vivo* gerando intermediários reativos que podem atuar como cicladores redox ou como alquilantes do DNA (MORALES-MORALES et al., 2007; PAULA et al., 2009; LOPES et al., 2015).

Ao longo das décadas, grande atenção tem sido reportada aos nitroaromáticos, pois além de suas atividades terapêuticas, atuam largamente como pesticidas, explosivos e intermediários químicos na síntese industrial. Sua relevância como contaminante ambiental também está associada à sua capacidade de interagir com o DNA e provocar toxicidade, mutagênese e carcinogênese (SALAMANCA-PINZÓN et al., 2010; ANDRES et al., 2013; KOVACIC; SOMANATHAN, 2014). Desta forma, devido à grande aplicabilidade terapêutica dos nitroaromáticos e suas propriedades biorredutíveis, estudos eletroquímicos em meio prótico e aprótico podem contribuir para compreensão de suas atividades biológicas (SOUZA et al., 2010).

APLICAÇÃO CLÍNICA	NITROCOMPOSTO	EXEMPLO/CLASSE
Antianginoso	02N 0 NO2 02N 0 NO2	Nitroglicerina/Nitroalifático
Anti-hipertensivo	H <sub>3</sub> COOC NO <sub>2</sub> COOCH <sub>3</sub>	Nifedipina/Nitrobenzílico
Anticoagulante		Acenocumarol/Nitrobenzílico
Sedativo hipnótico	O <sub>2</sub> N N	Nitrazepan/Nitrobenzílico
Anti-inflamatório		Nimesulida/Nitrobenzílico
Anti-histamínico	NO <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	Ranitidina/Nitroalifático
Antimicrobiano		Cloranfenicol/Nitrobenzílico
Antiparasitário		Secnidazol/Nitroimidazólico
Antitumoral		1-(1,5-dicloropentano-3-il)-4- nitrobenzeno/Mostarda/ Nirobenzílico

# Tabela 10 – Aplicações clínicas de alguns nitrocompostos.

Fonte: Adaptado de SQUELLA et al., 2005; PAULA et al., 2009.

#### 2.3.1 Eletroquímica de nitroaromáticos

Estudos eletroquímicos de nitrocompostos datam do início de 1900, quando Haber reportou as etapas envolvidas na redução do nitrobenzeno, entretanto, este grupo de compostos continua a gerar interesse na comunidade científica, visto que vários nitrocompostos são produzidos com finalidade terapêutica e, consequentemente, são introduzidos em organismos vivos e metabolizados, envolvendo, na maioria das vezes, processos redox (SQUELLA et al., 2005; MOSCOSO et al., 2011; LOPES et al., 2015).

Diante da contínua investigação eletroquímica de nitrocompostos, é possível observar que o mecanismo de diferentes classes de nitroaromáticos envolve uma série de adições monoeletrônicas que podem estar acopladas a reações químicas subsequentes, responsáveis pelos diferentes perfis voltamétricos obtidos durante o processo de redução que produz, em termos gerais, essencialmente o ânion radical nitro (Ar-NO<sup>•</sup><sub>2</sub>), nitroso (Ar-NO), hidroxilamina (Ar-NHOH) e amina (Ar-NH<sub>2</sub>). Contudo, os produtos eletrogerados dependem particularmente do meio reacional em que são gerados e, conseguentemente de sua reatividade e estabilidade. Assim, a transferência de elétrons, geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) e o estresse oxidativo (EO) têm sido reportados como o modo de ação de nitroaromáticos (SQUELLA et al., 2005; ABREU, DE et al., 2007; KOVACIC; SOMANATHAN, 2014).

Neste sentido, a determinação do potencial padrão ( $E_0$ ) fornece um dado importante para avaliar algumas propriedades termodinâmicas (energia de dissociação e pKa) de ânions ou cátions radicais orgânicos. Assim, a conversão destes para íons constitui um passo elementar para muitos mecanismos que iniciam com a etapa de transferência de elétrons, o que reforça a importância do  $E_0$  para fornecer informações fundamentais para compreensão de uma variedade de processos químicos e biológicos. Assim, o potencial de redução de um composto bioativo, o pK<sub>a</sub> do radical e a natureza cinética do mesmo podem influenciar a atividade e a seletividade deste fármaco (ÁLVAREZ-GRIERA et al., 2009).

Portanto, a química redox de nitrocompostos tem focado no entendimento de como a redução do grupo nitro desempenha um papel ativo na geração, estabilidade e reatividade de espécies radicalares e iônicas associadas aos mecanismos

biológicos. Entretanto, devido à complexidade da química biomédica, a correlação entre os parâmetros eletroquímicos e os dados de atividade biológica, muitas vezes, não ocorre de modo direto, pois vários fatores influenciam os aspectos mecanísticos *in vivo* de compostos bioativos, tais como: estereoquímica, difusão, solubilidade, biodisponibilidade, coeficiente de partição, permeabilidade da membrana, metabolismo e interações com enzimas específicas (ABREU, DE et al., 2002).

A atividade farmacológica de muitos compostos bioativos é decorrente da geração do estresse oxidativo após transferência de elétrons. Assim, quando o potencial de redução do grupo eletroativo é mais positivo que -0,5 V *versus* eletrodo normal de hidrogênio, o processo de cliclagem redox *in vivo* torna-se possível. Este pré-requisito, por sua vez, é responsável pela geração catalítica de espécies reativas de oxigênio (ERO) com consequentes efeitos benéficos e tóxicos. Assim, fármacos com potencial de redução mais positivo (maior eletroafinidade) são geralmente mais tóxicos e mutagênicos, bem como são mais rapidamente metabolizados (GÁL et al., 2010; KOVACIC, 2007; SOUZA et al., 2011).

O papel de destaque referente ao mecanismo de ação de nitroaromáticos tem sido atribuído, também, à alquilação bioredox (ALEGRIA et al., 2004; BOLLO et al., 2011; KOVACIC; SOMANATHAN, 2014). A ativação redutiva apresenta-se como caminho para fármacos que apresentam como alvo células com baixa concentração de oxigênio. Os compostos nitroaromáticos, por sua vez, são aplicados no tratamento de infecções anaeróbicas, no tratamento do câncer (células hipóxicas) e de doenças causadas por protozoários, como a doença de Chagas (BOLLO et al., 2005; SQUELLA et al., 2005).

De acordo com a Figura 18, é possível verificar que, em meio anaeróbio, a redução enzimática do grupo nitro gera como principais intermediários o ânion radical nitro (Ar-NO<sup>•</sup>) e a hidroxilamina (Ar-NHOH), que podem interagir com o DNA, resultando em efeitos farmacológicos. Entretanto, outros intermediários como o ânion radical protonado (Ar-NO<sup>•</sup>) e o derivado nitroso (Ar-NO) também apresentam atividade biológica, onde o primeiro atua induzindo danos ao DNA e o segundo como inativador enzimático, agindo como aceptor de grupos tióis de enzimas destoxificantes. Já em meio aeróbio, a redução enzimática do grupo nitro produz o ânion radical nitro (Ar-NO<sup>•</sup>) que interage com o oxigênio molecular (O<sup>2</sup>) presente no meio, formando o ânion radical superóxido (O<sup>•</sup>), em etapa denominada

de ciclo fútil. O ânion radical superóxido, por sua vez, sofre ação enzimática, como a superóxido dismutase (SOD), formando o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) que pode danificar membranas biológicas e reagir com enzimas ferrodoxinas, liberando espécies reativas, como o ânion hidroxila (<sup>-</sup>OH) e o radical hidroxila (<sup>•</sup>OH), tóxicas frente a células parasitárias e bacterianas (PAULA et al., 2009; BUSSY et al., 2014; KOVACIK, OSUNA, 2000)





Fonte: Adaptado de SQUELLA et al. 2005; PAULA et al. 2009; SOUZA et al. 2011; BUSSY et al. 2014.

O mecanismo de redução eletroquímico de nitroaromáticos tem sido amplamente estudado em meio prótico e aprótico, sendo possível avaliar a depedência do processo redox em função do pH, caracterizar o mecanismo eletródico e, consequentemente, a estabilidade dos intermediários eletrogerados, interações com tióis de importância biológica como a glutationa (GSH) e determinar constantes reacionais entre intermediário radicalar e oxigênio (SQUELLA et al., 2005; PAIVA et al., 2015).

A geração do ânion radical nitro e sua estabilidade podem ser expressas em uma primeira etapa eletroquímica, seguida por uma reação química acoplada, ou seja, por um mecanismo eletroquímico-químico. Neste sentido, técnicas eletroquímicas, como a voltametria cíclica, têm sido aplicadas para estudar o mecanismo redox de nitroaromáticos em diferentes meios e assim, contribuir para compreensão da atividade biológica destes (SOUZA et al., 2010).

Portanto, estudos voltamétricos serão conduzidos para os nitroaromáticos em estudo, visando correlacionar com os dados de atividade biológica já descritas na literatura, conforme descrito no ítem a seguir.

#### 2.3.2 Atividade biológica dos derivados nitrobenzílicos em estudo

Atualmente, os nitroaromáticos continuam a despertar interesse em química medicinal, visto que mudanças estruturais planejadas em compostos com bioatividade conhecida ou síntese de novos compostos tornam-se alternativas viáveis na busca de fármacos mais seletivos e/ou potentes (PATTERSON; WYLLIE, 2014; LOPES et al., 2011, 2015). Desta forma, estudos eletroquímicos de compostos bioativos podem contribuir para a compreensão de suas atividades biológicas (SOUZA et al., 2010).

Conforme descrito por Lopes e cols (2011), alguns dos derivados nitrobenzílicos em estudo foram avaliados, inicialmente, como agentes tripanossomicida e leishmanicida. De acordo com a Tabela 10, é possível verificar que nenhum composto apresentou atividade contra as formas amastigotas de Trypanosoma cruzi, entretanto, três compostos (EANBEN, EANB e AANB) exerceram significativa atividade leishmanicida in vitro contra as formas promastigotas de Leishmania (L.) amazonensis, com Cl<sub>50</sub> (concentração inibitória mínima capaz de provocar 50% de efeito máximo) na faixa de 23,1 a 59,5 µmol L<sup>-1</sup>. Estudos de citotoxicidade in vitro sobre a proliferação de células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) estimulada com fito-hemaglutinina também demonstraram que o composto AANB, o mais promissor agente leishmanicida (59,5 μmol L<sup>-1</sup>) da série, não afetou a proliferação de linfócitos em PBMC, indicando baixa toxicidade para as células humanas.

Recentemente, estudos envolvendo a atividade antitumoral de sete derivados nitrobenzílicos em estudo, frente a três linhagens de células humanas cancerosas: HL-60 (leucemia promielocítica humana), Jurkat (leucemia de células T humana) e MCF-7 (carcinoma mamário). A citotoxicidade de alguns compostos sobre linhagens de células VERO (céluas normais de rim de macaco) também foram avaliadas *in vitro* a fim de obter o índice de seletividade (LOPES et al., 2015).

De acordo os valores de Cl<sub>50</sub> expressos na Tabela 11, dos sete compostos estudados como agentes antitumorais, quatro (EANBEN, EANB, AANB e ANB) foram capazes de inibir o crescimento de três linhagens de células cancerosas humanas. Entre os compostos analisados, o AANB apresentou efeito antitumoral significativo *in vivo* em estudos envolvendo tumor sólido de Ehrlich em ratos, conforme descrito em Lopes et al. (2015).

Neste sentido, o presente trabalho também tem como objetivo avaliar o comportamento eletroquímico de derivados nitrobenzílicos sintéticos, diferentemente substituídos, a fim de correlacionar os parâmetros eletroquímicos obtidos através de técnicas voltamétricas com as atividades biológicas já descritas na literatura (Tabela 11) e, dessa forma, contribuir para o desenvolvimento de novos compostos bioativos.

Tabela 11 – Atividade antiparasitária e citotóxica (CI<sub>50</sub>  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>±DP) dos derivados nitrobenzílicos estudados.



Composto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Atividade tripanossomicida	Atividade leishmanicida	Proliferação PBMC*	HL-60	Jurkat	MCF-7	VERO
ENM	OCH <sub>3</sub>	Н				>100	>100	>100	>100
ENF	OCH <sub>3</sub>	F							
EANBEN	OCH <sub>3</sub>	Br	>100	39,3±5	44,1±13	20,2±3,9	17,7±3,5	39,6±11,4	17,4±4,9
ANBNA	O⁻Na⁺	Br							
EANB	NH(CH <sub>2</sub> )OH	Br	>100	23,1±0,5	53,9±13	15,2±3,5	60,4 <b>±</b> 27	31,4±10,4	29,1±0,5
AANB	NH(CH <sub>2</sub> )OH	Cl	>100	59,5±6	959,5±98	4,7±0,8	18,0±10	70,0±12,9	25,3 <b>±</b> 2,3
ATN	OH	Н				>100	>100	>100	>100
ANOH	ОН	ОН	>100	>100	ND	>100	>100	>100	>100
ANB	OH	Br	>100	>100	344,2±96	77,4±12,9	71,7±4,4	28,5±4,1	>100
ANF	ОН	F							
Benznidazol			3,8±0,8						
Anfotericina B				0,9±0,01					
Etoposídio						8,3 ±1,0	3,8 ±1,6	>100	>100

(-----): não realizado. \*PBMC = células mononucleares de sangue periférico.

Fonte: Adaptado de LOPES et al., 2011; 2015.

# **3 OBJETIVOS**

#### 3.1 Geral

Determinar o mecanismo eletródico envolvido na oxidação da bergenina e na redução dos derivados nitrobenzílicos, visando à correlação dos parâmetros eletroquímicos com as atividades biológicas já descritas na literatura, e avaliar possíveis interações supramoleculares da bergenina com β-CD e DNA, a fim de aumentar sua solubilidade em meio aquoso e auxiliar no entendimento do mecanismo molecular de ação biológica.

# 3.2 Específicos

- Investigar o comportamento eletroquímico da bergenina e de dez derivados nitrobenzílicos em meio aprótico e prótico, através das técnicas de voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial, voltametria de onda quadrada e coulometria;
- Verificar a influência da interação da α-CD, β-CD e HP-Y-CD sobre a solubilidade da bergenina em meio aquoso através do estudo de transferência de fase realizado por VC;
- ✓ Preparar o complexo bergenina:β-CD nas proporções 1:1 e 1:2 através da técnica de co-evaporação;
- ✓ Realizar a caracterização físico-química do complexo bergenina:β-CD por meio de técnicas espectroscópicas como Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-H<sup>1</sup>), além da Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC);
- Realizar estudos teóricos a fim de determinar parâmetros energéticos e mapas de densidade de spin da bergenina e do complexo bergenina:β-CD através do programa *Gaussian 09*;
- Avaliar a capacidade antioxidante da bergenina na forma livre e complexada com β-CD frente à peroxidação lipídica;
- Realizar ensaios de viabilidade celular frente a macrófagos (linhagem J774), a fim de verificar a citotoxidade da bergenina, β-CD e complexo bergenina:β-CD nas proporções 1:1 e 1:2;

- Investigar a interação da bergenina e complexo bergenina:β-CD com DNA através da utilização de sensor eletroquímico de dsDNA e com ssDNA e espectrofotometria UV-Vis, em solução.
- Avaliar o comportamento eletroquímico de dez derivados nitrobenzílicos em meio aprótico através da técnica de VC, a fim de propor o mecanismo de redução;
- Correlacionar os parâmetros eletroquímicos com os resultados dos ensaios biológicos.

# 4 EXPERIMENTAL

#### 4.1 Reagentes e Solventes

A bergenina foi isolada do extrato metanólico da casca de *Endopleura uchi*, planta originária da Amazônia Brasileira, e cedida pela Profa. Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e pelo Prof. Dr. Sérgio Massayoshi Nunomura do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. A elucidação estrutural da bergenina foi realizada através de análise dos espectros de RMN-H<sup>1</sup> e RMN-C<sup>13</sup>, como reportado por Nunomura e cols (2009).

Os nitrobenzílicos diferentemente substituídos (Tabela 12) foram sintetizados e devidademente caracterizados pelas técnicas de FT-IR, RMN-H<sup>1</sup> e RMN-C<sup>13</sup>, conforme descrito na literatura (LOPES et al., 2011; 2015), e cordialmente cedidos pela Profa. Dra. Renata Barbosa de Oliveira e pelo Prof. Dr. Ricardo José Alves da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

	SIGLA	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	NOMENCLATURA	MASSA MOLECULAR (g mol <sup>-1</sup> )
	ENM	OCH <sub>3</sub>	Н	Metil éster-3-nitro-4- metil-benzóico	195,17
0	ENF	OCH <sub>3</sub>	F	Metil éster-3-nitro-4- fluorometil-benzóico	213,16
K <sub>1</sub>	EANBEN	$OCH_3$	Br	Metil éster-3-nitro-4- bromometil-benzóico	274,07
	ANBNA	O⁻Na⁺	Br	Éster de sódio-3-nitro-4-	282,03
	EANB	NH(CH <sub>2</sub> )OH	Br	3-nitro- <i>N</i> -hidroximetil-4- bromometilbenzamida	289,08
	`NO₂AANB	NH(CH <sub>2</sub> )OH	CI	3-nitro- <i>N</i> -hidroximetil-4-	244,63
R <sub>2</sub>	ATN	ОН	Н	Ácido 3-nitro-4-	181,14
-	ANOH	ОН	OH	Ácido 3-nitro-4-	197,14
	ANB	ОН	Br	Ácido 3-nitro-4-	260,04
	ANF	ОН	F	Ácido 3-nitro-4- fluorometilbenzóico	199,14

Tabela 12 – Estrutura química dos derivados nitrobenzílicos em estudo.

Fonte: AUTOR, 2015.

A  $\alpha$ -ciclodextrina ( $\alpha$ -CD),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), hidroxipropil- $\gamma$ -ciclodextrina (HP-y-CD), ácido desoxirribonucléico de fita dupla (dsDNA) calf thymus (timo de vitelo) tipo I altamente polimerizado, tetrafluoroborato de tetrabutilamônio (TBABF<sub>4</sub>), hidróxido de tetrabutilamônio (TBAOH) em metanol (1 mol L<sup>-1</sup>), ferroceno, Tris-HCl, de soja), AAPH/ABAP fosfatidilcolina de soja (lecitina (2,2'-azobis(2metilpropionamida) di-hidrocloreto), brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5difeniltetrazólio e dimetilsulfóxido (DMSO) 99.8% foram adquiridos da Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha). A sonda fluorescente C<sub>11</sub>Bodipy<sup>581/591</sup>(4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-undecanóico ácido) foi adquirida da Molecular Probes (Ontario, Canadá).

Ferricianeto de potássio ( $K_3$ [Fe(CN)<sub>6</sub>]), ferrocianeto de potássio ( $K_4$ [Fe(CN)<sub>6</sub>].3H<sub>2</sub>O), acetato de sódio (NaOAc), hidróxido de sódio (NaOH), sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), hidrogenossulfato de potássio (KHSO<sub>4</sub>), brometo de potássio (KBr), cloreto de potássio (KCI), fosfato de sódio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e carbonato de sódio têm procedência da Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil). Ácido acético e ácido clorídrico foram adquiridos da Cromoline Química Fina (São Paulo, Brasil).

O solvente N,N-Dimetilformamida (DMF) foi adquirido da Acros Organics com 99,8%, extra seco AcroSeal® (New Jersey, Estados Unidos) e da Vetec Química Fina Ltda com 99,7% (Rio de Janeiro, Brasil).

Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas em água ultrapura a partir de um sistema de purificação Milli-Q da Millipore Inc. Para a medição do pH das soluções tamponadas utilizou-se o pHmetro da Quimis.

# 4.2 Estudos Eletroquímicos

As análises eletroquímicas foram realizadas em um sistema de três eletrodos (eletrodos de trabalho, auxiliar e referência). Utilizou-se como eletrodo de trabalho, o carbono vítreo (BAS, diâmetro 3 mm), como eletrodo de referência Ag|AgCl|Cl<sup>-</sup> (0,1 mol L<sup>-1</sup>) em um tubo com capilar de Luggin e vycor em sua extremidade, e como eletrodo auxiliar, um fio de platina. Esse sistema de cela foi utilizado ao aplicar as técnicas de voltametria cíclica (VC), voltametria de pulso diferencial (VPD) e voltametria de onda quadrada (VOQ).
Para as eletrólises em potencial controlado (coulometria) da bergenina utilizou-se como eletrodo de trabalho feltro de carbono com dimensões de 2,0 cm x 2,5 cm x 0,5 cm e como eletrodo de referência Ag/AgCl, Cl<sup>-</sup> (0,1 mol L<sup>-1</sup>). O eletrodo auxiliar constituiu de um espiral de platina isolado em um tubo de vidro contendo eletrólito suporte e fechado em sua extremidade inferior por um disco de vidro poroso. Durante todo o experimento o ânodo e o cátodo foram mantidos separados.

O fundamento e a finalidade das técnicas eletroquímicas utilizadas encontram-se sumarizadas na Tabela 13. Todos os experimentos eletroquímicos foram executados em um potenciostato/galvanostato PGSTAT302 (AUT 73222) da Autolab ® interfaceado a um microcomputador. Os dados obtidos em cada análise foram tratados no programa OriginPro 8.0.

