



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

**ESTUDO DO ENCAPSULAMENTO DE COMPOSTOS
ANTIOXIDANTES EM β -CICLODEXTRINA POR MÉTODOS
ELETROQUÍMICOS E ESPECTROSCÓPICOS**

Dissertação de Mestrado

Fabricia da Rocha Ferreira

Maceió – AL
Março de 2009

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

**ESTUDO DO ENCAPSULAMENTO DE COMPOSTOS
ANTIOXIDANTES EM β -CICLODEXTRINA POR MÉTODOS
ELETROQUÍMICOS E ESPECTROSCÓPICOS**

Fabricia da Rocha Ferreira

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Fabiane Caxico de Abreu Galdino

Maceió - AL
Março de 2009

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

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

F383e Ferreira, Fabricia da Rocha.
Estudo do encapsulamento de compostos antioxidantes em β -ciclodextrina por métodos eletroquímicos e espectroscópicos / Fabricia da Rocha Ferreira, 2009.
xii,81 f. : il. tabs., grafs.

Orientadora: Fabiane Caxico de Abreu Galdino.
Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Exatas. Instituto de Química. Maceió, 2009.

Bibliografia: f. 72-81.

1. Eletroquímica. 2. Mangiferina. 3. Timol. 4. β -ciclodextrina.
I. Título.

CDU: 544.6



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

Instituto de Química e Biotecnologia
Universidade Federal de Alagoas
Tel. 55 82 3214-1384 Fax. 55 82 3214-1389
www.cpgqb@qui.ufal.br

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

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de **Fabricia da Rocha Ferreira** intitulada: “**Estudo do Encapsulamento de Compostos Antioxidante em β -ciclodextrina por Métodos Espectroscópicos e Eletroquímicos**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 27 de março de 2009, às 13h na sala de aula da Pós-Graduação do PPGQB/IQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

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

Prof.^a. Dr.^a. Marília Oliveira Fonseca Goulart
Co-orientadora – PPGQB/IQB/UFAL

Prof.^o. Dr.^o. Marcelo Navarro
IQ/UFPE

Prof.^o. Dr.^o. Joséaldo Tonholo
PPGQB/IQB/UFAL

Quem é o homem, para que dele te lembres? E o filho do homem, para que o visites? Senhor me fizeste um pouco menor que os anjos e, com tua glória, tens me coroadado.

Salmo 8:4-5

Ao meu amado esposo Adielson, pelo amor e inigualável apoio a mim concedido nesses últimos anos.

E também aos meus amados pais Claudenor e Francisca que não poupam esforços para me ver feliz, sempre me dando o seu melhor.

Agradecimentos

- A Deus, por me acolher em seus braços de amor **sempre**;
- Aos meus pais, Claudenor e Francisca; às minhas irmãs, Patrícia e Clarice; a tia Vera pelo inigualável apoio e, principalmente a minha princesa Dudinha, pelo carinho e amizade;
- Meu agradecimento mais que especial à Prof^a. Dr^a. Fabiane, por todo apoio e ensinamentos, não vendo dificuldades nas coisas que para mim, às vezes, pareciam impossíveis de serem realizadas. Muitíssimo obrigada.
- Professor Nivaldo, muitíssimo obrigada pelo carinho, atenção, cuidado, incentivo, pelas mensagens eletrônicas lindas e por todo auxílio nos meus experimentos, relatórios e exercícios.
- À Prof^a. Dr^a. Marília Goulart, pelo acolhimento no grupo de Eletroquímica, pela disposição em ajudar sempre e, pelos ensinamentos oferecidos durante esses dois anos de convivência;
- À Dr^a. Iara Valetim e ao Antonio, por frutíferas discussões e disposição em ajudar;
- À Prof^a. Dr^a. Tereza Trevisan, por envio de amostras de mangiferina e frutíferas discussões;
- Ao Prof. Dr. Lauro Kubota, pelo acolhimento no grupo LEEDS e ao Phabyanno, pelo auxílio na confecção do sensor NTC;
- Ao Prof. Dr. Edson Bento, pelas análises de RMN;
- A Manu, Thiago e Elton, pelo prestimoso auxílio nos experimentos; e a todos do laboratório de Eletroquímica, que sempre estavam disponíveis para tirar minhas dúvidas e me ajudar nos experimentos; enfim a todos os meus amigos, os de longe e os de perto, pelo companheirismo nessa caminhada;
- Agradeço ao CNPq e PROCAD/NF 23, pelo apoio financeiro, que possibilitou, assim, a realização do presente trabalho.