Tabela 13 – Fundamentos e finalidad	e das técnicas eletr	oquímicas utilizadas.
-------------------------------------	----------------------	-----------------------

TÉCNICA	FUNDAMENTO	FINALIDADE	REFERÊNCIA
VC	É uma técnica de varredura de potencial, onde o potencial aplicado ao eletrodo é variado em velocidade conhecida, e ao atingir o potencial final desejado, a varredura é revertida na mesma velocidade.	Obter informações qualitativas sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsortivos.	Brett; Oliveira-Brett, 2009
VPD	Pulsos de amplitude fixos sobrepostos a uma rampa de potencial crescente são aplicados ao eletrodo de trabalho. A corrente é medida duas vezes, antes da aplicação do pulso e ao final do pulso, sendo a diferença entre elas plotada <i>versus</i> o potencial aplicado. A área do pico é proporcional à concentração do analito.	Por apresentar baixos limites de detecção, na ordem de 10 <sup>-8</sup> mol L <sup>-1</sup> , é destinada para fins analíticos.	Pacheco et al., 2013
VOQ	Basea-se na variação de potencial na forma de onda, associada a uma rampa de potencial em forma de escada, gerando um pico simétrico. Uma das principais vantagens é a compensação da corrente capacitiva residual.	Verificar a reversibilidade do sistema, bem como ser útil em determinações analíticas, já que é uma técnica rápida e sensível.	Skoog et al., 2009
Eletrólise em potencial controlado	O potencial do eletrodo de trabalho é mantido constante de forma que apenas o analito seja responsável pela condução de carga na interface eletrodo/solução. Assim, a carga requerida para converter o analito ao seu produto de reação é determinada a partir da curva corrente <i>versus</i> tempo.	Contribuir para elucidação do mecanismo redox a partir da identificação do produto eletrogerado.	Lund; Hammerich, 2001

### 4.2.1 Limpeza Padrão do Eletrodo de Carbono Vítreo

A limpeza do eletrodo de carbono vítreo foi realizada utilizando uma base de polimento com alumina (0,3 µm) e, posteriormente, lavado com água deionizada e imerso em acetona, sendo levado ao ultrassom por 30 s para a remoção de partículas residuais.

Para a verificação da área eletroativa do eletrodo, foram realizados testes em solução de  $(K_3[Fe(CN)_6]/(K_4[Fe(CN)_6].3H_2O) 1 \text{ mmol } L^{-1} \text{ em KCI } 0,1 \text{ mol } L^{-1}, \text{ através}$  de voltametria cíclica, na faixa de potencial de 0,3 V a -0,6 V *v*s eletrodo de referência Ag/AgCI, CI<sup>-</sup> (0,1 mol L<sup>-1</sup>) com uma velocidade de varredura de 0,1 V s<sup>-1</sup>.

### 4.2.2 Meio Aprótico

Para os estudos em meio aprótico utilizou-se o solvente orgânico N,Ndimetilformamida (DMF), pois apresenta uma larga janela de potencial de trabalho. O DMF é susceptível à reação de hidrólise com geração de dimetilamina e ácido fórmico e, portanto, ao utilizar o DMF adquirido da Vetec foi submetido à destilação sob pressão reduzida após tratamento com CuSO<sub>4</sub> anidro (para remoção de aminas). O DMF adquirido da Acros Organics é extra seco e, portanto, não necessitou ser destilado.

Como eletrólito suporte utilizou-se o tetrafluoborato de tetrabutilamônio (TBABF<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>), devidamente purificado. Para sua purificação procedeu-se da seguinte forma: 60 g de TBABF<sub>4</sub> foram solubilizadas em etanol puro absoluto a quente (60 °C) e, em seguida a solução foi resfriada a temperatura média de 18 °C até completa cristalização. Posteriormente, o produto foi filtrado à vácuo e, uma segunda cristalização, em etanol, foi realizada a fim de eliminar possíveis impurezas. Por fim, o TBABF<sub>4</sub> recristalizado foi seco sob pressão reduzida a 40°C.

A análise da qualidade do solvente (DMF) foi realizada na presença do eletrólito suporte (TBABF<sub>4</sub>) por voltametria cíclica, a fim de verificar o domínio elétroquímico possível de ser aplicado a cada ensaio, como descrito a seguir: Para os ensaios em meio aprótico, a massa equivalente a 0,1 mol L<sup>-1</sup> do eletrólito suporte (TBABF<sub>4</sub>) foi solubilizada em DMF e desaerada com Argônio (Ar) durante 5 minutos. Transcorrido este tempo, realizou-se o registro do branco por voltametria cíclica a 100 mV s<sup>-1</sup>. Posteriormente, a massa correspondente a 1 mmol L<sup>-1</sup> do composto em

análise foi dissolvida na solução contendo o eletrólito suporte, desaerada e submetida à análise voltamétrica. A bergenina e todos os derivados nitrobenzílicos foram submetidos à análise voltamétrica em meio aprótico, sendo as massas determinadas com precisão de centésimo de mg, em balança analítica, momentos antes de cada execução experimental.

### 4.2.3 Meio Prótico

Para os estudos eletroquímicos em meio prótico, soluções estoques da bergenina (5 mmol L<sup>-1</sup>) e de alguns derivados nitrobenzílicos (1 mmol L<sup>-1</sup>) foram preparadas por dissolução do pó em etanol. Para análise do comportamento voltamétrico dos compostos em meio prótico utilizou-se o meio aquoso-etanólico (10% v/v) a fim de garantir completa solubilidade, já que apresentam baixa solubilidade em meio aquoso. O perfil voltamétrico da bergenina (2,0 mmol L<sup>-1</sup>) foi verificado em tampão acetato pH 4,5, tampão fosfato pH 7,0 e tampão carbonato pH 10,0, todos com força iônica de 0,2 (CHRISTIAN; PURDY, 1962). Já os estudos em meio prótico realizados para alguns nitrobenzílicos (0,1 mmol L<sup>-1</sup>) foram realizados apenas em tampão fosfato, pH 7,0. As soluções foram desaeradas com Argônio durante 5 minutos e, em todos os casos, iniciou-se com o registro do perfil voltamétrico do eletrólito suporte, seguido das análises das soluções de trabalho.

### 4.2.3.1 Eletrólise da Bergenina em Potencial Controlado

Com o objetivo de determinar o número de elétrons envolvidos na oxidação da bergenina em meio prótico e obter o produto eletrogerado, eletrólises em potencial controlado também foram realizadas em solução etanólica tamponada (10% v/v), tampão acetato, pH 4,5. Para este procedimento, iniciou-se a préeletrólise dessa solução em  $E_{ap} = +0.95$  V, até a corrente atingir aproximadamente 1% do valor inicial para garantir a remoção de impurezas. Em seguida, a bergenina (0,025 g - 1,9 mmol L<sup>-1</sup>) foi dissolvida em um volume de etanol previamente reservado e adicionado à solução pré-eletrolisada, procedendo-se, assim, à eletrólise em  $E_{ap} = +0.90$  V até a corrente atingir valores residuais, sendo todo o processo acompanhado por VC e espectroscopia no UV-Vis.

Ao ser atingida a corrente residual, anotou-se a carga final, e a carga residual (Q<sub>res</sub>) foi calculada, multiplicando o tempo de eletrólise (t) pela corrente residual (I<sub>res</sub>), como mostra a equação a seguir:

$$Q_{res} = I_{res} \times t$$

A carga residual calculada foi subtraída da carga total, obtendo-se então a carga líquida referente à oxidação da bergenina. A partir dessa carga líquida foi calculado o número de elétrons a partir da equação abaixo:

$$n = \frac{Q_{liq} \times MM}{m \times F}$$

onde *n* é o número de elétrons,  $Q_{liq}$  é a carga líquida em Coulombs (C), MM é a massa molecular (g mol<sup>-1</sup>) da bergenina, m é a sua massa (g) e F é a constante de Faraday (96485 C mol<sup>-1</sup>).

Após o término da eletrólise, retirou-se o compartimento anódico para assim evitar possíveis contaminações do produto e tentou-se realizar sua extração em funil de separação, porém não se obteve sucesso. Neste momento, várias tentativas de extração foram realizadas utilizando solventes com diferentes graus de polaridade, mas não se obteve êxito. Portanto, a eletrólise foi útil para determinar o número de elétrons envolvidos na oxidação da bergenina em meio prótico (pH 4,5), o que contribuiu para propor o mecanismo oxidativo da mesma.

# 4.3 Estudos de Interação da Bergenina com Ciclodextrinas

### 4.3.1 Estudo de Transferência de Fase por Voltametria Cíclica

Para avaliação qualitativa da interação da bergenina com  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e HP- $\gamma$ -CD, realizou-se o estudo de transferência de fase, onde a amostra na fase sólida é submetida à agitação até que se incorpore à solução, na fase líquida. Para esse estudo, inicialmente, foi adicionada a massa correspondente à concentração de 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de bergenina em tampão acetato pH 4,5, e com o auxílio de uma barra

magnética, promoveu-se a agitação contínua durante 15 minutos, sendo o comportamento registrado, via voltametria cíclica (+0,2 a +1,5 V) a 50 mV s<sup>-1</sup>.

Logo após esse procedimento, foram adicionadas as massas de  $\alpha$ -CD correspondentes às concentrações de 0,05, 0,5 e 5 mmol L<sup>-1</sup>, sendo a solução agitada e desaerada, a cada adição de  $\alpha$ -CD, por 15 minutos, para então ser realizada a medida eletroquímica. Este processo também foi realizado para  $\beta$ -CD e HP- $\gamma$ -CD.

As possíveis interações esperadas entre bergenina e ciclodextrinas foram avaliadas a partir da comparação dos parâmetros eletroquímicos *E*pa e *I*pa (potencial e corrente de pico) da bergenina na ausência e na presença das ciclodextrinas, obtidos em cada análise. Entretanto, realizou-se a limpeza da superfície do eletrodo de CV após cada varredura, como descrito no item 4.2.1, a fim de manter a mesma área eletroativa, já que compostos fenólicos, geralmete, promovem a passivação da superfície do eletrodo após oxidação.

## 4.3.2 Preparo do Complexo Bergenina:β-CD por Co-evaporação

A bergenina e a β-CD nas razões equimolares 1:1 e 1:2 foram adicionadas em erlenmeyers protegidos da luz contendo 25 mL de água, sendo deixados sob agitação mecânica a 170 rpm a 25 °C por 24 h no shaker Marconi MA-420 Incubator (São Paulo, Brasil). Após a agitação, a solução foi filtrada (Minisart<sup>®</sup> 0,20 µm) e obtido por rota-evaporação sob pressão reduzida, em um Rotavapor Büchi (Büchi, Germany), e seco a vácuo.

# 4.3.3 Caracterização Físico-química do Complexo Bergenina:β-CD

A avaliação da formação do complexo hóspede-hospedeiro não é trivial e requer a combinação de diferentes técnicas analíticas como: espectroscopia UV-Vis, espectroscopia no infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Ressonância do Spin do Elétron (ESR), técnicas voltamétricas e potenciométricas, cromatografia líquída de alta eficiência (CLAE) e outras. De uma forma geral, as técnicas utilizadas para caracterização dos complexos formados com ciclodextrinas são, geralmente, baseadas na detecção da variação de uma propriedade física ou

química adequada da molécula hóspede como consequência da formação do complexo de inclusão (MURA, 2014).

Para caracterização físico-química do complexo bergenina:β-CD, nas proporções 1:1 e 1:2, obtido por co-evaporação, foram utilizados as seguintes técnicas: espectroscopia no infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-H<sup>1</sup>) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).

✓ Os espectros no infravermelho da bergenina,  $\beta$ -CD e complexos bergenina: $\beta$ -CD 1:1 e 1:2 foram registrados à temperatura ambiente, na região espectral entre 4000 e 500 cm<sup>-1</sup> no IR Prestige-21, Fourier Transform Spectrometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). As amostras foram preparadas como pequenas pastilhas através da mistura de cada uma delas com KBr (1:100) em um almofariz de ágata. Estas foram pressionadas à vácuo, sendo o disco de KBr usado como suporte.

✓ Para a análise de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-H<sup>1</sup>) da bergenina, β-CD e complexos bergenina:β-CD 1:1 e 1:2, obtidos por co-evaporação, prepararam-se soluções em D<sub>2</sub>O. Os espectros foram registrados em espectrômetro Bruker Avance 400, operando à frequência de 400 MHz, em temperatura ambiente.

✓ As análises de DSC foram realizadas para a bergenina, a  $\beta$ -CD e para os complexos bergenina: $\beta$ -CD 1:1 e 1:2 em um calorímetro DSC-60 (variação de 25 – 500 °C) (Shimadzu, Kyoto, Japan). A escala de temperatura foi calibrada utilizando pó de α-alumina. As amostras (~ 8,0 mg) foram colocadas em recipientes de alumínio padronizados e as medições foram realizadas a uma taxa de aquecimento de 5 °C min <sup>-1</sup>, de 25 a 400 °C, numa atmosfera dinâmica de nitrogênio (taxa de fluxo ¼ 20 mL/min).

# 4.4 Estudos Teóricos para Bergenina e para o Complexo Bergenina:β-CD

Estudos teóricos, através de simulações computacionais, têm sido utilizados como ferramenta para determinar as energias de ligação e estruturas de equilíbrio de moléculas hóspedes em ciclodextrinas. Geralmente, tais estudos encontram-se associados com técnicas experimentais, especialmente a espectrometria de RMN (HOLT, 2010).

O estudo teórico foi desenvolvido empregando-se o método semiempírico PM6 (STEWART, 2007), determinação de parâmetros energéticos relativos e determinação de mapas de densidade de spin. Para o cálculo da coordenada intrínseca de reação foi usado o método semiempírico AM1 (DEWAR; THIEL, 1977). As espécies moleculares foram tratadas como neutras e com multiplicidade de spin simpleto (espécies não radicalares) ou dupleto (quando a análise envolvia diretamente uma espécie radicalar). Todo estudo teórico foi desenvolvido usando o pacote *Gaussian 09* (FRISCH et al., 2009).

Os estudos teóricos foram realizados em colaboração com o Dr. Davi Alexsandro Cardoso Ferreira e pela doutoranda Sara Figueirêdo de Alcântara Morais da Universidade de Brasília – DF.

# 4.5 Monitoramento da Inibição da Lipoperoxidação pela Bergenina e Complexo Bergenina:β-CD

O monitoramento da inibição da lipoperoxidação por métodos fluorimétricos baseia-se na perda do sinal de fluorescência emitida por uma sonda ancorada a um lipossomo, como resultado da sua interação com espécies reativas, bem como na retenção do sinal na presença de antioxidantes (Figura 19) (NAGUIB, 1998).





Fonte: FERREIRA, 2013.

As vesículas unilamelares de fosfatidilcolina de soja (1 mmol L<sup>-1</sup>) foram preparadas por extrusão (100 nm de diâmetro do poro da membrana, a 25 °C) em 10 mL de tampão fosfato (50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,4) com a incorporação adicional de 0,1 mmol L<sup>-1</sup> de sonda fluorescente C11 BODIPY <sup>581/591</sup> como descrito por Oliveira e cols (2009).

As mensurações de fluorescência foram realizadas a 37 °C, usando um espectrofluorímetro RF-5301 PC (Shimadzu, Japão). Em uma cubeta de quartzo com capacidade para 1 mL, foram misturadas sob agitação com barra magnética, as alíquotas da suspensão da vesícula unilamelar, do tampão fosfato, e da amostra (100  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> bergenina ou complexos bergenina: $\beta$ -CD 1:1 e 1:2) ou Trolox como controle positivo. Solução aquosa de  $\beta$ -CD e solução tampão foram utilizadas como controle negativo. A reação foi iniciada com a adição de 100  $\mu$ L de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) di-hidrocloreto (AAPH, 100  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>) que sofre termólise a 37 °C. O decaimento da fluorescência ( $\lambda$ excitação = 580 nm,  $\lambda$ emissão = 600 nm) foi monitorado continuamente durante 30 min e os ensaios realizados em triplicata.

### 4.6 Ensaio de Viabilidade Celular

O efeito citotóxico da bergenina, β-CD e complexos bergenina:β-CD nas proporções 1:1 e 1:2 foi investigado frente a linhagem de macrófagos (J774) através do ensaio do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), conforme descrito por Mosmann (1983). Este estudo foi realizado em colaboração com o Prof. Emiliano de Oliveira Barreto e a doutoranda Jamille Nunes de Souza Ferro do Laboratório de Biologia Celular da Universidade Federal de Alagoas.

O ensaio consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal MTT para formazana (Figura 20), pela atividade da enzima succinil desidrogenase presente na mitocôndria de células viáveis. Desta maneira, a quantidade de formazana é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

Para o estudo, macrófagos foram, inicialmente, distribuídos em placas de 96 poços (1,5 x  $10^5$  células/poço) e incubados *overnight* a 37 °C. Em seguida, as células aderentes foram tratadas com bergenina,  $\beta$ -CD e complexos bergenina: $\beta$ -CD nas proporções 1:1 e 1:2 em diferentes concentrações (1, 10, 25, 50 ou 100 µg mL<sup>-1</sup> ou em meio de cultura (RPMI-1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal), e

foram posteriormente cultivados durante 24 h a 37 °C. Em seguida, o meio foi substituído por novo meio RPMI contendo 5 mg mL<sup>-1</sup> de MTT. Após 4 h de incubação a 37 °C, o sobrenadante foi removido e 150  $\mu$ L de dimetilsufóxido foi adicionada em cada poço. Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente, a absorvência do produto formazana foi medida espectrofotometricamente a 540 nm em Thermoplate TP-reader. Quatro cavidades individuais foram avaliadas por tratamento e a atividade de redução do MTT foi determinada como percentagem de células controle ([absorvência de células tratadas/absorvência de células não tratadas] × 100).

Figura 20 – Conversão do MTT para formazana pela succinil desidrogenase.



Fonte: Adaptado de Mosmann, 1983.

# 4.7 Interação com DNA

### 4.7.1 Estudos de Interação com ssDNA via Eletroquímica

Para o preparo da solução de ssDNA, foram pesados 3 mg de dsDNA que foram desnaturados pela adição de 1 mL de ácido clorídrico (1 mol L<sup>-1</sup>) e aquecimento durante 1 h a 100 °C até solubilização. Em seguida, adicionou-se 1 mL de solução de NaOH (1 mol L<sup>-1</sup>), para neutralização do meio, completando-se o volume para 10 mL com tampão acetato, pH 4,5.

Para avaliação da interação das substâncias com ssDNA, inicialmente realizou-se uma varredura anódica de potencial (+0,2 a +1,5 V) em VPD com amplitude de 0,05 V e velocidade de 5 mV s<sup>-1</sup> da solução de ssDNA para conhecer o

perfil voltamétrico da solução de ssDNA, onde verificou-se a presença de dois picos de alta intensidade de corrente referentes à oxidação de resíduos das bases guanina e adenina. Devido à forte adsorção na superfície do eletrodo de carbono vítreo após a oxidação das bases púricas, foi necessário realizar o polimento adequado do eletrodo após cada verredura.

A influência de diferentes concentrações do analito (10, 50 e 100  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>) na solução de ssDNA foi observada a partir de possíveis alterações nas correntes de pico e nos potenciais de oxidação das bases guanina e adenina. Para isso, soluções estoque de bergenina,  $\beta$ -CD e complexo bergenina: $\beta$ -CD nas proporções 1:1 e 1:2 foram preparadas a partir da dissolução da massa do analito equivalente a 1 mmol L<sup>-1</sup>, em etanol. Em seguida, as soluções trabalho foram preparadas a partir de alíquotas da solução estoque, resultando em uma solução com 10% v/v de etanol, na cela eletroquímica.

### 4.7.2 Estudos em biossensor de dsDNA

Os estudos em biossensor de dsDNA requerem quatro etapas: preparo do gel de dsDNA, condicionamento e modificação do eletrodo e, por fim, análise da interação do analito com o dsDNA. Para o preparo do gel de dsDNA pesou-se 12 mg de DNA em eppendorf e, em seguida, adicionou-se 1 mL de tampão acetato (pH 4,5). Para completa formação do gel, este foi submetido à refrigeração por 24 h, já que o uso do ultrassom pode comprometer a integridade da fita dupla do DNA.

Para a etapa de condicionamento, a superfície do eletrodo de carbono vítreo foi previamente limpa, conforme descrito no item 4.2.1. Após a limpeza, o eletrodo foi submetido ao condicionamento através da técnica de VPD a partir de 5 ciclos, varrendo-se na faixa de 0 a +1,5 V a 5 mV s<sup>-1</sup> com amplitude de 0,05 V, em tampão acetato pH 4,5, conforme recomendação da literatura (OLIVEIRA-BRETT et al., 2002). Os ciclos sucessivos foram necessários para obter organização da dupla camada elétrica e, consequente estabilização da superfície eletródica. Dessa forma, essa superfície encontra-se polarizada positivamente, favorecendo a ocorrência de interações eletrostáticas com os grupamentos fosfato do DNA.

Após condicionamento, 10 μL do gel de dsDNA foram adicionados na superfície do eletrodo de carbono vítreo que, posteriormente, foi seco em atmosfera de gás inerte (Argônio). Em seguida, realizou-se uma varredura numa solução etanólica tamponada 10% (v/v) a fim de se obter o branco. Para análise da interação das substâncias com o dsDNA, preparou-se uma solução de trabalho a 100  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>, obtida a partir de simples diluição de solução estoque (1 mmol L<sup>-1</sup>) etanólica, mantendo em cela 10% (v/v). O biossensor de DNA foi mantido em contato com a solução trabalho durante 15 minutos e, em seguida a eletrooxidação foi realizada em varredura única, seguindo as condições descritas para a análise do branco.

Quando o dsDNA imobilizado na superfície do eletrodo entra em contato com substâncias que podem alterar sua conformação, é possível verificar a exposição das bases púricas, a partir de alterações no perfil voltamétrico, com aumento ou surgimento de picos. Quando a interação com o dsDNA é inexistente, não há evidência dos picos de oxidação das bases, o que indica conservação da conformação original do DNA.

# 4.7.3 Estudo da Interação da Bergenina e do Complexo Bergenina:β-CD com DNA por Espectroscopia UV-Vis

As soluções-estoque (1 mmol  $L^{-1}$ ) da bergenina,  $\beta$ -CD e complexo bergenina: $\beta$ -CD nas proporções 1:1 e 1:2 foram preparadas por dissolução do pó em etanol. A partir desta solução, uma série de diluições foi realizada a fim de se obter concentrações variáveis do ligante (0,8 – 6,4 µmol  $L^{-1}$ ).

A solução estoque de dsDNA de timo de vitelo foi preparada pela dissolução de 12 mg de dsDNA em 1 mL de tampão acetato (pH 4,5, 0,2 mol L<sup>-1</sup>) e mantida sob refrigeração a 8 °C por 24 h. Uma alíquota de 40 µL foi, então, dissolvida em 10 mL de solução tampão Tris-HCI (pH 7,4, 0,1 mol L<sup>-1</sup>) e mantida sob refrigeração a 8 °C por 24 h, sendo agitada em intervalos frequentes para garantir a homogeneidade da solução.

A pureza do dsDNA foi verificada pelo monitoramento entre a razão da absorvência obtida a 260 nm e 280 nm. A solução estoque de dsDNA originou uma razão entre  $(A_{260})/(A_{280})$  de 1,82, indicando que o DNA se encontrava suficientemente livre de impurezas de origem protéica (SHAH et al., 2010; AGARWAL et al., 2013).

A concentração final de dsDNA na solução foi determinada por medidas da absorção no UV a 260 nm, usando um coeficiente de extinção molar de  $\varepsilon_{260}$ = 6600 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> por nucleotídeo, através da aplicação da lei de Lambert-Beer

 $(A_o = \epsilon_{260} I Dt, onde A_o é a absorvência da solução de DNA, I é o caminho óptico e Dt, a concentração de DNA) (OLIVEIRA et al., 2014). A concentração obtida de DNA em solução foi de 85 µmol L<sup>-1</sup> para os estudos de interação com a bergenina, e de 98 µmol L<sup>-1</sup> para os estudos de interação com a <math>\beta$ -CD e o complexo bergenina: $\beta$ -CD nas proporções 1:1 e 1:2.

# 4.7.3.1 Medidas de Absorção no UV-Vis

Todas as medidas foram realizadas em pH 7,4, utilizando tampão Tris-HCI. Os espectros de absorção no UV-Vis do DNA e das misturas de soluções de DNA com bergenina, β-CD e complexo bergenina:β-CD nas proporções 1:1 e 1:2 foram mensurados em temperatura ambiente (25 °C) no espectrofotômetro Agilent/Hewlett Packard HP 8453 (Waldbornn, Alemanha) usando uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm no intervalo de 190 a 440 nm.

A interação da bergenina na forma livre e complexada com  $\beta$ -CD nas proporções 1:1 e 1:2 com dsDNA foi monitorada pelo método de titulação por absorção no espectro UV-Vis (AGARWAL et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014) em que a concentração de DNA foi mantida fixa (85 ou 98 µmol L<sup>-1</sup>, a depender do analito) e tratada com diferentes concentrações do ligante (0,8 – 6,4 µmol L<sup>-1</sup>) em tampão Tris-HCI (pH 7,4, 0,1 mol L<sup>-1</sup>, 10% v/v de etanol).

### 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para facilitar a compreensão dos resultados obtidos nos experimentos envolvendo a bergenina e os derivados nitrobenzílicos em estudo, esta seção será dividida em duas partes: parte I e parte II. Na parte I, serão abordados os resultados e discussão relacionados à bergenina, enquanto na parte II serão abordados aqueles referentes aos derivados nitrobenzílicos.

# 5.1 Parte I

Nesta seção, serão abordados os resultados dos estudos eletroquímicos realizados em meio aprótico e prótico para bergenina. Em seguida, serão relatados os resultados envolvendo interação com ciclodextrinas por voltametria cíclica (estudo de transferência de fase), bem como o preparo e a caracterização do complexo bergenina: $\beta$ -CD nas proporções 1:1 e 1:2. Estudos teóricos, ensaios de lipoperoxidação, interação com DNA (via eletroquímica e espectrofotometria UV-Vis) e ensaios de viabilidade celular (ensaio do MTT) também serão descritos para bergenina na forma livre e complexada com  $\beta$ -CD, visando verificar a influência desta interação.

### 5.1.1 Estudos Eletroquímicos

### 5.1.1.1 Meio Aprótico

O estudo voltamétrico da bergenina em meio aprótico (DMF/TBABF<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>) apresentou uma única onda anódica em torno de  $Ep_a$  +1,30 V, de natureza irreversível (Figura 21a), provavelmente relacionada à oxidação de hidroxilas fenólicas presente em sua estrutura. O deslocamento do potencial de pico anódico para valores mais positivos em função da velocidade de varredura (Figura 21b e Tabela 14) e a ausência de onda catódica correspondente corroboram a natureza irreversível do sistema. Os gráficos de  $Ip_a$  versus v e  $Ip_a$  versus v<sup>1/2</sup> comprovam que o transporte de massa até a superfície do eletrodo é caracterizado por um processo difusional (Figura 21c e 21d), ou seja, a movimentação da espécie química ocorre de modo espontâneo devido ao gradiente de concentração. Na

Figura 21e também é possível verificar que o potencial de pico anódico ( $E_{pa}$ ) apresenta pequena variação em função do log v.

Figura 21 – (a) VC da bergenina a 0,1 V s<sup>-1</sup>; (b) VC da bergenina em função da velocidade de varredura; (c) gráfico de *l*pa vs. v; (d) gráfico de *l*pa vs. v<sup>1/2</sup>; (e) gráfico de *E*pa vs. log v. [Bergenina] = 1,0 mmol L<sup>-1</sup> em DMF/TBABF4 (0,1 mol L<sup>-1</sup>); eletrodo de CV.



Fonte: AUTORA, 2015.

v (V s⁻¹)	<i>E</i> (V)	<i>Ι</i> pa (μΑ)	<b>v</b> <sup>1/2</sup>	log v
0,050	1,297	28,213	0,224	-1,301
0,075	1,318	33,453	0,274	-1,125
0,100	1,323	38,656	0,316	-1,000
0,200	1,349	53,131	0,447	-0,699
0,300	1,371	63,964	0,548	-0,522
0,400	1,385	73,242	0,632	-0,398
0,500	1,393	81,176	0,707	-0,301
0,750	1,420	97,412	0,866	-0,125
1,000	1,433	111,297	1,000	0,000

Tabela 14 – Parâmetros eletroquímicos obtidos a partir da VC da bergenina em meio aprótico. Estudo em função da velocidade de varredura. *E*pa *vs.Ag/AgCI/Cl* (sat.).

Fonte: AUTORA, 2015.

As análises voltamétricas da bergenina em meio aprótico, através das técnicas de VPD e VOQ corroboraram os dados de VC, visto que apenas uma onda anódica foi observada nos voltamogramas de pulso diferencial e onda quadrada, e a ausência de pico reverso em VOQ confirma a irreversibilidade do sistema (Figura 22).

Figura 22 – (a) VPD e (b) VOQ da bergenina em meio aprótico. [Bergenina] = 1,0 mmol L<sup>-1</sup> em DMF/TBABF<sub>4</sub> (0,1 mol L<sup>-1</sup>); eletrodo de CV.



Fonte: AUTORA, 2015.

De acordo com a equação a seguir, foi possível estimar o número de elétrons (*n*) envolvidos na oxidação da bergenina em meio aprótico, utilizando a largura de pico a meia altura ( $W_{1/2} = 0,111$ ) obtido por VPD, como descrito em Wang (2006), onde R é a constante dos gases (R = 8,314 J mol<sup>-1</sup>K<sup>-1</sup>), T é a temperatura em Kelvin (298 K) e F é a constante de Faraday (F = 96485 Cmol<sup>-1</sup>).

Assim, o número de elétrons (*n*) obtido para oxidação da bergenina em meio aprótico foi próximo a um (0,814). Portanto, com base nessa informação é possível sugerir que o mecanismo oxidativo da bergenina em meio aprótico envolve a perda de um elétron e um próton na posição 5 (menor pKa) com posterior deslocalização eletrônica no anel fenólico e geração do cátion radical em posição 4, favorecendo a reação de dimerização do tipo C-C (Figura 23), ou seja, trata-se de um mecanismo eletroquímico-químico (EC).

Wang e cols (2005) descreveram sobre a elucidação estrutural do derivado dimérico da bergenina obtido a partir da decomposição orgânica da cultura de micélio do fungo *Pleurotus ostreatus*, sendo o processo de biotransformação justificado pela reação do tipo desidro-oxidação catalisada por oxidase com formação do bifenil. Assim, o mecanismo oxidativo proposto para bergenina em meio aprótico pode ser subsidiado por esta informação, entretanto, não é suficiente para confirmar o produto eletrogerado sugerido, sendo necessário o isolamento e caracterização estrutural do produto da eletrólise em meio aprótico.





Fonte: AUTORA, 2015.

### 5.1.1.2 Meio Prótico

O comportamento voltamétrico da bergenina em meio prótico foi avaliado em solução etanólica (10% v/v) tamponada em diferentes valores de pH (acetato pH 4,5, fosfato pH 7,0 e carbonato pH 10,0) com força iônica de 0,2 mol  $L^{-1}$  com o objetivo de verificar a influência do pH no processo redox da bergenina.

De acordo com a Figura 24, foi possível constatar que o processo oxidativo da bergenina sofre influência do pH, visto que o perfil voltamétrico obtido em pH 4,5 apresentou uma onda anódica bem definida em  $Ep_a = +0,71$  V, diferentemente do observado em pH 7,0 e 10,0 que apresentaram duas ondas anódicas de baixa intensidade de corrente em potenciais menos positivos. No entanto, independente do pH do meio, a natureza do processo manteve-se irreversível, visto que não se

obteve sua respectiva onda catódica, bem como a diminuição da intensidade da corrente de pico (*I*p<sub>a</sub>) observada com a segunda varredura, sendo esta indicativo da presença de um processo adsortivo na superfície do eletrodo de carbono vítreo, característico de compostos fenólicos.

Figura 24 – Voltamogramas cíclicos da bergenina em diferentes soluções etanólicas (10% v/v) tamponadas. (a) Tampão acetato, pH 4,5; (b) Tampão fosfato, pH 7,0; Tampão carbonato, pH 10,0. [Bergenina] = 2,0 mmol L<sup>-1</sup>; eletrodo de CV; v = 0,05 V s<sup>-1</sup>.



Fonte: AUTORA, 2015.

Após verificar a influência do pH sobre o perfil voltamétrico da bergenina em meio prótico, a solução de tampão acetato (pH 4,5) foi escolhida para prosseguir com os estudos de velocidade de varredura e transferência de fase na presença de ciclodextrinas, visto que a onda anódica obtida durante a oxidação da bergenina apresentou-se bem definida (Figura 25a), o que favorece a análise dos dados dos ensaios relatados.

Figura 25 – (a) e (b) Voltamogramas cíclicos da bergenina em função da velocidade de varredura; ((c) gráfico de *l*pa *vs.* v; (d) gráfico de *l*pa *vs.* v<sup>1/2</sup>; (e) gráfico de *E*pa *vs.* log v. [Bergenina] = 2,0 mmolL<sup>-1</sup> em solução etanólica (10%) tamponada, pH 4,5; eletrodo de CV.



Fonte: AUTORA, 2015.

No estudo da velocidade de varredura da bergenina em solução etanólica tamponada (pH 4,5) (Figura 25, Tabela 15) foi possível verificar a presença de apenas uma onda anódica bem definida, de natureza irreversível, conforme descrito para análise voltamétrica na velocidade de 0,05 V s<sup>-1</sup> (Figura 25a). O deslocamento

de  $Ep_a$  para valores mais positivos com o aumento da velocidade de varredura (Figura 25a e b, Tabela 14) e a ausência de onda catódica correspondente, independente da variação da velocidade (0,01 V s<sup>-1</sup> a 1 V s<sup>-1</sup>), corroboram a irreversibilidade do sistema.

Os gráficos de  $I_{p_a}$  versus v e  $I_{p_a}$  versus v<sup>1/2</sup> (Figuar 25c e d) mostram que o transporte de massa até a superfície do eletrodo é caracterizado por um processo misto, havendo competição entre o processo difusional e o adsortivo, pois até a velocidade de 0,5 V s<sup>-1</sup> o sistema apresenta-se com tendência linear, característico de processo difusional, enquanto com o aumento da velocidade de varredura (a partir de 0,6 V s<sup>-1</sup>), abservou-se a perda de linearidade nos gráficos, indicativo de processo adsortivo. Na Figura 25e também é possível verificar que o potencial de pico anódico ( $E_{pa}$ ) apresenta pequena variação em função do log v.

v (V s <sup>-1</sup> )	<i>E</i> (V)	<i>Ι</i> pa (μΑ)	V <sup>1/2</sup>	log v
0,010	0,718	3,202	0,100	-2,000
0,020	0,718	5,191	0,141	-1,699
0,035	0,718	6,161	0,187	-1,456
0,050	0,713	7,897	0,224	-1,301
0,075	0,713	11,087	0,274	-1,125
0,100	0,718	11,459	0,316	-1,000
0,200	0,727	17,428	0,447	-0,699
0,300	0,731	23,886	0,548	-0,522
0,400	0,722	28,152	0,632	-0,398
0,500	0,731	35,394	0,707	-0,301
0,750	0,731	38,975	0,866	-0,125
1,000	0,731	51,361	1,000	0,000

Tabela 15 – Parâmetros eletroquímicos obtidos a partir da VC da bergenina em solução etanólica (10%) tamponada, pH 4,5. Estudo em função da velocidade de varredura. *E*pa vs. Ag/AgCI/CI (sat.).

Fonte: AUTORA, 2015.

As técnicas de VPD e VOQ também foram aplicadas para a bergenina em solução etanólica (10% v/v) tamponada (pH 4,5), a fim de confirmar a presença de uma única onda anódica, conforme observado na Figura 26, e a irreversibilidade do sistema devido à ausência de pico reverso no voltamograma de onda quadrada.

Figura 26 – Voltamogramas de pulso diferencial (a) e de onda quadrada (b) da bergenina em meio prótico. [Bergenina] = 2,0 mmolL<sup>-1</sup> em solução etanólica (10%) tamponada, pH 4,5; eletrodo de CV.



Fonte: AUTORA, 2015.

#### 5.1.1.2.1 Eletrólise em potencial controlado

Com o objetivo de elucidar o mecanismo de oxidação eletroquímica da bergenina e identificar o produto eletrogerado, eletrólises em potencial controlado foram realizadas em solução etanólica (10% v/v) tamponada (pH 4,5) e a condução da reação acompanhada por VC e espectroscopia no UV-Vis.

A eletrólise em potencial controlado da bergenina (0,025 g - 1,9 mmol L<sup>-1</sup>) foi realizada em  $E_{ap}$  +0,90 V, registrando-se o número de coulombs envolvidos, o valor da corrente residual e o tempo do processo. A reação ocorreu envolvendo um consumo de 2 elétrons/mol, de acordo com os cálculos realizados a partir da equação de Faraday, no tempo total de 3 horas (Figura 27a). No final da eletrólise foi observada a mudança de coloração da solução, que passou de incolor a marrom claro.

Com o acompanhamento da eletrólise por voltametria cíclica (Figura 27b) foi possível observar um leve deslocamento de potencial para valores menos positivos e um decaimento da corrente de pico ( $Ip_a$ ) basicamente à metade quando a carga (Q) foi relativa a 1 elétron. Entretanto, a corrente de pico para carga correspondente a 2 elétrons decai completamente, indicando que toda bergenina foi oxidada.

O espectro no UV-Vis obtido para bergenina em tampão acetato, pH 4,5, apresentou três bandas de absorção (Figura 27c) correspondentes as transições eletrônicas  $\pi \rightarrow \pi^*$  do anel aromático substituído presente em sua estrutura. Já os

espectros no UV-Vis (Figura 27c, Tabela 16) obtidos durante a eletrólise revelaram um decréscimo gradativo das bandas de absorção em 213 (banda I), 271 (banda II) e 314 nm (banda III) (efeito hipocrômico) até quase completo desaparecimento, sendo observado deslocamento hipsocrômico para banda I e deslocamento batocrômico para as bandas II e III.

Entretanto, conforme descrito no item 4.2.3.1, a extração do produto da eletrólise não teve sucesso, impedindo seu isolamento e, consequentemente, sua identificação através dos métodos de caracterização físico-química, como infravermelho e RMN-<sup>1</sup>H. Assim, esta etapa foi considerada limitante para validar o mecanismo oxidativo proposto para bergenina em meio prótico (pH 4,5) (Figura 28).

Figura 27 - (a) Eletrólise da bergenina com  $E_{ap} = +0,90$  V; (b) Voltamogramas cíclicos antes e após eletrólise, v = 0,10 V s<sup>-1</sup>; eletrodo de CV; (c) Espectro no UV-Vis durante a eletrólise.



Fonte: AUTORA, 2015.

Condição	Banda I	Banda II	Banda III
Antes da eletrólise	213	211	205
Q/1e⁻	271	272	278
Q/2e <sup>-</sup>	314	317	319

Tabela 16 – Bandas de absorção no UV-Vis observadas para bergenina e seu produto de eletrólise em meio prótico (tampão acetato, pH 4,5).

Fonte: AUTORA, 2015.

Com base nos valores de pKa descritos por Zhou e cols (2008) para as hidroxilas fenólicas da bergenina nas posições 5 e 7, respectivamente, 5,46 e 5,74, e no número de elétrons obtidos por eletrólise (dois elétrons) em meio prótico, foi possível sugerir o produto de oxidação da bergenina, conforme mostrado na Figura 28. Contudo, os espectros obtidos no UV-Vis não apresentaram bandas de absorção referente ao sistema de duplas conjugadas, indicando, provavelmente, instabilidade do produto eletrogerado.





Fonte: AUTORA, 2015.

Diferentes sensores têm sido descritos na literatura para quantificação de bergenina em formulações farmacêuticas e fluidos biológicos. Chen e cols (2007) realizaram o estudo eletroquímico da bergenina utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com poli-4-(2-piridilazo)-resorcinol, obtido por eletropolimerização, e sua determinação em comprimidos e urina através de VPD. Os estudos foram

realizados em tampão fosfato (pH 6,0) e o mecanismo proposto para bergenina envolveu a perda de 2 elétrons e 2 prótons, corroborando os dados da eletrólise obtidos no presente trabalho. Li e cols (2013) propuseram um sensor eletroquímico para detecção de bergenina em comprimidos utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com grafeno e poli-(*L*-lisina) através de voltametria de pulso linear. O mecanismo eletro-oxidativo proposto para bergenina confirma o anterior.

Já Zhuang e cols (2008) aplicaram as técnicas de VC e VPD para verificar as propriedades eletrocatalíticas da bergenina em eletrodo de pasta de carbono modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT), e realizar sua determinação em comprimidos. Tais estudos demonstraram uma corrente máxima em pH 7,0 e que a adição de MWCNT na superfície do eletrodo de pasta de carbono resulta no aumento da intensidade de corrente de pico anódico da bergenina, sendo o mecanismo oxidativo proposto envolvendo 1 elétron e 1 próton.

Desta forma, vale ressaltar a importância do isolamento do produto de oxidação eletroquímica da bergenina obtido por eletrólise, visando correlacioná-lo com estudos que envolvem atividade biológica e seu metabolismo *in vitro* e *in vivo*, já que se trata de um composto fenólico que apresenta diversas propriedades terapêuticas (BAJRACHARYA, 2015). Portanto, o mecanismo oxidativo da bergenina pode constituir uma referência para sua ação farmacológica em estudos clínicos.

Embora a bergenina seja utilizada na medicina chinesa para o tratamento e prevenção de doenças por décadas, nenhum produto do metabolismo da bergenina havia sido descrito até 2012. Apenas estudos cinéticos haviam sido reportados na literatura.

A detecção da bergenina em plasma (SHI et al., 2006; QIN et al., 2007), urina, fezes e tecidos de ratos (SHI et al., 2009) foi realizada pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa. Os parâmetros farmacocinéticos obtidos nestes estudos indicaram que a bergenina apresentou uma ampla distribuição e baixas velocidades de eliminação em ratos, após administração intravenosa. Wang e cols (2009) realizaram a determinação da bergenina em plasma humano após administração oral através do método de CLAE acoplada à espectroscopia de massa (CLAE-EM/EM), sendo os dados farmacocinéticos descritos pela primeira vez em humanos.

Como o estudo do metabolismo da bergenina pode proporcionar uma visão para novas terapias clínicas e desenvolvimento de novos fármacos, Song e cols (2013) propuseram o perfil metabólito da bergenina em fluidos corporais e fezes de ratos através da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa com analisador quadrupolo por tempo de vôo (CLAE/Q-TOF-EM/EM) após administração intragástrica (gavagem) de dose única de 250 mg/kg. Os resultados apontaram que as principais vias metabólicas da bergenina em ratos podem ser glicuronidação, sulfatação, hidrólise e metilconjugação, com formação de três metabólitos majoritários (Figura 29) que tiveram suas estruturas confirmadas por EM-EM. Posteriormente, este mesmo grupo identificou e caracterizou a UDPglicuronosiltransferase humana UGT1A1 como a isoforma responsável pela glicuronidação da bergenina em frações microssomais de fígado humano (SONG et al., 2014).





Fonte: Adaptado de Song et al., 2013.

Como reações de oxidação, redução e hidrólise acontecem no metabolismo de fase I, não é possível determinar uma correlação direta entre o produto da eletrooxidação da bergenina sugerido (Figura 28) e o produto do metabolismo da bergenina proposto pela literatura (Figura 29). É importante ressaltar que os processos metabólicos são complexos, representados, por exemplo, pela atividade de diferentes enzimas que catalisam reações específicas. Neste contexto, é salutar afirmar que reações de glicuronidação catalisada por UDP-glicuronosiltransferases são responsáveis por mais de 35% de todo metabolismo de fase II de fármacos (SONG et al., 2014), sendo os produtos mais polares que os fármacos originais, sendo excretados mais rapidamente no líquido biliar e urina.

### 5.1.2 Estudos de Interação com Ciclodextrinas

### 5.1.2.1 Estudo de Trasferência de Fase por Voltametria Cíclica

Devido à baixa solubilidade da bergenina em meio aquoso, estudos de interação com ciclodextrinas foram realizados em tampão acetato (pH 4,5, 0,2 mol L<sup>-1</sup>) através de VC. A Figura 30 mostra o comportamento voltamétrico da bergenina na presença de diferentes tipos de CDs ( $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e HP- $\gamma$ -CD) nas proporções 10:1, 1:1 e 1:10 (bergenina:CD). O estudo de transferência de fase tem como objetivo avaliar a influência da CD sobre o perfil voltamétrico da bergenina a partir de alterações na corrente de pico ( $Ip_a$ ) e deslocamento de potencial ( $Ep_a$ ).

Em meio prótico (tampão acetato pH 4,5), a bergenina apresentou potencial de oxidação em torno de +0,75 V *vs.* Ag|AgCl|Cl<sup>-</sup> e intensidade de corrente em torno de 14,5  $\mu$ A nas condições experimentais já descritas. Ao analisar a influência da  $\alpha$ -CD no perfil voltamétrico da bergenina (Figura 30a), observaram-se aumento gradativo na *I*p<sub>a</sub> e deslocamento de potencial para valores menos positivos em função do aumento da concentração de  $\alpha$ -CD, indicando aumento da solubilidade e maior facilidade de oxidação.

Os voltamogramas obtidos para a bergenina na presença de  $\beta$ -CD (Figura 30b), apresentaram aumento na intensidade de corrente e discreto deslocamento de  $Ep_a$  para valores mais positivos, sendo o maior aumento de  $Ip_a$  observado para proporção 1:10. Já na presença de HP- $\gamma$ -CD (Figura 30c) o perfil voltamétrico da

bergenina foi semelhante àquele em presença de α-CD, sendo observado o menor aumento da intensidade de corrente quando comparado aos demais tipos de CD estudados, podendo ser justificado pela cavidade interna da HP-γ-CD apresentar maior diâmetro, o que pode diminuir a interação com a bergenina.

Figura 30 – Voltamogramas cíclicos da bergenina (massa equivamente a 0,5 mmol L<sup>-1</sup>) em tampão acetato pH 4,5 na presença de massas equivalente a 0,05 mmol L<sup>-1</sup>, 0,5 mmol L<sup>-1</sup> e 5 mmol L<sup>-1</sup> de  $\alpha$ -CD (a),  $\beta$ -CD (b) e HP- $\gamma$ -CD (c); eletrodo de CV,  $v = 0,10 \text{ V s}^{-1}$ . Inserção: *I*p<sub>a</sub> *vs.* [CD].



Fonte: AUTORA, 2015.

De modo geral, os estudos de transferência de fase da bergenina na presença de CDs evidenciaram aumento de  $I_{P_a}$  associado a um discreto deslocamento de  $E_{P_a}$ , sugerindo interação da bergenina com as CDs, com consequente aumento da solubilidade da bergenina em meio aquoso.

A pequena variação do *E*p<sub>a</sub> para potenciais mais positivos, ou não, também sugere que os centros redox (hidroxilas fenólicas) da bergenina continuam livres após a interagem com a ciclodextrina. Este fato é de suma importância, já que a

bergenina apresenta diversas propriedades terapêuticas, e que o desenvolvimento de formulações farmacêuticas, envolvendo CDs, é uma ferramenta amplamente utilizada pela indústria farmacêutica, pois afeta as propriedades físico-químicas da molécula hóspede, aumentando sua solubilidade e taxa de dissolução em meio aquoso e, consequentemente, sua biodisponibilidade (PINHO et al., 2014; POÓR et al., 2015).

Portanto, os resultados obtidos por VC para interação da bergenina com os diferentes tipos de CD contribuiram para escolha do tipo de CD a ser utilizada para preparar o complexo bergenina:CD. A  $\beta$ -CD foi escolhida dar continuidade aos estudos, sendo o complexo bergenina: $\beta$ -CD preparado nas proporções 1:1 e 1:2 através do método de co-evaporação. A opção pela  $\beta$ -CD baseou-se no maior aumento de *I*p<sub>a</sub> observado durante o estudo de transferência de fase quando comparado com a *I*p<sub>a</sub> obtida para bergenina na forma livre.

# 5.1.2.2 Caracterização físico-química do complexo bergenina:β-CD

Os complexos bergenina:β-CD obtidos nas proporções 1:1 e 1:2 foram caracterizados com aplicação das técnicas de FT-IR, DSC e RMN-H<sup>1</sup>, visto que esses estão entre os procedimentos mais realizados para identificação da formação de complexos envolvendo CDs (MURA, 2014b).

# ✓ FT-IR

Os espectros de FT-IR foram obtidos para bergenina, β-CD e complexos bergenina:β-CD nas proporções 1:1 e 1:2 (Figura 31). O espectro da bergenina apresentou bandas de absorção em: 3413 e 3235 cm<sup>-1</sup> referentes ao estiramento de O-H (Ar-OH); 2984 cm<sup>-1</sup> correspondente ao estiramento C-H aromático, CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>; 1702 cm<sup>-1</sup> relacionada ao estiramento C=O, 1615, 1529 e 1460 cm<sup>-1</sup> referentes ao estiramento da ligação C=C do anel aromático; 1358, 1228 cm<sup>-1</sup> correspondentes à deformação angular das ligações C-H, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>; 1090 e 1060 cm<sup>-1</sup> relacionadas ao estiramento da ligação C-O. Os resultados obtidos estão em conformidade com a literatura (MAGALHÃES et al., 2007; CHEN et al., 2008; KUMAR et al., 2012).

O espectro de FT-IR obtido para a  $\beta$ -CD mostrou banda de absorção em: 3402 cm<sup>-1</sup> correspondente ao estiramento O-H; 2932 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento C-H; 1417 cm<sup>-1</sup> correspondente à deformação angular CH<sub>2</sub> e 1159, 1083 cm<sup>-1</sup> relacionada ao estiramento de C-O, conforme descrito na literatura (FERREIRA et al., 2013).

A interação entre a bergenina e a cavidade hidrofóbica da  $\beta$ -CD pode ser sugerida a partir de alterações nas bandas de absorção obtidas para o complexo bergenina: $\beta$ -CD nas proporções 1:1 e 1:2. As maiores alterações ocorreram na região entre 1750 a 750 cm<sup>-1</sup>, visto que algumas bandas do espectro da bergenina apresentaram sua intensidade alterada (1702, 1615, 1529, 1460, 1358 e 1228 cm<sup>-1</sup>) quando complexada com  $\beta$ -CD, indicando sua presença. Outra alteração relevante obtida nos espectros dos complexos, independente da proporção, foi o deslocamento da banda correspondente ao estiramento C-O.

Figura 31 – Espectros FT-IR da bergenina (---), β-CD (---) e do complexo bergenina:β-CD nas proporções 1:1 (---) e 1:2 (---) obtidos por co-evaporação.



Fonte: AUTORA, 2015.

✓ RMN-H<sup>1</sup>

O espectro de RMN-H<sup>1</sup> da bergenina apresentou deslocamentos químicos semelhantes aos encontrados na literatura, conforme apresentado na Tabela 17 e Figura 33a. Há diferenças em termos dos solventes empregados. O espectro da bergenina mostrou a presença de singleto característico de hidrogênio aromático em  $\delta$  7,02 e singleto correspondente ao grupo metoxila em  $\delta$  3,73, além dos sinais típicos do *C*-glicosídeo ( $\delta$  3,65, 3,45, 3,67, 3,88 e 4,08).

Tabela 17 – Deslocamentos químicos dos espectros de RMN-H<sup>1</sup> da bergenina.



[1] Magalhães et al., 2007; [2] Nunomura et al., 2009.

Fonte: AUTORA, 2015.

Conforme descrito na literatura, a aplicação de RMN na interpretação da química de CDs é tão importante que nenhuma outra técnica espectroscópica é capaz de fornecer a riqueza de informações sobre o produto da interação de sistemas supramoleculares. Assim, a variação no deslocamento químico (Δδ) dos

átomos de hidrogênio da CD é a experiência mais simples utilizada como indicativo da complexação entre moléculas ligantes e a CD, sendo a variação do deslocamento químico dos hidrogênios H3 e H5, localizados no interior de sua cavidade, um dos parâmetros utilizados na identificação do tipo de interação existente, seja inclusão total (Δδ H3 ≤ H5) ou parcial (Δδ H3 > H5) (PESSINE et al., 2012).

Como evidenciado na Figura 32, foi possível observar que os espectros de RMN-H<sup>1</sup> obtidos para o complexo bergenina: $\beta$ -CD nas proporções 1:1 e 1:2 não apresentaram deslocamentos químicos significativos quando comparados entre si. Já ao comparar os deslocamentos químicos obtidos para os hidrogênios da bergenina na forma livre e complexada, constatou-se deslocamento dos sinais característicos da bergenina em H4 e H14 em  $\delta$  7,02 e 4,08, para região mais desprotegida, em  $\delta$  7,20 e 4,20, respectivamente.

Ao comparar a variação dos deslocamentos químicos dos hidrogênios H3 e H5 da  $\beta$ -CD na forma livre e complexada com bergenina (Tabela 18) nas proporções 1:1 e 1:2, observou-se que a  $\Delta\delta$  H3  $\leq$  H5, indicando uma possível inclusão total da bergenina na cavidade interna da  $\beta$ -CD. Entretanto, para confirmar o tipo de interação, estudos bidimensionais (ROESY) necessitarão ser conduzidos.

Tabela 18 – Deslocamentos químicos dos hidrogênios H3 e H5 da  $\beta$ -CD e suas variações ( $\Delta \delta = \delta_{complexada} - \delta_{livre}$ ) em presença de bergenina.



β-CD		Bergenina:β-CD (1:1)		Bergenina:β-CD (1:2)	
H	δ	δ	Δδ	δ	Δδ
3	3,84	3,78	-0,06	3,79	-0,05
5	3,71	3,68	-0,03	3,76	-0,05

Fonte: AUTORA, 2015.

(continua)

a) Bergenina



(continua)

b) β-CD



(continua)

c) Bergenina:β-CD (1:1)



103

(conclusão)

d) Bergenina:β-CD (1:2)



Fonte: AUTORA, 2015.
### ✓ DSC

As curvas térmicas da bergenina, β-CD e complexos bergenina:β-CD nas proporções 1:1 e 1:2 são mostradas na Figura 33. A curva DSC da bergenina apresentou picos endotérmicos em 130,74 °C, 150,29 °C e outro mais acentuado, próximo de 237,86 °C, que corresponde ao seu ponto de fusão. Qin e cols ( 2010) verificaram a presença de picos em 143,0 °C, 153,5 °C e 240,7 °C no termograma da bergenina, sendo este último um pico agudo e correspondente à transição da fase sólida para líquida. Nasser e cols (2009) encontraram o ponto de fusão da bergenina a uma temperatura próxima de 235 °C, e Madusolumuo e Okoye (1995) próxima de 238 °C. A comparação dos resultados obtidos com os dados da literatura permitiu estabelecer a formação do complexo.





Fonte: AUTORA, 2015.

No termograma da  $\beta$ -CD verificou-se um sinal endotérmico em torno de 96,59 °C, correspondente à perda de água por evaporação (T < 100 °C). Outros

sinais agudos endotérmicos foram observados, próximos a 297,29 °C, que correspondem ao ponto de fusão da β-CD, seguido dos efeitos endo-exo que são relacionados à degradação térmica em 347 °C. Estes resultados estão de acordo com os dados da literatura (FERREIRA et al., 2013).

A curva DSC do complexo bergenina: $\beta$ -CD 1:1 mostrou superposição das curvas individuais de bergenina e  $\beta$ -CD. O pico endotérmico de fusão da bergenina quase desapareceu, no entanto, foi detectado um pequeno pico endotérmico em 265,9 °C, o que confirmou a presença da bergenina no complexo. Já o pico correspondente ao ponto de fusão da  $\beta$ -CD diminuiu de 297,29 °C para 281,39 °C.

Para o termograma que representa o complexo bergenina: $\beta$ -CD 1:2, observou-se deslocamento de picos, mas os sinais da  $\beta$ -CD prevalecem, em comparação com o complexo bergenina: $\beta$ -CD na proporção 1:1, possivelmente devido à sua maior proporção. O sinal endotérmico da  $\beta$ -CD que corresponde à perda de água por evaporação sofreu um deslocamento de 96,59 °C para 97,43 °C. O sinal equivalente ao ponto de fusão da  $\beta$ -CD se deslocou de 297,29 °C para 302,73 °C, adquirindo um perfil mais agudo, semelhante ao da bergenina. Observouse também um deslocamento do pico equivalente aos efeitos endo-exo relacionados à degradação térmica para 327,13 °C, sofrendo uma diminuição de aproximadamente 20 °C.

Com base nos dados de caracterização supracitados, foi possível verificar a interação da bergenina com a cavidade da  $\beta$ -CD em diferentes proporções de  $\beta$ -CD (1:1 e 1:2). Portanto, a seguir estão dispostos os resultados obtidos em estudos teóricos que podem contribuir para justificar o mecanismo oxidativo proposto para bergenina e sua interação com  $\beta$ -CD. Também serão reportados ensaios de lipoperoxidação, viabilidade celular (MTT) e estudos envolvendo DNA através do sensor eletroquímico e espectroscopia UV-Vis, visando avaliar a ação da bergenina livre e complexada com  $\beta$ -CD nas proporções 1:1 e 1:2.

### 5.1.2.3 Estudos Teóricos

Apesar das CDs apresentarem ampla aplicabilidade e serem estudadas em diferentes áreas, a caracterização dos complexos formados constitui ainda uma etapa limitante. A fraca interação entre hóspede e hospedeiro representa uma característica intrínseca do sistema molecular, a qual dificulta a utilização de algumas técnicas analíticas aplicadas à solução. Nesse contexto, a química computacional vem contribuindo de forma significativa para a determinação da interação entre a molécula ligante e ciclodextrinas (BRITTO et al., 2004). Desta forma, estudos teóricos baseados no fundamento da química quântica têm sido utilizados como uma poderosa ferramenta de predição das energias de ligação e estruturas de equilíbrio para os complexos de inclusão (FILIPPA et al., 2008; COSCARELLO et al., 2009; SOUSA et al., 2008).

Desta forma, estudos teóricos foram conduzidos a fim de determinar parâmetros energéticos e mapas de densidade de spin da bergenina e do complexo bergenina: $\beta$ -CD através do programa *Gaussian 09*. Partindo das geometrias optimizadas e com o auxílio dos mapas de densidade de spin obtidos para a bergenina na forma catiônica (BCat), bergenina radical em função da hidroxila ligada ao C5 (BR5), bergenina radical em função da hidroxila ligada ao C7 (BR7), BR5 complexada com  $\beta$ -CD (BR5- $\beta$ -CD) e BR7 complexada com  $\beta$ -CD (BR7- $\beta$ -CD) (Tabela 19), foi possível obter informações que corroboraram com o mecanismo de oxidação da bergenina e sua interação com  $\beta$ -CD.

Conforme mostrado na Figura 34, observa-se que as regiões com coloração probabilidade azul indicam onde há maior de se encontrar elétrons desemparelhados, ao passo que valores positivos de densidade de spin (Tabela 19) indicam a presença de elétrons desemparelhados e, portanto, quando há maior equidistribuição da densidade de spin, mais estável será o sistema. Também pode-se observar que para a bergenina na forma catiônica (Bcat) a densidade de spin está distribuída entre os átomos C5, C6 e C7, mostrando que o grupo H<sup>+</sup> poderá ser retirado preferencialmente das hidroxilas ligadas ao C5 e C7 para levar à formação da bergenina radical 5 (BR5) ou bergenina radical (BR7), respectivamente.

Na análise termodinâmica entre os sistemas BR5 e BR7, observa-se que a bergenina radical 5 (BR5) é mais estável, com energia 5,07 kcal mol<sup>-1</sup> inferior a BR7, sendo essa estabilidade explicada por sua estrutura eletrônica. Através da Figura 34b e 34c e da Tabela 19, notou-se que embora as densidades de spin tenham se tornado mais localizadas no C4, C6 e C8, para ambos os radicais formados, há uma distribuição mais homogênea dessa densidade de spin na espécie BR5, formada a partir da hidroxila ligada ao C5, o que justifica sua maior estabilidade termodinâmica. Além disso, a presença de um átomo de oxigênio etéreo em posição *para* relativa à hidroxila ligada ao C7 torna mais difícil a saída de H<sup>+</sup> da hidroxila nessa posição para

formação da espécie BR7 e ainda confere uma estabilização ao radical formado a partir da hidroxila ligada ao C5, devido à deslocalização de densidade eletrônica, provavelmente devido à ligação de hidrogênio intermolecular.

Tabela 19 – Valores de densidade de spin da bergenina radical antes e depois da complexação com a ciclodextrina.



POSIÇÃO	BCat	BR5	BR7	BR5-β-CD	BR7-β-CD
C2	-0,022362	0,020793	0,025338	0,016160	0,023103
C3	0,294800	-0,300132	-0,372327	-0,263904	-0,358824
C4	-0,270164	0,386205	0,460775	0,341658	0,417164
C5	0,220555	-0,110617	-0,377223	-0,095646	-0,355732
C6	0,217239	0,536596	0,525435	0,534550	0,546617
C7	0,204874	-0,321914	-0,120668	-0,259544	-0,116772
C8	-0,282983	0,423193	0,508247	0,334702	0,505445
O2	0,023473	-0,024232	-0,027145	-0,017519	-0,024176
O5	0,121876	0,221073	-0,054062	0,233045	0,233200
O6	0,383495	0,246233	0,228070	0,256608	0,222471
07	0,141292	-0,049611	0,231847	-0,056599	-0,064980

Fonte: AUTORA, 2015.



Figura 34 – Densidade de spin e estrutura das espécies (a)/(d) BCat, (b)/(e) BR5 e (c)/(f) BR7.

Após a determinação dos mapas de densidade de spin, que conduziu ao radical teoricamente mais estável, o BR5, determinaram-se os mapas de densidade de spin para o complexo formado pela bergenina (já na forma radicalar) dentro da cavidade da  $\beta$ -CD (Figura 35). Como as espécies oxidadas já haviam sido observadas fora do ambiente de cavidade oferecido pela  $\beta$ -CD, a oxidação sobre a hidroxila em C5 é realmente favorecida devido à maior equidistribuição da densidade de spin neste radical. Esse resultado corrobora os dados experimentais que mostram que o radical é formado a partir da hidroxila ligada ao C5.

Fonte: AUTORA, 2015.



Figura 35 – Densidade de spin do complexo (a) Bcat- $\beta$ -CD, (b) BR5- $\beta$ -CD e (c) BR7- $\beta$ -CD.

Fonte: AUTORA, 2015.

Os estudos realizados também apontaram que para que o processo de oxidação ocorra, necessariamente, a bergenina precisa sair da cavidade da ciclodextrina, conforme observado na coordenada de reação (Figura 36). O primeiro passo é naturalmente mais estável por se tratar de um complexo do tipo bergeninaβ-CD que, além de ainda não se encontrar na forma radical, é estabilizado por ligações de hidrogênio. Como se pode observar na coordenada de reação (Figura 36), a saída da bergenina justifica a oxidação das hidroxilas ligadas aos C5 e C7, sendo a posição 5 mais favorecida cinética e termodinamicamente. Observa-se ainda que após oxidação, a bergenina é estabilizada ao entrar na cavidade da β-CD, o que explica a maior atividade antioxidante desse sistema (BR5-β-CD).

Portanto, a bergenina sai da cavidade da  $\beta$ -CD, sofre a oxidação, se torna mais instável e então retorna para a  $\beta$ -CD para ser estabilizada, fazendo com que a atividade antioxidante do sistema aumente, pois há estabilização da bergenina radical após a reação de oxidação. Desta forma, a possibilidade de saída da cavidade da  $\beta$ -CD para sofrer oxidação reflete grande importância em sistemas de *drugs delivery* e, consequentemente, em seu perfil biológico de ação.





Fonte: AUTORA, 2015.

Através da coordenada intrínseca de reação (Figura 37), usando a água como solvente explicito para captura do H<sup>+</sup> da espécie BCat das hidroxilas ligadas ao C5 e ao C7 para formação das espécies BR5 ou BR7, respectivamente, foi possível observar o favorecimento da formação do radical a partir da retirada de H<sup>+</sup> da hidroxila ligada ao C5.

Figura 37 – Coordenada intrínseca de reação da formação da bergenina radical usando a água como solvente explícito.



Fonte: AUTORA, 2015.

Conforme descrito na literatura, estudos termodinâmicos e de modelagem molecular para complexos entre compostos fenólicos, como ácido caféico e o ácido clorogênico, e  $\beta$ -CD, contribuíram para comprovar que a interação entre os átomos que formam o complexo é energeticamente favorável, sendo útil para caracterização do mecanismo molecular da complexação (GÓRNAS et al., 2009). Nuchuchua e cols (2009) também descreveram sobre estudos teóricos que permitiram prever e explicar a formação do complexo e a orientação do eugenol na cavidade de diferentes tipos de CDs, sendo a porção aromática do eugenol incorporada parciamente à cavidade hidrofóbica da  $\alpha$ -CD, enquanto que para a  $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD, a porção aromática pode translocar completamente dentro da cavidade, sendo a estabilidade dos complexos regida por ligação de hidrogênio intermolecular.

Estudos computacionais também foram descritos na literatura para verificar a formação de derivados radicalares formados a partir da bergenina utilizando <sup>•</sup>H, <sup>•</sup>OH, <sup>•</sup>CH<sub>3</sub>, e <sup>•</sup>CCl<sub>3</sub> como radicais inicializadores. Os cálculos teóricos mostraram que o ataque de radicais é favorecida na porção aromática, onde o LUMO (orbital molecular desocupado de mais baixa energia) está localizado, sendo o grupo metoxila (-OCH<sub>3</sub>) a posição mais favorável para o ataque de radicais. A estabilidade termodinâmica do produto secundário (R-CH<sub>3</sub>) formado também foi avaliada,

contribuindo para justificar a preferência do ataque radicalar na posição metoxila quando comparado às hidroxilas fenólicas, concluindo que a porção aromática é responsável pela atividade antioxidante proporcionada pela bergenina (ABREU DE, et al., 2008).

Os dados obtidos com os estudos teóricos, realizados no presente trabalho, demonstraram que a oxidação da bergenina envolve, primeiramente, a saída do H<sup>+</sup> e do elétron localizado na hidroxila C5, o que corrobora com o mecanismo eletro-oxidativo proposto durante os estudos eletroquímicos em meio aprótico e prótico.

A interação da bergenina com  $\beta$ -CD relatada em função dos estudos de densidade do spin e energias envolvidas na coordenada de reação demonstraram que a formação do cátion radical ocorre fora da cavidade hidrofóbica da  $\beta$ -CD, sendo esta característica importante para ser correlacionada com os resultados dos estudos envolvendo bergenina, livre e complexada com  $\beta$ -CD, frente à inibição da lipoperoxidação, citotoxicidade e interação com DNA, que serão descritos a seguir.

### 5.1.2.4 Capacidade antioxidante em sistemas biomiméticos de membrana

O estresse oxidativo em tecidos e membranas está associado a doenças como Alzheimer, aterosclerose, diabetes, hepatites e outras. Contudo, compostos com propriedades antioxidantes são utéis no tratamento das mesmas, visto que os danos oxidativos são minimizados, conforme descrito no item 2.2.1. Neste contexto, o efeito protetor de antioxidantes contra a peroxidação lipídica tem sido extensivamente estudado (NIKI, 2012).

A proteção contra a peroxidação lipídica foi avaliada durante 30 minutos usando um modelo de membrana lipídica (lipossomas unilamelares de lecitina de soja) com sonda fluorescente  $C_{11}$ Bodipy<sup>581/591</sup> e o AAPH como gerador de radical peroxila. A indução da peroxidação lipídica lipossomal foi observada na ausência de antioxidantes (controle negativo, tampão fostato pH 7,4 e  $\beta$ -CD) e na presença do Trolox (controle positivo), antioxidante com habilidade inibidora da peroxidação lipídica bem conhecida. A  $\beta$ -CD não apresentou nenhum caráter protetor, por isso seu perfil foi comparável ao controle negativo.

De acordo com a Figura 38, os ensaios de peroxidação lipídica mostraram que a bergenina e o complexo bergenina:β-CD nas proporções 1:1 e 1:2 apresentam efeitos protetores na membrana, porém não tão expressivos quanto o Trolox. Abreu e cols (2008) relataram sobre a atividade antioxidante da bergenina extraída da casca de *Sacoglottis uchi* Huber (Humireaceae) a partir dos ensaios de  $\beta$ -caroteno, DPPH e sistema de Fenton, corroborando com seu efeito protetor.

Figura 38 - Proteção contra a peroxidação lipídica (%) proporcionada pela bergenina (•) (100 µmol L<sup>-1</sup>) e complexo bergenina: $\beta$ -CD 1:1 (·) e 1:2 (**a**) (100 µmol L<sup>-1</sup>). Tampão fosfato pH 7,4 (**A**) e  $\beta$ -CD (**V**) (100 µmol L<sup>-1</sup>) como controle negativo, e Trolox (•) como controle positivo (100 µmol L<sup>-1</sup>).



Fonte: AUTORA, 2015.

O efeito lipoprotetor da bergenina sobre a oxidação de óleos vegetais foi descrito por Maduka e Okoye (2002). Eles propuseram que este composto fenólico inibe a propagação da peroxidação lipídica a partir da redução da velocidade de formação de produtos intermediários (hidroperóxido, malondialdeído e malonaldeído) da peroxidação lipídica, responsáveis pela oxidação de óleos vegetais estocados. Posteriormente, Maduka e cols (2002) relataram a influência da bergenina sobre os efeitos da peroxidação lipídica em ratos induzia por 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH). O efeito lipoprotetor da bergenina frente aos danos oxidativos foi avaliado em função dos níveis de glicose no cérebro, fígado e glóbulos vermelhos, e demonstraram que a bergenina inibe a depleção dos níveis de glicose, observada para ação do 2,4-DNPH, sugerindo proteção a peroxidação lipídica.

De acordo com os dados obtidos, sugere-se que o aumento do efeito protetor verificado para o complexo bergenina:β-CD na proporção 1:1, em comparação com

a bergenina livre, ocorre devido ao aumento da solubilidade no meio tamponado, melhorando assim sua capacidade protetora. Resultado semelhante foi observado para mangiferina (polifenol), que tem seu efeito protetor acentuado quando encapsulada com  $\beta$ -CD na mesma proporção (FERREIRA et al., 2013). Porém, os resultados supracitados diferem do relatado na literatura para carotenoides, que mostrou que a complexação do substrato com CD pode diminuir a habilidade antioxidante (POLYAKOV et al., 2004). Já a diminuição da capacidade protetora do complexo bergenina: $\beta$ -CD na proporção 1:2 pode ser atribuída ao excesso de  $\beta$ -CD que pode diminuir a ação antioxidante da bergenina por impedimento estérico.

### 5.1.2.5 Ensaio de Viabilidade Celular

O ensaio MTT fornece um *screening* para a citotoxicidade (MOSMANN,1983), e, portanto, o presente trabalho avaliou a viabilidade celular através de testes *in vitro* da redução do MTT, após tratamento das células de linhagens de macrófagos (J774) com bergenina,  $\beta$ -CD e complexo bergenina: $\beta$ -CD nas proporções 1:1 e 1:2 em diferentes concentrações (1, 10, 25, 50 e 100 µg/mL) após exposição de 24h. Foi utilizado Tween e DMSO a 0,037% a 3% como controle positivo e como controle negativo, respectivamente.

Para a análise estatística dos dados obtidos, utilizou-se o programa GraphPad Prisma 6.0 onde aplicou-se o teste de comparação múltipla de médias de Newman-Keuls. Nenhuma diferença significativa (p < 0,05) foi observada entre as variáveis nas concentrações de 1 e 100 µg/mL.

De acordo com a Figura 39, é possível verificar que as amostras analisadas não apresentaram uma tendência única de toxicidade em função das diferentes concentrações de bergenina livre e complexada. A atividade proliferativa também foi observada nas concentrações de 10 e 50 µg/mL para bergenina, e na concentração de 25 µg/mL para o complexo bergenina:β-CD na proporção 1:2. LIANG e cols (2014) verificaram que a bergenina não exibiu efeito citotóxico aparente frente a eritrócitos normais e células HeLa e HepG2 em concentrações de até 5000 µg mL<sup>-1</sup>.

Diferenças significativas foram encontradas ao comparar as médias entre duas variáveis nas concentrações de 10, 25 e 50 µg/mL, conforme mostrado na Tabela 20, sendo apontadas diferenças fortemente significativas entre as váriaveis na concentração de 25 µg mL<sup>-1</sup>, sugerindo que estudos posteriores devam ser

realizados nesta concentração, a fim de avaliar a atividade citotóxica da bergenina livre e complexada com β-CD em função da variação do tempo de exposição.

Figura 39 – Efeito da bergenina,  $\beta$ -CD e complexo bergenina: $\beta$ -CD nas proporções 1:1 e 1:2 na viabilidade de linhagem de macrófagos J774 usando o ensaio MTT. Os dados foram expressos como % de células viáveis comparados ao grupo de células viáveis e mostrados como média ± desvio-padrão. Os valores do controle de viabilidade estão representados pela linha pontilhada.



Fonte: AUTORA, 2015.

Γabela 20 – Diferença sigr	nificativa obtida entre as	médias das variáveis	1 e 2 (p<0,05).
----------------------------	----------------------------	----------------------	-----------------

Concentração (µg mL <sup>-1</sup> )	Variável 1	Variável 2	Diferença significativa
	Bergenina	β-CD	**
10	Bergenina	Complexo 1:1	*
	β-CD	Complexo 1:1	*
	Bergenina	β-CD	****
	Bergenina	Complexo 1:2	****
25	β-CD	Complexo 1:1	****
	β-CD	Complexo 1:2	****
	Complexo 1:1	Complexo 1:2	****
	Bergenina	Complexo 1:1	**
50	β-CD	Complexo 1:1	**
	Complexo 1:1	Complexo 1:2	***

Fonte: AUTORA, 2015.

Desta forma, a influência da bergenina complexada com β-CD não pôde ser avaliada frente à atividade citotóxica ou proliferativa, pois a β-CD por si só também apresentou atividade variável em função da concentração estudada, ou seja, as amostras analisadas não apresentaram uma relação direta de concentração e toxicidade, demonstrando que a viabilidade celular foi conservada.

### 5.1.2.6 Estudos de interação com DNA

Muitos compostos bioativos exercem seus efeitos primários por interação reversível com DNA e, portanto, distinguir o tipo de interação não-covalente envolvida é fundamental para compreensão dos mecanismos biológicos (SUN et al., 2014). Neste contexto, devido às diversas propridades terapêuticas descritas para bergenina, estudos eletroquímicos e espectroscópicos envolvendo DNA são descritos a seguir.

#### 5.1.2.6.1 Estudos em sensor eletroquímico

Os estudos eletroquímicos envolvendo eletrodos modificados com DNA têm sido reportados na literatura para a determinação eletroanalítica de fármacos e para o estudo da interação dos mesmos com o DNA, visando avaliar danos celulares. Como descrito no item 2.1.2, os biossensores integram ácidos nucléicos como elemento de reconhecimento biológico e um eletrodo como transdutor do sinal eletroquímico, geralmente de carbono vítreo, sendo a resposta obtida em função da ligação do analito com os ácidos nucléicos (LABUDA et al., 2010). Estudos envolvendo o DNA fita simples (ssDNA) em solução também refletem importância na proposta de um possível mecanismo de ação biológico de compostos bioativos.

Neste contexto, a investigação eletroquímica da interação da bergenina com o DNA foi realizada a partir do uso de ssDNA em solução e dsDNA (dupla fita) em superfície de eletrodo de carbono vítreo.

Conforme mostrado na Figura 40, o voltamograma de pulso diferencial obtido para o ssDNA em meio aquoso etanólico tamponado (tampão acetato, pH 4,5), apresentou duas ondas anódicas bem definidas e de alta intensidade de corrente, referentes à oxidação das bases púricas, guanina e adenina, em +0,86 V e +1,18 V *vs* Ag|AgCI|CI<sup>-</sup> (sat.), respectivamente.

Na presença de bergenina (Figura 40a), observou-se um decréscimo da intensidade da corrente de pico de oxidação das bases, indicando uma possível

interação entre este derivado fenólico e o DNA. A variação da concentração de bergenina (10, 50 e 100  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>) em presença de ssDNA provocou um aumento, já esperado, da corrente de pico anódico da bergenina em +0,74 V e comprovou uma interação positiva do ligante com as bases, guanina e adenina, visto que o aumento da concentração do ligante intensificou o decaimento da intensidade da corrente de pico das mesmas. Resultado semelhante também foi obtido ao expor a solução de ssDNA à concentrações crescentes de  $\beta$ -CD (10, 50 e 100  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>), que como não apresenta grupamentos eletroativos nenhum pico anódico foi observado.

Figura 40 – Voltamogramas de pulso diferencial em diferentes concentrações de bergenina (a),  $\beta$ -CD (b) e complexo bergenina: $\beta$ -CD nas proporções 1:1 (c) e 1:2 (d) em solução etanólica (10% v/v) de ssDNA em tampão acetato pH 4,5 após exposição de 15 minutos. Eletrodo de CV;  $\nu = 5$  mV s<sup>-1</sup>.



Fonte: AUTORA, 2015.

Ao analisar a interação da bergenina na forma complexada com β-CD nas proporções 1:1 e 1:2 (Figura 40c e 40d), resultados relevantes foram obtidos, visto

que em ambas as condições a interação com ssDNA mostrou-se mínima, quando comparada a bergenina e β-CD isoladas. A presença de pico anódico referente à oxidação da bergenina comprovou a eficiência do método de co-evaporação pelo qual os complexos foram obtidos. O aumento na intensidade de corrente de pico anódico da bergenina também revela como a interação com β-CD influencia positivamente na solubilidade da bergenina em meio aquoso, visto que corrente de pico é proporcional à concentração do analito em solução.

Outra análise pertinente refere-se ao aumento da intensidade de corrente anôdica das bases guanina e adenina que, apesar de discreto, pode ser justificado pela influência da  $\beta$ -CD também na solubilidade do ssDNA, pois como o complexo 1:2 apresenta maior proporção de  $\beta$ -CD, este aumento foi verificado com maior nitidez (Figura 40c e 40d).

Assim, ao plotar os voltamogramas de pulso diferencial dos analitos em estudo (Figura 41) na concentração máxima avaliada (100  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>), foi possível verificar uma interação positiva da bergenina e  $\beta$ -CD com ssDNA, visto que o decaimento da intensidade de corrente de pico anódica das bases, guanina e adenina, foi acentuado, enquanto a variação desta intensidade para bergenina na forma complexada com  $\beta$ -CD nas proporções 1:1 e 1:2 foi muito discreta. Vale também ressaltar a influência da  $\beta$ -CD na solubilidade da bergenina em solução aquosa, pois a intensidade de corrente de pico anódico foi maior quando complexada na proporção 1:1, indicando que o excesso de  $\beta$ -CD em solução pode dificultar o processo oxidativo da bergenina.

Para os estudos em biossensor de dsDNA o eletrodo modificado foi mantido em contato em solução etanólica (10% v/v) tamponada (tampão acetato, pH 4,5) durante 15 minutos e o perfil registrado por voltametria de pulso diferencial, resultando no perfil esperado para o dsDNA, que inclui picos oxidativos de baixa intensidade de corrente em +1,0 e +1,25 V, referente às bases guanina e adenina (Figura 42). O voltamograma obtido para bergenina em eletrodo de carbono vítreo modificado com dsDNA apresentou um pico anôdico em torno de +0,7 V, referente à sua oxidação, que sofre deslocamento para potenciais menos positivos em função do aumento da concentração (10, 50 e 100 µmol L<sup>-1</sup>), contudo, não ocorreu exposição das bases (Figura 42). Figura 41 – Comparação dos voltamogramas de pulso diferencial da bergenina,  $\beta$ -CD e complexo bergenina: $\beta$ -CD nas proporções 1:1 (c) e 1:2 (d) em solução etanólica (10% v/v) de ssDNA em tampão acetato pH 4,5 após exposição de 15 minutos na concentração de 100 µmol L<sup>-1</sup>. CV;  $\nu$  = 5 mV s<sup>-1</sup>.



Fonte: AUTORA, 2015.

Figura 42 – Voltamogramas de pulso diferencial da bergenina em diferentes concentrações após 15 minutos de exposição ao biossensor de dsDNA (eletrodo de CV modificado com gel de dsDNA). Solução etanólica (10% v/v) tamponada (tampão acetato pH 4,5);  $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$ .



Fonte: AUTORA, 2015.

Perfil semelhante também foi observado nos voltamogramas de pulso diferencial obtidos para  $\beta$ -CD e bergenina na forma complexada com  $\beta$ -CD na concentração de 100 µmol L<sup>-1</sup> (Figura 43). Desta forma, os estudos envolvendo

ssDNA demonstraram que a bergenina interage com o DNA, implicando que este composto fenólico, provavelmente, apresenta um mecanismo de ação biológico relacionado à interação com DNA. Já os estudos em biossensor de dsDNA, demonstraram que a ausência de interação com o DNA, permite descartar sua ação como intercalante, já que apresenta estrutura planar, e a interação com ssDNA sugere alguilação de bases não pareadas.

Figura 43 - Voltamogramas de pulso diferencial da bergenina (a),  $\beta$ -CD (b) e complexo bergenina: $\beta$ -CD nas proporções 1:1 (c) e 1:2 (d) na concentração de 100  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> após 15 minutos de exposição ao biossensor de dsDNA (eletrodo de CV modificado com gel de dsDNA). Solução etanólica (10% v/v) tamponada (tampão acetato pH 4,5);  $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$ .



Fonte: AUTORA, 2015.

### 5.1.2.6.2 Estudos por espectroscopia no UV-Vis

A espectroscopia de absorção no UV-Vis tem sido utilizada para a análise da interação de compostos bioativos e DNA a partir do monitoramento das propriedades de absorção do analito de interesse ou do próprio DNA. Quando a interação entre estes ocorre, mudanças na intensidade da absorvência (efeito hipercrômico ou hipocrômico) e deslocamento da banda de absorção máxima (deslocamento batocrômico ou hipsocrômico) podem ser observadas (SHAHABADI; HEIDARI, 2012; SIRAJUDDIN et al., 2013). Neste contexto, a investigação da interação da bergenina na forma livre e complexada com  $\beta$ -CD nas proporções 1:1 e 1:2 com DNA foi realizada, a fim de detectar a força de ligação e, assim predizer o modo de ligação entre eles, bem como verificar a influência da  $\beta$ -CD no processo de interação.

Os estudos espectrofotométricos do efeito da bergenina em dsDNA (calf thymus) foram realizados, e então comparados aos dados da investigação eletroquímica. Para este experimento, a concentração de DNA foi fixada (85 µmol L<sup>-1</sup>) em solução tampão Tris-HCl contendo 10% (v/v) de etanol e, posteriormente tratada com diferentes concentracões de bergenina (0,8 - 3,2 µmol L<sup>-1</sup>) (Figura 44). A Figura 44b apresenta o espectro UV-Vis obtido para bergenina livre, dsDNA livre e do complexo formado entre bergenina e DNA mostrando que a absorvência da bergenina livre é muito inferior a intensidade de absorvência apresentada pelo dsDNA livre, implicando que o aumento de intensidade de absorvência refere-se à consequência da interação com DNA, e não sobreposição de valores de absorvência.

O espectro UV-Vis da bergenina nas condições acima citadas mostrou comprimentos de onda máximo ( $\lambda_{max}$ ) em 217, 273 e 316 nm (Figura 44a e b). Os valores encontrados estão em concordância com a literatura ( $\lambda_{max/metanol}$  215, 274 e 315 nm) (LATIP et al., 2011). Com o aumento da concentração de bergenina observou-se um efeito hipercrômico na banda em 260 nm (Figura 44a), sendo atribuído a exposição das bases a irradiação (JANJUA et al., 2009; HEGDE et al., 2012).

A constante de ligação ( $K_{DS}$ ) do complexo bergenina-DNA foi obtida pela aplicação da equação de Benesi-Hildebrand para banda de 260 nm, conforme descrito por Agarwal e cols (2013):

$$\frac{l}{\Delta A} \rightarrow \frac{1}{D_t K_{DS} \Delta \varepsilon_{DS} [S]} + \frac{1}{D_t \Delta \varepsilon_{DS}}$$

Assumindo que *l* é o caminho óptico (1 cm),  $D_t$  é a concentração de DNA total,  $\Delta \varepsilon_{DS}$  é a absortividade molar da interação do complexo, [S] é a concentração do analito e,  $K_{DS}$  é a constante de estabilidade para a formação do complexo.

Uma relação linear dos dados experimentais foi obtida em função do gráfico de 1/ $\Delta$ A *versus* 1/[bergenina] (Figura 44c) foi obtida, sendo possível estimar a constante de ligação entre bergenina e dsDNA ( $K_{DS}$  = 4,97 x 10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup>).

Figura 44 – Espectro de absorção UV-Vis de dsDNA (84,8  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>) em solução etanólica (10% v/v) tamponada (Tris-HCI) na ausência e na presença de concentrações crescentes de bergenina (0,8 – 3,2  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>) (a e b). Gráfico de 1/ $\Delta$ A versus 1/[bergenina] (c).



Fonte: AUTORA, 2015.

As constantes de ligação da  $\beta$ -CD (Figura 45) e do complexo bergenina: $\beta$ -CD nas proporções 1:1 (Figura 46) e 1:2 (Figura 47) com dsDNA também foram obtidas em condição similar a bergenina (solução etanólica (10% v/v) tamponada (Tris-HCI)), ou seja, a concentração do DNA foi mantida constante e concentrações crescente de cada analito foram analisadas, sendo a faixa de concentração utilizada em cada caso, descritas na Tabela 21.

## Figura 45 – Espectro de absorção UV-Vis de dsDNA (98 µmol L<sup>-1</sup>) em solução etanólica (10% v/v) tamponada (Tris-HCI) na ausência e na presença de concentrações crescentes de $\beta$ -CD (1,6 – 4,8 µmol L<sup>-1</sup>) (a e b). Gráfico de 1/ $\Delta$ A versus 1/[ $\beta$ -CD] (c).



Fonte: AUTORA, 2015.

Figura 46 – Espectro de absorção UV-Vis de dsDNA (98  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>) em solução etanólica (10% v/v) tamponada (Tris-HCI) na ausência e na presença de concentrações crescentes do complexo bergenina: $\beta$ -CD 1:1 (2,0 – 4,4  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>) (a e b). Gráfico de 1/ $\Delta$ A versus 1/[bergenina: $\beta$ -CD 1:1] (c).



Fonte: AUTORA, 2015.

Figura 47 – Espectro de absorção UV-Vis de dsDNA (98  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>) em solução etanólica (10% v/v) tamponada (Tris-HCl) na ausência e na presença de concentrações crescentes do complexo bergenina: $\beta$ -CD 1:2 (2,8 – 6,4  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>) (a e b). Gráfico de 1/ $\Delta$ A versus 1/[bergenina: $\beta$ -CD 1:2] (c).



Fonte: AUTORA, 2015.

A constante de ligação obtida para bergenina (4,97 x  $10^3$  M<sup>-1</sup>) em função da interação com dsDNA sugere uma interação fraca. Já o valor da constante obtida para o complexo bergenina: $\beta$ -CD nas proporções 1:1 e 1:2 encontraram-se na ordem de  $10^4$ , sugerindo que a interação com o DNA ocorre entre as fendas da estrutura do DNA (SHAHABADI; HEIDARI, 2014). A constante de ligação da  $\beta$ -CD com dsDNA foi obtida na ordem de  $10^5$ , caracterizando-se como interação forte, o que corrobora com os resultados obtidos, qualitativamente, por VPD utilizando ssDNA.

Composto	$D_t$	[ amostra] (umol I <sup>-1</sup> )	Equação da reta	r	$K_{DS}$
Bergenina	85	0,8 a 3,2	y = 0,24470 + 49,2290x	0,99983	4,97 x 10 <sup>3</sup>
β-CD	98	1,6 a 4,8	y = 14,2181 + 25,8427x	0,99287	5,50 x 10 <sup>5</sup>
Complexo 1:1	98	2,0 a 4,4	y = 1,7935 + 105,5651x	0,99446	1,69 x 10⁴
Complexo 1:2	98	2,8 a 6,4	y = 3,4667 + 54,1596x	0,99977	6,40 x 10 <sup>4</sup>

Tabela 21 – Constante de ligação ( $K_{DS}$ ) obtida para a interação do complexo bergenina: $\beta$ -CD nas proporções 1:1 e 1:2 com dsDNA.

Fonte: AUTORA, 2015.

É importante destacar que quanto maior a constante de ligação (K<sub>DS</sub>), maior é a energia associada às interações supramoleculares. Neste caso, os estudos envolvendo bergenina na forma livre e complexada com β-CD, até então realizados, apontam um panorama da sua importância como biocomposto, e reforça a importância da CD como molécula hospedeira que permite a formação de complexos supramoleculares capazes de influenciar as propriedades físico-químicas de substâncias bioativas.

### 5.2 Parte II

Nesta seção serão descritos os resultados obtidos durante os ensaios eletroquímicos dos dez derivados nitrobenzílicos em estudo (ENM, ENF, EANBEN, ANBNa, EANB, AANB, ATN, , ANOH, ANB, e ANF) (Figura 1; Tabela 11) em meio aprótico, a fim de propor seus mecanismos de redução e correlacionar os parâmetros eletroquímicos obtidos com os ensaios de atividade biológica já descritos na literatura (LOPES et al., 2011, 2015).

5.2.1 Estudos eletroquímicos em meio aprótico

A determinação de potenciais de redução, especialmente aqueles relacionados à primeira captura de elétrons (*E*p<sub>c</sub>), fornece dados importantes para avaliar uma variedade de propriedades termodinâmicas de cátions orgânicos ou ânions radicais, bem como, auxiliar na compreensão de processos químicos e biológicos (ÁLVAREZ-GRIERA et al., 2009).

É importante salientar que para um processo de redução, substituintes eletrorretiradores diminuem a energia do LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) facilitando assim a transferência de elétrons do eletrodo para o grupamento eletroativo. Já substituintes eletrodoadores aumentam a energia do LUMO, dificultando a transferência para esse orbital. Por outro lado, a oxidação envolve o HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) e os substituintes influenciam a reação eletródica na direção oposta, uma vez que os substituintes eletrodoadores facilitam o processo de oxidação por aumentar a densidade eletrônica no orbital, enquanto os eletrorretiradores a dificultam (DE ABREU et al., 1999, 2002).

O comportamento eletroquímico dos derivados nitrobenzílicos estudados apresentou-se muito complexo, como observado nos voltamogramas cíclicos obtidos em meio aprótico (DMF/TBABF<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>) mostrados na Figura 48. Em todos os casos, o grupo nitro é o primeiro a sofrer redução, embora as etapas subsequentes possam variar de acordo com os substituintes na posição benzílica.

## Figura 48 – Voltamogramas cíclicos em meio aprótico (DMF/TBABF<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>) dos derivados nitrobenzílicos. Eletrodo de CV. $\nu$ = 100 mV s<sup>-1</sup>.

(continua)



### Figura 48 – Voltamogramas cíclicos em meio aprótico (DMF/TBABF<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>) dos derivados nitrobenzílicos. Eletrodo de CV. $\nu$ = 100 mV s<sup>-1</sup>.



(conclusão)

Fonte: AUTORA, 2015.

Para facilitar a compreensão do mecanismo de redução dos derivados nitrobenzílicos em estudo, estes foram divididos em grupos em função da proposta mecanística sugerida, como mostra a Tabela 22.

O comportamento voltamétrico obtido para o composto ENM (Figura 48a), único integrante do grupo 1, apresentou grande complexidade, ao passo que esperava-se obter um perfil eletroquímico típico de redução de grupo nitro em meio aprótico, constituído de duas ondas catódicas, sendo a primeira de natureza reversível e a segunda, irreversível, como mostra o mecanismo descrito na Figura 49. Contudo, é importante ressaltar a reversibilidade da primeira etapa de redução do grupo nitro com *E*pla em -0,95 V e verificar a presença de produtos de redução estendida a partir do ânion radical gerado na primeira etapa de redução (Figura 50). Tabela 22 – Compostos nitrobenzílicos estudados em função dos mecanismos de redução propostos.



Composto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Figura 48	Grupo	Mecanismo sugerido
ENM	OCH <sub>3</sub>	Н	а	1	Miscelânio
EANBEN	OCH <sub>3</sub>	Br	С		
EANB	NH(CH <sub>2</sub> )OH	Br	е	2	TED*
AANB	NH(CH <sub>2</sub> )OH	CI	f		
ATN	OH	Н	g	3	Autoprotopação
ANOH	OH	OH	ĥ	5	Adiopiotonação
ANB	OH	Br	i	Λ	
ENF	OCH <sub>3</sub>	F	b	4	
ANF	OH	F	j		
ANBNa	O⁻Na⁺	Br	d	5	Atípico

\*TED: Transferência de elétrons dissociativa.

Fonte: AUTORA, 2015.

### Figura 49 – Mecanismo típico de redução de nitrocompostos em meio aprótico.

ArNO<sub>2</sub> 
$$\xrightarrow{1e^-}$$
 ArNO<sub>2</sub>  
ArNO<sub>2</sub>  $\xrightarrow{3e^-, 4H^+}$  ArNHOH + H<sub>2</sub>O

Fonte: AUTORA, 2015.

Figura 50 – Voltamogramas cíclicos e mecanismo de redução proposto para o composto ENM em meio aprótico.



Os compostos EANBEN, EANB e AANB fizeram parte do grupo 2 por apresentar em  $R_1$  um substituinte (éter ou amina) e em  $R_2$  um substituinte halogenado (-Br ou -Cl). O perfil voltamétrico dos compostos do grupo 2 (Figura 51) aponta a presença de uma onda de caráter irreversível, em potencial mais positivo que o composto ENM (-1,021 V), destacando-se a importância do grupo haleto no processo de redução.

O mecanismo, portanto, é padrão para uma reação de transferência de elétrons dissociativa, conforme Figura 52. Neste caso, ocorre redução monoeletrônica do grupo nitro, com transferência do elétron para a posição benzílica, contendo o substituinte haleto (-Br ou -CI), seguindo-se a quebra da ligação carbono-halogênio (C-X), liberando o haleto, com geração de um radical benzílico. Esse pode sofrer uma série de reações, explicando a complexidade do perfil voltamétrico.



Figura 51 – Voltamogramas cíclicos dos compostos EANBEN (a e b), EANB (c e d) e AANB (e e f) pertencentes ao grupo 2 em meio aprótico.

Fonte: AUTORA, 2015.

Figura 52 – Esquema mecanístico de transferência de elétrons dissociativa proposto para os haletos benzílicos do grupo 2.



Fonte: Adaptado de Álvarez-Griera et al., 2009.

A Figura 53 mostra os voltamogramas obtidos para os compostos ATN e ANOH (grupo 3). Estes possuem substituinte hidroxila (-OH) em R<sub>1</sub> (ATN e ANOH) e apresentaram mecanismo redox relacionado à autoprotonação (Figura 54), mecanismo típico já descrito na literatura para derivados nitrobenzílicos com substituinte ácido carboxílico em posição *meta*.

# Figura 53 – Voltamogramas cíclicos dos compostos ATN (a e b) e ANOH (c e d) pertencentes ao grupo 3 em meio aprótico.



Fonte: AUTORA, 2015.

Figura 54 – Mecanismo típico de autoprotonação observado para os compostos do grupo 3 (ATN e ANOH).



Resumindo: equação geral para  $Epc_1$ 5 HCOO $-R-NO_2$  + 4e  $\rightarrow$  HCOO-R-NHOH + 4-OOC $-R-NO_2$ 

Fonte: AUTORA, 2015.

Os compostos ANB e ANF constituiram o grupo 4, pois apresentaram padrões de substituição inerentes ao processo de transferência de elétrons dissociativa e de autoprotonação. O perfil voltamétrico dos compostos citados (Figura 55) revela a influência do mecanismo de autoprotonação na redução do grupo nitro e no processo de transferência de elétrons dissociativa, o que faz o composto ANB ser o mais facilmente redutível (-0,604 V) da série.

É importante ressaltar que o composto ENF também foi inserido neste grupo a fim de compara-lo com seu derivado ácido carboxílico. Entretanto, o perfil voltamétrico dos compostos ENF e ANF (Figura 55) apresentaram baixa tendência de eliminação, sendo o primeiro aquele que exibiu perfil voltamétrico parecido com de transferência de elétrons dissociativa.

O composto ANBNa é o único representante do grupo 5 (Figura 56). Ele apresentou um perfil voltamétrico atípico, pois se esperava obter um voltamograma característico de grupo nitro em meio aprótico, constituído de duas ondas catódicas, sendo a primeira de natureza reversível e a segunda, irreversível. Contudo, o perfil eletroquímico obtido em DMF apontou quatro ondas de redução, sendo a primeira e a quarta onda catódica de natureza irreversível e a segunda e a tarceira, reverssíveis.

.



## Figura 55 – Voltamogramas cíclicos dos compostos ANB (a e b), ENF (c e d) e ANF (e e f) pertencentes ao grupo 4 em meio aprótico.

Fonte: AUTORA, 2015.



Figura 56 – Voltamogramas cíclicos do composto ANBNa (grupo 5) em meio aprótico.

Fonte: AUTORA, 2015.

5.2.2 Correlação dos parâmetros eletroquímicos obtidos com atividade biológica

O perfil voltamétrico apresentado para os derivados nitrobenzílicos, em meio aprótico, segue padrões relacionados a reações de auto-protonação e de transferência de elétrons dissociativa, sendo a ordem de facilidade de redução encontrada: ANB > EANBEN > EANB > AANB > ANOH > ATN = ENF > ANBNa > ENM > ANF.

Ao correlacionar a ordem de facilidade de redução dos derivados nitrobenzílicos estudados com as atividades biológicas descritas na literatura (Tabela 23), foi possível observar que aqueles que apresentaram maior facilidade de redução (ANB, EANBEN, EANB e AANB) demostraram atividade leishmanicida e antitumoral mais promissora quando comparados aos que apresentaram potenciais de redução mais negativos.

Conforme descrito por Lopes e cols (2011), dos compostos estudados, três (EANBEN, EANB e AANB) exerceram significativa atividade leishmanicida *in vitro* contra as formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*. Estudos de citotoxicidade *in vitro* também demonstraram que o composto AANB, o mais promissor agente leishmanicida da série, não afetou a proliferação de linfócitos em PBMC, indicando baixa toxicidade para as células humanas.

Lopes e cols (2015) descreveram a atividade antitumoral de sete derivados nitrobenzílicos em estudo foi reportada frente a três linhagens de células humanas

cancerosas: HL-60 (leucemia promielocítica humana), Jurkat (leucemia de células T humana) e MCF-7 (carcinoma mamário), onde verificou-se que os agentes mais promissores foram os compostos EANBEN, EANB, AANB e ANB, que apresentaram os menores valores de *E*p<sub>lc</sub>, ou seja, maior facilidade de redução. Outra característica observada, é que tais compostos possuem na posição benzílica um grupo fortemente abandonador (brometo ou cloreto), indicando que o mecanismo de ação destes compostos pode estar relacionado com suas propriedades alquilantes. Contudo, entre os compostos avaliados, o AANB apresentou efeito antitumoral significativo *in vivo* em estudos envolvendo tumor sólido de Ehrlich em ratos, conforme descrito em Lopes e cols (2015).

Assim, ao correlacionar os dados de atividade biológica propostos na literatura com o potencial de primeira onda catódica dos compostos supracitados, verificou-se uma correlação positiva entre aqueles que apresentaram maior facilidade de redução (potencial de redução menos negativo) e a atividade biológica (atividade leishmanicida e antitumoral) já descrita na literatura.

Assim, destaca-se a importância da eletroquímica como ferramenta útil para o desenvolvimento da química medicinal, visto que esta técnica pode atuar direcionando a síntese de biocompostos mais promissores, já que o potencial redox é uma variável importante que se relaciona com sistemas biológicos.

Estudos de ressonância do spin do elétron também foram realizados para os supracitados, entretanto, devido à instabilidade compostos dos radicais eletrogerados e dificuldade de realização de experimentos em alta velocidade de varredura, os parâmetros cinéticos não puderam ser obtidos. Estudos em meio prótico também foram iniciados, porém a superfície do eletrodo de carbono vítreo foi alterada, provavelmente devido à ocorrência do processo denominado grafting, fazendo-se reconsiderar a reatividade de radicais livres eletrogerados capazes de formar ligação covalente em superfície de carbono vítreo (MORITA et al., 2011; POIZOT et al., 2012). O processo de grafting está relacionado com o mecanismo de transferência eletrônica dissociativa, onde os sistemas químicos estão susceptíveis a sofrer quebra da ligação sigma C-halogênio (ANTONELLO; MARAN, 2005; MARAN; WORKENTIN, 2002; BEL et al., 2005).
Tabela 23 – Potenciais de redução da primeira onda catódica (*E*plc) dos derivados nitrobenzílicos estudados em meio aprótico (DMF/TBABF<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>); eletrodo de CV;  $\nu$  = 100 mV s<sup>-1</sup> e correlação com suas atividades leishmanicida e citotóxica (CI<sub>50</sub> µmol L<sup>-1</sup>±DP) já descritas por Lopes e cols (2011; 2015).



Composto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Figura 46	- <i>E</i> p <sub>ic</sub> (V)	- <i>E</i> p <sub>la</sub> (V)	Atividade leishmanicida	Proliferação PBMC*	HL-60	Jurkat	MCF-7	VERO
ENM	OCH <sub>3</sub>	Н	а	1,021	0,95			>100	>100	>100	>100
ENF	OCH₃	F	b	0,874							
EANBEN	OCH <sub>3</sub>	Br	С	0,717		39,3±5	44,1±13	20,2±3,9	17,7±3,5	39,6±11,4	17,4±4,9
ANBNa	O⁻Na⁺	Br	d	0,918							
EANB	NH(CH <sub>2</sub> )OH	Br	е	0,727		23,1±0,5	53,9±13	15,2±3,5	60,4±27	31,4±10,4	29,1±0,5
AANB	NH(CH <sub>2</sub> )OH	CI	f	0,735		59,5±6	959,5±98	4,7±0,8	18,0±10	70,0±12,9	25,3 <b>±</b> 2,3
ATN	ОН	Н	g	1,021				>100	>100	>100	>100
ANOH	OH	OH	h	0,847		>100	ND	>100	>100	>100	>100
ANB	ОН	Br	i	0,604		>100	344,2±96	77,4±12,9	71,7±4,4	28,5±4,1	>100
ANF	OH	F	j	1,044							
Benznidazol											
Anfotericina E	3					0,9±0,01					
Etoposídio								8,3 ±1,0	3,8 ±1,6	>100	>100

(----): não realizado. - - -: não obtido. \*PBMC = células mononucleares de sangue periférico.

Fonte: AUTORA, 2015.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados eletroquímicos obtidos para bergenina, em carbono vítreo, permitiram concluir que seu mecanismo oxidativo, em meio aprótico, envolve a perda de 1e<sup>-</sup>/1H<sup>+</sup>, com provável formação dimérica. Já em meio prótico, 2e<sup>-</sup>/2H <sup>+</sup> estão envolvidos no processo. Os dados teóricos contribuiram para esclarecer que os mecanismos oxidativos proposto envolvem as hidroxilas fenólicas.

Os estudos envolvendo a complexação da bergenina com β-CD promoveram o aumento da solubilidade em meio aquoso, o que refletiu no ganho de atividade antioxidante, verificada através dos ensaios de lipoperoxidação. A interação com β-CD também influenciou os resultados obtidos para viabilidade celular em macrófagos, bem como nos estudos envolvendo ssDNA, demonstrando que a bergenina interage com as bases nitrogenadas guanina e adenina do DNA, podendo esta interação estar relacionada ao mecanismo de ação biológico da bergenina.

Contudo, via investigação em ssDNA, o efeito da interação com  $\beta$ -CD provocou a diminuição da interação com as bases guanina e adenina, indicando redução dos danos ao DNA. Já os estudos em biossensor de dsDNA, demonstraram que a ausência de interação com dsDNA descarta seu mecanismo como intercalante, visto que, na presença da bergenina livre e complexada, não ocorreu exposição das bases do dsDNA. A investigação da interação com dsDNA através da espectrofotometria UV-Vis resultou numa constante de ligação entre DNA e bergenina na forma livre e complexada na ordem de  $10^3$  e  $10^4$  M<sup>-1</sup>, respectivamente. O valor de  $K_{DS}$  (4,97 x  $10^3$  M<sup>-1</sup>) sugere interação fraca da bergenina com dsDNA, corroborando os ensaios em biossensor de dsDNA.

Já os resultados obtidos para os derivados nitrobenzílicos revelaram um perfil voltamétrico de grande complexidade, em meio aprótico, envolvendo padrões relacionados a reações de autoprotonação e de transferência de elétrons dissociativa. A ordem de facilidade de redução encontrada foi ANB > EANBEN > EANB > AANB > ANOH > ATN = ENF > ANBNa > ENM > ANF, sendo verificada uma correlação positiva dos quatro compostos com maior potencial de redução (menos positivos) com os dados de atividade leishmanicida e antitumoral já descritos na literatura, o que justifica a investigação eletroquímica de compostos bioativos como ferramenta em química medicinal.

## 7 PERSPECTIVAS

- ✓ Elucidar a estrutura do produto da eletrólise da bergenina em potencial controlado;
- ✓ Determinar a constante de formação do complexo bergenina:β-CD via espectrofotometria UV-Vis;
- ✓ Determinar a constante de ligação da bergenina na forma livre e complexada com β-CD com o dsDNA por espectrofluorimetria;
- ✓ Realizar análises de RNM bidimensionais a fim de comprovar a interação entre bergenina e β-CD.
- ✓ Verificar a interação dos nitrocompostos mais promissores (EANBEN, EANB, AANB E ANB) com DNA via eletroquímica e espectrofotometria UV-Vis.

## REFERÊNCIAS

ABREU, F. C. et al. Some applications of electrochemistry in biomedical chemistry. Emphasis on the correlation of electrochemical and bioactive properties. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 1, p. 19–35, 2002a.

\_\_\_\_\_. et al. Detection of the damage caused to DNA by niclosamide using an electrochemical DNA-biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, n. 17, p. 913–919, 2002b.

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

\_\_\_\_\_. et al.Cathodic reduction of 2-nitronaphthothiophen-4,9-quinone: evidence of catalysis by proton donors and its simulation. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 462, p. 195–201, 1999.

ABREU, H. A. et al. Antioxidant activity of (+)-bergenin: a phytoconstituent isolated from the bark of *Sacoglottis uch*i Huber (Humireaceae). **Organic & biomolecular chemistry**, v. 6, p. 2713–2718, 2008.

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

\_\_\_\_\_. et al. The most potent antilithiatic agent ameliorating renal dysfunction and oxidative stress from Bergenia ligulata rhizome. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 158, p. 85–93, 2014.

ALEGRIA, A. E. et al. Reductive activation and thiol reactivity of benzazolo[3,2-a]quinolinium salts. **Toxicology**, v. 199, p. 87–96, 2004.

ALMEIDA, M. O. et al. Medicinal electrochemistry: integration of electrochemistry, medicinal chemistry and computational chemistry. **Current medicinal chemistry**, v. 21, p. 2266–75, 2014.

ÁLVAREZ-GRIERA, L. et al. Estimation of nitrobenzyl radicals reduction potential using spectro-electrochemical techniques. **Electrochimica Acta**, v. 54, p. 5098–5108, 2009.

AMATORE, C. et al. Supramolecular effects of cyclodextrins on the electrochemical reduction and reactivity of aromatic carbonyl compounds. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 621, p. 134–145, 2008.

ANDRES, T. et al. Voltammetry of nitrobenzene with cysteine and other acids in DMSO. Implications for the biological reactivity of reduced nitroaromatics with thiols. **Electrochimica Acta**, v. 92, p. 257–268, 2013.

ANTONELLO, S.; MARAN, F. Intramolecular dissociative electron transfer. **Chemical Society reviews**, v. 34, p. 418–428, 2005.

ARAKI, K.; TOMA, E. Química de sistemas supramoleculares constituídos por porfirinas e complexos metálicos, **Química nov**a, v. 25, n. 6, p. 962–975, 2002.

ARAÚJO, M. V. G, DE. Química supramolecular: compostos de inclusão de pirimetamina e sulfadiazina em hidroxipropil-β-ciclodextrina. Dissertação (Mestrado em Química) – Núcleo de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Sergipe, 2007.

AYALA, A. et al. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, 2014.

BAJRACHARYA, G. B. Diversity, pharmacology and synthesis of bergenin and its derivatives: Potential materials for therapeutic usages. **Fitoterapia**, v. 101, p. 133–152, 2015.

BASILI, S. et al. Relationship between the structure and the DNA binding properties of diazoniapolycyclic duplex- and triplex-DNA binders: Efficiency, selectivity, and binding mode. **Biochemistry**, v. 46, p. 12721–12736, 2007.

BEL, A. et al. Electron transfer to sulfides: Heterogeneous kinetics, CS bond cleavage, and self-protonation. **Electrochimica Acta**, v. 50, p. 1207–1215, 2005.

BENIGNI, R.; BOSSA, C. Mechanisms of chemical carcinogenicity and mutagenicity: A review with implications for predictive toxicology. **Chemical Reviews**, v. 111, p. 2507–2536, 2011.

BENNER, K. et al. Selective stabilization of abasic site-containing DNA by insertion of sterically demanding biaryl ligands. **Chemistry - A European Journal**, v. 20, p. 9883–9887, 2014.

BENZIE, I. F. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. International Journal Food Sciences and Nutrition, v. 47, p. 233–261, 1996.

BIANCHI, M. D. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123–130, 1999.

BOISSELIER, E.; ASTRUC, D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. **Chemical Society reviews**, v. 38, n. 6, p. 1759–1782, 2009.

BOLLO, S. et al. The effect of 5-substitution on the electrochemical behavior and antitubercular activity of PA-824. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 2, p. 812–817, 2011.

\_\_\_\_\_. et al. Electrochemical study of 4-substituted analogues of megazol. **Electroanalysis**, v. 17, p. 134–139, 2005.

BORGES, J. C. M. et al. Antinociceptive activity of acetylbergenin in mice. Latin American Journal of Pharmacy, v. 30, n. 7, p. 1303–1308, 2011.

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

\_\_\_\_\_. et al. In: **Comprehensive chemical kinetics**, Elsevier: Amsterdam, v. 37, p. 91–119, 1999.

BRETT, C. M. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications, Oxford, 1993.

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

BUDAL, R. M. Estudos de formação de complexos de inclusão em ciclodextrinas. Tese (Doutorado em Química Orgânica) Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

BUORO, R. M. et al. *In situ* evaluation of gemcitabine-DNA interaction using a DNAelectrochemical biosensor. **Bioelectrochemistry**, v. 99, p. 40–45, 2014.

BUSSY, U. et al. Phase I and phase II reductive metabolism simulation of nitro aromatic xenobiotics with electrochemistry coupled with high resolution mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, p. 7253–7260, 2014.

CATALÁN, M. et al. Electrochemistry of interaction of 2-(2-nitrophenyl)benzimidazole derivatives with DNA. **Bioelectrochemistry**, v. 79, n. 2, p. 162–167, 2010.

CERQUEIRA, F. M. et al. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 441–449, 2007.

CHAUHAN, R. et al. Secondary metabolites found in *Bergenia* species: a compendious review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 1, p. 9–16, 2013.

CHEN, J. et al. Electrochemical study of bergenin on a poly(4-(2-pyridylazo)resorcinol) modified glassy carbon electrode and its determination in tablets and urine. **Talanta**, v. 72, p. 1805–1810, 2007.

CHEN, M. et al. β-Cyclodextrin polymer functionalized reduced-graphene oxide: Application for electrochemical determination imidacloprid. **Electrochimica Acta**, v. 108, p. 1–9, 2013.

\_\_\_\_\_\_. et al. Preparation and characterization water-soluble inclusion complexes of imidacloprid-β-cyclodextrin polymer and their electrochemical behavior. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 696, p. 1–8, 2013.

CHEN, Z. et al. Studies on the chemical constituents and anticancer activity of Saxifraga stolonifera (L) Meeb. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 1337–1344, 2008.

CHEN, S-M; CHEN, S-V. The interaction of water-soluble iron porphyrins with DNA films and the electrocatalytic properties for inorganic and organic nitro compounds. Electrochimica Acta, n. 48, p. 4049–4060, 2003.

CHUNG M. C. et al. A Prodrug approach to improve the physico-chemical properties and decrease the genotoxicity of nitro compounds. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 32, p. 3515–3526, 2011.

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

CHRISTIAN, G. D.; PURDY, W. C. Residual current in orthophosphate medium. **Journal Electrochemistry Chemistry**, v. 3, n. 6, p. 4899-4907, 1962.

CUNHA FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRETO, L. C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 34, p. 1–9, 2007.

CZELUSNIAK, K. E. et al. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: Revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, p. 400–409, 2012.

DAVIS M. E.; BREWSTER M. E. Cyclodextrin-based pharmaceutics: past, present and future. **Nature Review**, v. 3, p. 1023–1035, 2004.

DA SILVA, L. L. et al. Investigação eletroquímica e calorimétrica da interação de novos agents a ntitumorais biscatiônicos com DNA. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1318–1324, 2012.

DENTUTO, P. L. et al. Photophysical and electrochemical properties of chlorophyll  $\alpha$ -cyclodextrins complexes. **Bioelectrochemistry**, v. 63, p. 117–120, 2004.

DEWAR, M. J. S.; THIEL, W. Ground states of molecules. The MNDO method. Approximations and parameters. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 99, n. 5, p. 4899–4907, 1977.

DOGAN-TOPAL, B.; OZKAN, S. A. Electrochemical determination of anticancer drug fulvestrant at dsDNA modified pencil graphite electrode. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 12, p. 4433–4438, 2011.

\_\_\_\_\_\_. 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. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 2358–2364, 2009.

DOLATABADI, J. E. N. Molecular aspects on the interaction of quercetin and its metal complexes with DNA. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 2, p. 227–233, 2011.

\_\_\_\_\_. KASHANIAN, S. A review on DNA interaction with synthetic phenolic food additives. **Food Research International**, v. 43, n. 5, p. 1223–1230, 2010.

\_\_\_\_\_. et al. Optical and electrochemical DNA nanobiosensors. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 3, p. 459–472, 2011.

DOMÉNECH-CARBÓ, A. et al. DsDNA, ssDNA, G-quadruplex DNA, and nucleosomal DNA electrochemical screening using canthin-6-one alkaloid-modified electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 115, p. 546–552, 2014.

DICULESCU, V. C. et al. Electrochemical DNA sensors for detection of DNA damage. **Sensors**, v. 5, 377–393, 2005.

EL-BELTAGI, H. S.; MOHAMED, H. I. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and antioxidative defense mechanism. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanic Chij-Napoca**, v. 41, n. 1, p. 44–57, 2013.

FERREIRA, F. D. R. et al. Antioxidant activity of the mangiferin inclusion complex with  $\beta$ -cyclodextrin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 129–134, 2013.

FERREIRA, F. R. **Emprego de técnicas avançadas em estudos bioeletroquímicos de substâncias de interesse biológico**. Tese de doutorado, Universidade Federal de Alagoas, 2013, 151p.

FILIPPA, M. et al. Encapsulation of methyl and ethyl salicylates by  $\beta$ -cyclodextrin. HPLC, UV-vis and molecular modeling studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p. 969–973, 2008.

FRISCH, M. J. et al. Gaussian 09, Revision A.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

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

GANGWAR, M. et al. *Mallotus philippinensis* Muell. Arg (Euphorbiaceae): ethnopharmacology and phytochemistry review. **BioMed Research Internationa**l, v. 2014, p. 1–13, 2014.

GAO, X. et al. Bergenin plays an anti-inflammatory role via the modulation of MAPK and NF-κB signaling pathways in a mouse model of LPS-induced mastitis. **Inflammation**, v. 38, n. 3, p. 1142–1150, 2014.

GIACALONE, F. et al. Cyclodextrin-[60]fullerene conjugates: synthesis, characterization, and electrochemical behavior. **Tetrahedron Letters**, v. 47, p. 8105–8108, 2006.

GÓRNAS, P. et al. Beta-cyclodextrin complexes with chlorogenic and caffeic acids from coffee brew: Spectroscopic, thermodynamic and molecular modelling study. **Food Chemistry**, v. 114, p. 190–196, 2009.

GUBICA, T. et al. The influence of native and methylated  $\beta$ -cyclodextrin on the electroreduction of nitrophenyl glycosides. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 699, n. 2, p. 40–47, 2013.

GUEDES, F. D. L. et al. Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos. **Rev. Bras. Farm**, v. 89, n. 3, p. 220–225, 2008.

GUPTA, V.; SHARMA, S. Plants as natural antioxidants. **Indian Journal of Natural Products and Resources (IJNPR)**, v. 5, n. 4, p. 326–334, 2006.

GUTOWSKI, M.; KOWALCZYK, S. A study of free radical chemistry: Their role and pathophysiological significance. **Acta Biochimica Polonica**, v. 60, n. 1, p. 1–16, 2013.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, n. 4, p. 561–564, 2010.

HABTEMARIAM, S.; COWLEY, R. A. Antioxidant and anti-α -glucosidase compounds from the rhizome of peltiphyllum peltatum (Torr.) Engl. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 11, p. 1656–1660, 2012.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants - Quo vadis? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 3, p. 125–130, 2011.

\_\_\_\_\_. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 5, p. 257–265, 2012.

HEDGES A. R. Industrial Applications of Cyclodextrins. **Chemistry Review**, v. 98, p. 2035–2044, 2005.

HEGDE, A. H. et al. Interaction of antioxidant flavonoids with calf thymus DNA analyzed by spectroscopic and electrochemical methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 63, p. 40–46, 2012.

HELI, H. et al. An electrochemical study of neutral red–DNA interaction. **Electrochimica Acta**, v. 51, p.1108–1116, 2005.

HILLARD, E. A. et al. Electrochemical parametrs and techniques in drug development, with an emphasis on quinonoes and related compounds. **Chemistry Communications**, v. 23, p. 2612–2628, 2008.

HIRLEKAR, R.; KADAM, V. Preformulation study of the inclusion complex irbesartanbeta-cyclodextrin. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 1, p. 276–281, 2009. HOLT, J. S. Structural characterization of the Brooker's merocyanine/ $\beta$ -cyclodextrin complex using NMR spectroscopy and molecular modeling. **Journal of Molecular Structure**, v. 965, p. 31–38, 2010.

HONORIO, K. et al. Advances and applications of structure-based approaches in drug discovery. In: TAFT, C. A.; SILVA, C. H. T. P. **Current methods in medicinal chemistry and biological physics**. Research Signpost, 2008.

HROMADOVÁ, M. et al. Electrochemical evidence of host-guest interactions. Changes in the redox mechanism of fungicides iprodione and procymidone in the nano-cavity of cyclodextrins. **Microchemical Journal**, v. 73, p. 213–219, 2002.

HUANG, C. Z. et al. A spectrophotometric study on the interaction of neutral red with double-stranded DNA in large excess. **Talanta**, v. 55, p. 321–328, 2001.

HURLEY, L. H. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 188–200, 2002.

HUSSAIN, M. T. Synthesis of some biologically active naturally and nonnaturally occurring isocoumarins and 3,4-Dihydroisocoumarins (Tese) - Quaid-i-Azam University, Islamabad, 2000.

IHMELS, H.; OTTO, D. Intercalation of organic dye molecules into double-stranded DNA -- General principles and recent developments. **Supermolecular Dye Chemistry**, v. 258, p. 161–204, 2005.

JAHED, V. et al. NMR (1H, ROESY) spectroscopic and molecular modelling investigations of supramolecular complex of  $\beta$ -cyclodextrin and curcumin. **Food Chemistry**, v. 165, p. 241–246, 2014.

JANJUA, N. K. et al. Cyclic voltammetric investigation of interactions between bisnitroaromatic compounds and dsDNA. Journal of the Korean Chemical Society, v. 58, n. 2, p. 153–159, 2014.

\_\_\_\_\_. et al. Spectrophotometric analysis of flavonoid-DNA binding interactions at physiological conditions. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 74, p. 1135–1137, 2009.

JIMENEZ-ALONSO, S. et al. Design and synthesis of a novel series of pyranonaphthoquinones as topoisomerase II catalytic inhibitors. **Journal Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 6761–6772, 2008.

JULLIAN, C. et al. Characterization, phase-solubility, and molecular modeling of inclusion complex of 5-nitroindazole derivative with cyclodextrins. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 5078–5084, 2008.

KANO, K. et al. Electrochemical and the electron spin resonance study on the interaction between  $\alpha$ -cyclodextrin and the electrochemically generated radical intermediate of *p*-nitrophenolate anion. **Journal Electroanalytical Chemistry**, v. 283, p. 187–196, 1990.

KIM, M. H. et al. Anti-oxidative and anti-proliferative activity on human prostate cancer cells lines of the phenolic compounds from *Corylopsis coreana* Uyeki. **Molecules**, v. 18, p. 4876–4886, 2013.

KIM, H.-S. et al. Antihepatotoxic activity of bergenin, the major constituent of Mallotus japonicus, on carbon tetrachloride-intoxicated hepatocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 79–83, 2000.

KOVACIC, P.; SOMANATHAN, R. Nitroaromatic compounds: Environmental toxicity, carcinogenicity, mutagenicity, therapy and mechanism. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, p. 810–824, 2014.

\_\_\_\_\_. Mechanism of smell: Electrochemistry, receptors and cell signaling. **Journal** of Electrostatics, v. 70, n. 1, p. 1–6, 2012.

\_\_\_\_\_; HALL, M. E. Bioelectrochemistry, reactive oxygen species, receptors, and cell signaling: how interrelated? **Journal of receptor and signal transduction research**, v. 30, p. 1–9, 2010.

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

\_\_\_\_\_. OSUNA JR., J. A. Mechanisms of anti-cancer agents: emphais on oxidative stress an electron transfer. **Curr. Pharm. Des.**, v. 6, p. 277–309, 2000.

KUMAR, R. et al. Type 2 antidiabetic activity of bergenin from the roots of Caesalpinia digyna Rottler. **Fitoterapia**, v. 83, n. 2, p. 395–401, 2012.

LABUDA, J. et al. Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 82, n. 5, p. 1161–1187, 2010.

LA-SCALEA, M. A. et al. Eletrodos modificados com DNA: Uma nova alternativa em eletroanálise. **Quimica Nova**, v. 22, n. 3, p. 417–424, 1999.

LATIP, J. et al. Cytotoxic Oligostilbenoids from *Vatica odorata*. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, v. 5, n. 6, p. 113–118, 2011.

LEE, C. et al. Effect of  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrin on the electrochemistry of methylheptylviologen and dibenzylviologen. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 374, p. 115–121, 1994.

LEHN, J. M. Supramolecular chemistry. **Science (New York, N.Y.)**, v. 260, p. 1762–1763, 1993.

LI, J.; LOH, X. J. Cyclodextrin-based supramolecular architectures: Syntheses, structures, and applications for drug and gene delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 1000–1017, 2008.

LIANG, J. et al. In vivo and in vitro antimalarial activity of bergenin. **Biomedical reports**, v. 2, p. 260–264, 2014.

LIM, H.-K. et al. Protective effects of bergenin, the major constituent of Mallotus japonicus, on D-galactosamine-intoxicated rat hepatocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, p. 69–72, 2000.

LIMA, É. S. et al. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3, p. 294–303, 2001.

LIU, H. et al. Physicochemical characterizations of osthole- hydroxypropyl-βcyclodextrin inclusion complexes with high-pressure homogenization method. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 18, n. 6, p. 391–397, 2010.

LIU, M. et al. Improved solubility and stability of 7-hydroxy-4-methylcoumarin at different temperatures and pH values through complexation with sulfobutyl ether- $\beta$ -cyclodextrin. **Food Chemistry**, v. 168, p. 270–275, 2015.

LIU, N. N. et al. Synthesis and cytotoxic activities of novel bergenin derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, p. 4803–4813, 2014.

LOPES, M. S. et al. Synthesis of nitroaromatic compounds as potential anticancer agents. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 15 n. 2, p. 206–216, 2015.

\_\_\_\_\_. et al. Synthesis and evaluation of the antiparasitic activity of aromatic nitro compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 11, p. 5443–5447, 2011.

LU, X., WANG, J. Advances in the study of *Bergenia* plants. Journal of Chinese Medicinal Materials, v. 26, p. 58–60, 2003.

LUND, H.; HAMMERICH, O. **Organic electrochemistry**. 4 Ed., New York: Marcel Dekker, 2000.

MA, X.; ZHAO, Y. Biomedical applications of supramolecular systems based on host – guest interactions. **Chemical Review**, v. 115, n. 15, p. 7794–7839, 2015.

MADUKA, H. C. C. et al. The influence of Sacoglottis gabonensis stem bark extract and its isolate bergenin, Nigerian alcoholic beverage additives, on the metabolic and haematological side effects of 2,4-dinitrophenyl hydrazine-induced tissue damage. **Vascular Pharmacology**, v. 39, p. 317–324, 2002.

MADUSOLUMUO M. A.; OKOYE Z. S. C. Anticoagulant properties of bergenin from *Sacoglottis gabonensis* stem bark extract. **Medical Science Research**, v. 23, n. 7, p. 443–444, 1995.

MAGALHÃES, L. A. M. et al. Identificação de bergenina e carotenóides no fruto de uchi (*Endopleura uchi*, Humiriaceae). **Acta Amazonica**, v. 37, n. 3, p. 447–450, 2007.

MARAN, F.; WORKENTIN, M. S. Dissociative Electron Transfer. **The Electrochemical Society Interface**, p. 44–49, 2002.

MORITA, K. et al. Grafting of phenylboronic acid on a glassy carbon electrode and its application as a reagentless glucose sensor. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 656, p. 192–197, 2011.

PINTO, S. M. A. Estruturas tripodais e poliméricas porfirínicas supramoleculares. Coimbra: [s.n.], 2012. Tese de doutoramento.

MARTRE, A. M. et al. Electrochemistry in the presence of cyclodextrins - V. Asymmetric induction observed for dimerization of acetophenone in a non-aqueous medium. **Electrochimica Acta**, v. 36, n. 13, p. 1911–1914, 1991.

MCLAUGHLIN, C. K. et al. Supramolecular DNA assembly. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 12, p. 5647, 2011.

MILETIC, T. et al. Spray-dried voriconazole-cyclodextrin complexes: Solubility, dissolution rate and chemical stability. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 122–131, 2013.

MOHAMADI, M. at al. Voltammetric behavior of uric acid on carbon paste electrode modified with salmon sperm dsDNA and its application as label-free electrochemical sensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 54, p. 211–216, 2014.

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

MOSCOSO, R. et al. A simple derivatization of multiwalled carbon nanotubes with nitroaromatics in aqueous media : Modi fi cation with nitroso/ hydroxylamine groups. **Electrochemistry Communications**, v. 13, n. 2, p. 217–220, 2011.

MOUSTY, C. Sensors and biosensors based on clay-modified electrodes — new trends. **Applied Clay Science**, v. 27, p. 159–177, 2004.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 101, p. 238–250, 2014.

MURPHY, M. P. et al. Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. **Cell metabolism**, v. 13, p. 361–366, 2011.

NAGUIB, Y. M. A. A Fluorometric method for measurement of peroxyl radical scavenging activities of lipophilic antioxidants. **Analytical Biochemistry**, v. 265, p. 290–298, 1998.

NASSER, J. A. et al. Isolation of atranorin, bergenin and goniothalamin From *Hopea Sangal*. **ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences**, v. 4, n. 1, p. 92–95, 2009.

NAVA-VILLALBA, M. et al. Oxidative stress and chronic degenerative diseases - A role for antioxidants. **Biochemistry, genetics and molecular biology**, p. 317–328, 2013.

NAZIR, N. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of Bergenin and its derivatives obtained by chemoenzymatic synthesis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 2415–2420, 2011.

\_\_\_\_\_. et al. Immunomodulatory effect of bergenin and norbergenin against adjuvant-induced arthritis-A flow cytometric study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 401–405, 2007.

NIKI, E. Do antioxidants impair signaling by reactive oxygen species and lipid oxidation products? **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 586, n. 21, p. 3767–3770, 2012.

NUCHUCHUA, O. et al. Physicochemical investigation and molecular modeling of cyclodextrin complexation mechanism with eugenol. **Food Research International**, v. 42, n. 8, p. 1178–1185, 2009.

NUNOMURA, R. C. S. et al. Characterization of bergenin in *Endopleura uchi* bark and its anti-inflammatory activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1060–1064, 2009.

OCTAVIA, M. D. et al. Preparation of Simvastatin-β - cyclodextrin inclusion complexes using co-evaporation technique. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 2, p. 740–747, 2015.

OLEA-AZAR, C. et al. ESR, electrochemical and cyclodextrin-inclusion studies of triazolopyridyl pyridyl ketones and dipyridyl ketones derivatives. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 71, p. 703–709, 2008.

OLIVEIRA, A. C. et al. Molecular mechanism of action of 2-ferrocenyl-1,1diphenylbut-1-ene on HL-60 leukemia cells. **ChemMedChem**, v. 9, n. 11, p. 2580– 2586, 2014.

OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689–702, 2009.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: Bases e aplicações. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, p. 641–650, 2010.

OLIVEIRA-BRETT, A. M. et al. Electrochemical oxidation mechanism of guanine and adenine using a glassy carbon microelectrode. **Bioelectrochemistry**, v. 55, p. 61–62, 2002.

\_\_\_\_\_. et al. Electrochemical oxidation of 8-oxoguanine. **Electroanalysis**, v. 12, p. 969–973, 2000.

\_\_\_\_\_; SERRANO, S. H. P. The electrochemical oxidation of DNA. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 6, n. 1, p. 97-100, 1995.

PACHECO, W. F. et al. Voltametrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.

PAIVA, Y. G. et al. Electrochemically driven supramolecular interaction of quinones and ferrocifens: An example of redox activation of bioactive compounds. **Curr Top Med Chem.**, v. 15, n. 2, p. 136–162, 2015.

PAL, S. et al. Isocoumarin and its derivatives: An overview on their synthesis and Aaplications. **Current Organic Chemistry**, v. 15, p. 782–800, 2011.

PALOMAR-PARDAVÉ, M. et al. Supramolecular interaction of dopamine with βcyclodextrin: An experimental and theoretical electrochemical study. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 717-718, p. 103–109, 2014.

PALOZZA, P. Prooxidant actions of carotenoids in biologic systems. **Nutrition reviews**, v. 56, n. 1, p. 257–265, 1998.

PASSOS, J. J. et al. Double continuous injection preparation method of cyclodextrin inclusion compounds by spray drying. **Chemical Engineering Journal**, v. 228, p. 345–351, 2013.

PATEL, D. K. et al. Pharmacological and analytical aspects of bergenin: A concise report. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, n. 2, p. 163–167, 2012.

PATTERSON, S.; WYLLIE, S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: Past, present, and future prospects. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 6, p. 289–298, 2014.

PAULA, F. R. et al. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1013–1020, 2009.

PESSINE, F. B. T. et al. Review: Cyclodextrin inclusion complexes probed by NMR techniques, magnetic resonance spectroscopy. **Magnetic Resonance Spectroscopy**, p. 237–264, 2012.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. D. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, p. 146–152, 2012.

PÉREZ-CRUZ, F. et al. Host-guest interaction between new nitrooxoisoaporphine and β-cyclodextrins: Synthesis, electrochemical, electron spin resonance and molecular modeling studies. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 102, p. 226–234, 2013.

PERIASAMY, R. et al. Spectral investigation and characterization of host–guest inclusion complex of 4,4'-methylene-bis(2-chloroaniline) with beta-cyclodextrin. **Carbohydrate Polymers**, v. 114, p. 558–566, 2014.

PINHO, E. et al. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 121–135, 2014.

PINTO, S. M. A. Estruturas tripodais e poliméricas porfirínicas supramoleculares. Tese (Doutorado em Química Macromolecular) – Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2012.

PIZZA, C. et al. Constituents of *Ardisia japonica* and their in vitro anti-HIV activity. **Journal Natural Products**, v. 59, p. 565–569, 1996.

POIZOT, P. et al. Changes in a glassy carbon surface by the cathodic generation of free alkyl radicals mediated by a silver–palladium catalyst. **Carbon**, v. 50, n. 1, p. 73–83, 2012.

POLITI, F. A. S. Estudos farmacognósticos e avaliação de atividades biológicas de extratos obtidos das cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) cuatrec. (Humiriaceae). Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2009.

POÓR, M. et al. Interaction of ochratoxin A with quaternary ammonium betacyclodextrin. **Food Chemistry**, v. 172, p. 143–149, 2015.

POSPÍSIL, L. et al. Inclusion complex of fungicide vinclozoline and  $\beta$ -cyclodextrin The influence of host–guest interaction on the reduction mechanism. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 517, p. 28–36, 2001.

QIN, X. et al. Preparation, characterization and *in vivo* evaluation of bergeninphospholipid complex. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 31, n. 1, p. 127–136, 2010.

RAHAL, A. et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. **BioMed Research International**, v. 2014, p.1–19, 2014.

RAJ, M. K. et al. Antimicrobial activity of bergenin isolated from Peltophorum pterocarpum DC. flowers. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2, p. S901–S904, 2012.

RAUF, S. et al. Electrochemical approach of anticancer drugs-DNA interaction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 205–217, 2005.

REINHOUDT, D. N. **Supramolecular Chemistry and Heterocycles**. University of Twente, Enschede, Netherlands. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. p. 1–2, 2013.

REPETTO, M. et al. Lipid Peroxidation: Chemical mechanism, biological implications and analytical determination. **Biochemistry, Genetics and Molecular Biology**, p. 3–30, 2012.

RUSAK, G. et al. Spectrophotometric analysis of flavonoid-DNA interactions and DNA damaging/protecting and cytotoxic potential of flavonoids in human peripheral blood lymphocytes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, p. 181–189, 2010.

SABOKTAKIN, M. R.; TABATABAEI, R. M. Supramolecular hydrogels as drug delivery systems. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 426–436, 2015.

SALAMANCA-PINZÓN, S. G. et al. Correlation of the genotoxic activation and kinetic properties of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* nitroreductases SnrA and cnr with the redox potentials of nitroaromatic compounds and quinones. **Mutagenesis**, v. 25, n. 3, p. 249–255, 2010.

SALÚSTIO, P. J. et al. The influence of the preparation methods on the inclusion of model drugs in a  $\beta$ -cyclodextrin cavity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 2, p. 377–386, 2009.

SAMUEL, M. et al. A spectrophotometric method to quantify linear DNA. **Analytical Biochemistry**, v. 313, p. 301–306, 2003.

SANTARINO, I. B. et al. *In situ* evaluation of the anticancer antibody RituximabdsDNA interaction using a DNA-electrochemical biosensor. **Electroanalysis**, v. 26, p. 1304–1311, 2014.

SANTOS, E. H. et al. Characterization of carvacrol beta-cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for antibacterial and antioxidant applications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 583–592, 2015.

SAVJANI, K. T. et al. Drug Solubility: Importance and enhancement techniques. **International Scholarly Research Network Pharmaceutics**, v. 2012, p. 1–10, 2012.

SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox state and redox environment in biology. Education, p. 1–15, 2004.

SCHMIDT, B. V. K. J. et al. Complex macromolecular architecture design via cyclodextrin host/guest complexes. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 1, p. 235–249, 2014.

SCHWARZLÄNDER, M. et al. Monitoring the *in vivo* redox state of plant mitochondria: Effect of respiratory inhibitors, abiotic stress and assessment of recovery from oxidative challenge. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1787, n. 5, p. 468–475, 2009.

SCIO, E. Cumarinas encontradas no gênero Kielmeyera- Família Clusiaceae. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 85, n. 1, p. 27–31, 2004.

SEENIVASAN, R. et al. An electrochemical immunosensing method for detecting melanoma cells. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 68, p. 508–515, 2015.

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. **Journal of Brazillian Chemistry**, v. 21, n. 3, p. 447–451, 2010.

SHAHABADI, N.; HEIDARI, L. Binding studies of the antidiabetic drug, metformin to calf thymus DNA using multispectroscopic methods. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 97, p. 406–410, 2012.

\_\_\_\_\_. et al. DNA interaction studies of a new platinum complex containing the drug metformin. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 128, p. 377–385, 2014.

\_\_\_\_\_. et al. Interaction of a copper (II) complex containing an artificial sweetener (aspartame) with calf thymus DNA. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 120, p. 1–6, 2014.

SKOOG, D. A. et al. Fundamentos de Química Analítica. 8<sup>a</sup> Ed, Cengage Learning, 2009.

SILVA, R. J. S. **Complexos de inclusão de fármacos com Ciclodextrinas e Cucurbiturilos. Aplicações Farmacoterapêuticas.** Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade do Algarve. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Faro, 2011.

SINGH, U. et al. Reactions of hydroxyl radical with bergenin, a natural poly phenol studied by pulse radiolysis. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 16, p. 6008–6014, 2009.

SIRAJUDDIN, M. et al. Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, n. 124, p. 1–19, 2013.

SIVAGNANAM, U.; PALANIANDAVAR, M. Selective inclusion of methylviologen by β-cyclodextrin: effect of cyclodextrins on the electrochemistry of methylviologen. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 341, p. 197–207, 1992.

SONG, H. et al. *In vivo* metabolism study of bergenin in rats by HPLC-QTOF mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 27, p. 1398–1405, 2013.

\_\_\_\_\_\_. et al. Identification and characterization of human UDPglucuronosyltransferases responsible for the in vitro glucuronidation of bergenin. **Biomedical Chromatography**, v. 28, p. 348–353, 2014.

SOUSA, T. F. A. et al. Cyclodextrin based potentiometric sensor for determination of ibuprofen in pharmaceuticals and waters. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 176, p. 660–666, 2013.

SOUZA, A. A. **Estudos bioeletroquímicos de nitroquinonas derivadas da** *nor***-βlapachona**. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoa, 2011. \_\_\_\_\_\_. et al. Electrochemical study, on mercury, of a *meta*-nitroarylamine derivative of nor-β-lapachone, an antitumor and trypanocidal compound. **Química Nova**, v. 33, p. 2075–2079, 2010.

SQUELLA, J. A. et al. Recent Developments in the electrochemistry of some nitro compounds of biological significance. **Current Organic Chemistry**, v. 9, p. 565–581, 2005.

SRINIVASAN, K. et al. 2,6-Dinitroaniline and β-cyclodextrin inclusion complex properties studied by different analytical methods. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 577–587, 2014.

\_\_\_\_\_. et al. Spectral and electrochemical study of host-guest inclusion complex between 2,4-dinitrophenol and β-cyclodextrin. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 94, p. 89–100, 2012.

SRINIVASAN, R. et al. Antioxidant activity of *Caesalpinia digyna* root. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 284–291, 2007.

STALIN, T. et al. Preparation and characterizations of solid/aqueous phases inclusion complex of 2,4-dinitroaniline with  $\beta$ -cyclodextrin. **Carbohydrate Polymers**, v. 107, p. 72–84, 2014.

ŠTEFANIŠINOVÁ, M. et al. Study of DNA interactions with cyclic chalcone derivatives by spectroscopic techniques. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 81, p. 666–671, 2011.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. **Journal of Molecular Modeling**, v. 13, n. 12, p. 1173–1213, 2007.

SUMINO, M. et al. Ardisiphenols and other antioxidant principles from the fruits of *Ardisia colorata*. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 50, n. 11, p. 1484–1487, 2002.

SUN, Y. et al. Studies of interaction between two alkaloids and double helix DNA. **Journal of Luminescence**, v. 156, p. 108–115, 2014.

SUPRUN, E. V. et al. Protein Electrochemistry: Application in Medicine. A Review. **Electrochimica Acta**, v. 140, p. 72–82, 2014.

SZEJTLI, J.; SZENTE, L. Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 61, n. 3, p. 115–125, 2005.

TACON, L. A.; FREITAS, L. A P. Box-Behnken design to study the bergenin content and antioxidant activity of *Endopleura uchi* bark extracts obtained by dynamic maceration. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, p. 65–71, 2013.

TAKAHASHI, H. et al. Synthesis and neuroprotective activity of bergenin derivatives with antioxidant activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1781–1788, 2003.

TOMÉ, S. M. (*E*)-*C*-Glicosil-e-esririlcromonas com potencial actividade antioxidante (Dissertação). Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 2010.

TOSS, D. Extração de compostos fenólicos de *Butia capitata* utilizando dióxido de carbono supercrítico (Dissertação) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

UDDIN, G. et al. Comparative antioxidant and antiplasmodial activities of 11-Ogalloylbergenin and bergenin isolated from *Bergenia ligulata*. **Tropical Biomedicine**, v. 31, n. 1, p. 143–148, 2014.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, 2007.

VASCONCELOS, C. C. Estudos bioeletroquímicos de compostos biologicamente ativos: derivados da β-lapachona e ácido úsnico. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2011.

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

VENTURINI, C. D. G. et al. Properties and recent applications of cyclodextrins. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 360–368, 2008.

VIJAYA KUMAR, T. et al. Synthesis and antiglycation potentials of bergenin derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 16, p. 4928–4931, 2011.

VILAR, M.; NAVARRO, M. Determination of cyclodextrin inclusion constant for aromatic carbonyl compounds through spectrophotometric and electrochemical methods. **Electrochimica Acta**, v. 56, p. 305–313, 2010.

\_\_\_\_\_\_. NAVARRO, M. β-cyclodextrin as inverse phase transfer catalyst on the electrocatalytic hydrogenation of organic compounds in water. **Electrochimica Acta**, v. 59, p. 270–278, 2012.

WANG, J. **Analytical electrochemistry**. Third Edition, Editora John Wiley & Sons, Canadá, 2006.

WANG, Z. et al. *In situ* infrared spectroelectrochemical studies on adsorption and oxidation of nucleic acids at glassy carbon electrode. **Bioelectrochemistry**, n. 53, p. 175–181, 2001.

WANG, D. W. et al. Inclusion of quinestrol and 2,6-di-O-methyl-β-cyclodextrin: Preparation, characterization, and inclusion mode. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, n. 2, p. 753–760, 2013.

\_\_\_\_\_\_. et al. A carbon-carbon-coupled dimeric bergenin derivative biotransformed by *Pleurotus ostreatus*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 4073–4075, 2005.

WANG, S. et al. Investigation on the interaction of DNA and electroactive ligands using a rapid electrochemical method. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 55, p. 191–204, 2003.

WANG, X. M.; CHEN, H. Y. A spectroelectrochemical study of the interaction of riboflavin with  $\beta$ -cyclodextrin. **Spectrochimica Acta - Part A Molecular Spectroscopy**, v. 52, p. 599–605, 1996.

<u>...</u>. et al. Studies of an inclusion complex of a redox-active barbiturate with  $\beta$ -cyclodextrin. **Analytica Chimica Acta**, v. 290, n. 93, p. 349–355, 1994.

WANG, Z. et al. A temperature-dependent interaction of neutral red with calf thymus DNA. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 59, p. 949–956, 2003.

WEI, X. H. et al. Chemical constituents of *Caesalpinia decapetala* (Roth) alston. **Molecules**, v. 18, p. 1325–1336, 2013.

WEN, X. et al. Preparation and study the 1:2 inclusion complex of carvedilol with  $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, n. 3, p. 517–523, 2004.

WIBOWO, A. et al. Malaysianol A, a new trimer resveratrol oligomer from the stem bark of *Dryobalanops* aromatic. **Fitoterapia**, v. 82, p. 676–681, 2011.

XU, X. et al. β-Cyclodextrin functionalized mesoporous silica for electrochemical selective sensor: Simultaneous determination of nitrophenol isomers. **Electrochimica Acta**, v. 58, p. 142–149, 2011.

YAN, D. B. et al. Synthesis and cytotoxic activity of 3,4,11-trihydroxyl modified derivatives of bergenin. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 12, n. 12, p. 929–936, 2014.

YANG, P.; GUO, M. Interactions of organometallic anticancer agents with nucleotides and DNA. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 185/186, p. 189–211, 1999.

YE, Y. P. et al. Bergenin monohydrate from the rhizomae of *Astilbe chinensis*. Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications, v. 60, p. 397–398, 2004.

YOLA, M. L.; ÖZALTIN, N. Electrochemical studies on the interaction of an antibacterial drug nitrofurantoin with DNA. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, n. 653, p. 56–60, 2011.

YUN, J. et al. Bergenin decreases the morphine-induced physical dependence via antioxidative activity in mice. **Archives of Pharmacal Research**, v. 38, n. 6, p. 1248–54, 2015.

ZAMARRUD, A. I. et al. Two new antioxidant bergenin derivatives from the stem of *Rivea hypocrateriformis*. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 722–725, 2011.

ZHANG, Y. et al. Intercalation of herbicide propyzamide into DNA using acridine orange as a fluorescence probe. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 206, p. 630–639, 2015.

ZHANGA, J., et al. Cancer chemopreventive effect of bergenin from *Peltophorum pterocarpum* wood. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, p. 1866–1875, 2013.

ZHOU, C. et. Electrochemistry of magnolol and interaction with DNA. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 642, n. 2, p. 115–119, 2010.

ZHOU, D. et al. Physicochemical properties of bergenin. **Pharmazie**, v. 63, n. 25C, p. 366–371, 2008.

ZHU, Z. et al. Electrochemical studies of quercetin interacting with DNA. **Microchemical Journal**, v. 71, p. 57–63, 2002. ABREU, DE F. C., et al. The application of DNA-biosensors and differential scanning calorimetry to the study of the DNA-Binding agent berenil. **Sensors**, n. 8, p. 1519–1538, 2008.