Fabricia da Rocha Ferreira
Súmula Curricular

Formação Acadêmica

§ **Graduação:** Licenciatura em Química (2003-2007).
Instituto de Química e Biotecnologia – Universidade Federal de Alagoas - UFAL

§ **Participações em Congressos**

Ferreira, F.R.; Silva, E.G.; Abreu, F.C.; Goulart, M.O.F.; Soares, N.A. “Estudo do encapsulamento de Mangiferina em β -ciclodextrina por métodos espectroscópicos e eletroquímicos”. Em: 31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia-SP, Brasil.

Ferreira, F.R.; Melo, A.M.S.; Valentim, I.B.; Goulart, M.O.F.; Abreu, F.C. “Estudo das isotermas de adsorção da Trifluralina em quitosana”. Em: 31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia-SP, Brasil.

Abreu, F.C.; **Ferreira, F.R.;** Silva, E.G.; Goulart, M.O.F.; Soares, N.A.; Trevisan, M.T.S. “Study of the inclusion complex of Mangiferin in β -cyclodextrin by spectroscopic and electrochemical methods”. Em: The 59th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 2008, Seville, Spain.

Silva, E.G.; **Ferreira, F.R.;** Goulart, M.O.F.; Abreu, F.C.; “Studies of inclusion complex of modified cyclodextrin with Thymol by electrochemical method and genotoxicity using DNA biosensor”. Em: The 4th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, 2008, Porto de Galinhas-PE, Brasil.

Silva, E.G.; **Ferreira, F.R.;** Goulart, M.O.F.; Abreu, F.C.; “Estudo do complex de inclusão entre timol e β -ciclodextrina por método eletroquímico (SAMs) e interação com o biossensor de DNA”. Em: XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2009, Fortaleza-CE, Brasil.

§ **Extensão**

Participação no curso de “Nanomateriais e Nanotecnologia” promovido pela Divisão de Química de Materiais da Sociedade Brasileira de Química e pelo Instituto do Milênio de Materiais Complexos (IM²C), realizado no Instituto de Química da Universidade de São Paulo, no período de 11 a 15 de fevereiro de 2008.

Estágio no Laboratório de Eletroquímica, Eletroanalítica e Desenvolvimento de Sensores (LEEDS), sob a supervisão do Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota, no período de 30/05 a 09/06 de 2008.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS SÍMBOLOS E UNIDADES	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Ciclodextrinas	2
1.2. Eletrodos Modificados – SAMs (Monocamadas Auto-Organizadas).....	6
1.3. Antioxidantes e Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e de Nitrogênio (ERN)	9
1.3.1. Mangiferina.....	11
1.3.2. Timol.....	14
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1. Produtos Químicos e Solventes	18
3.1.1. Síntese de Tio- β -ciclodextrina.....	18
3.1.2. Síntese de per-7-iodo- β -ciclodextrina	19
3.1.3. Síntese de per-7-tio- β -ciclodextrina	19
3.1.4. Caracterização por RMN dos Produtos da Síntese 1 e 2	20
3.2. Instrumentos	21
3.2.1. Limpeza Padrão dos Eletrodos de Ouro e Carbono Vítreo	22
3.2.2. Eletrodo de Ouro Modificado com SAM Mista de β -CDSH + MUA.....	22
3.2.3. Eletrodos de Carbono Vítreo Modificado com Nanotubos de Carbono (NTC)	23
3.3. Preparo das Soluções	24
3.4. Estudos Eletroquímicos	26
3.4.1. Estudo da Mangiferina ou Timol em Solução com β -CD em Eletrodo de Carbono Vítreo.....	26
3.4.2. Determinação da Mangiferina e do Timol por VC, em SAM, e por Eletrodo Modificado com NTC.....	26
3.5. Estudos Espectroscópicos	26
3.5.1. Análise Espectroscópica dos Complexos MGN: β -CD e Timol: β -CD	26
3.5.2. Preparo do Complexo MGN: β -CD	27

3.6. Capacidade Antioxidante Frente ao Radical DPPH[•]	27
3.6.1. Curva de Calibração	27
3.6.2. Preparo das Amostras para Análise da Capacidade Antioxidante	28
3.6.3. Medidas da Capacidade Antioxidante das Amostras	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1. Estudo UV-Vis	30
4.2. Capacidade Antioxidante	35
4.2.1. Capacidade Seqüestradora de Radicais Frente ao DPPH [•]	36
4.3. Estudo Eletroquímico	43
4.3.1. Estudo de Voltametria Cíclica (VC) de Mangiferina e Timol	44
4.3.2. Estudo da Variação do Potencial de Oxidação de Mangiferina e Timol com o pH	46
4.3.3. Estudo do Comportamento de Mangiferina e Timol na Presença de β -CD	50
4.3.4. Modificação do Eletrodo de Ouro com Camada Mista de β -CDSH + MUA e Sua Caracterização por Voltametria Cíclica	51
4.3.5. Cálculo da Constante de Formação (K_F) de MGN e Timol em SAM de β -CDSH + MUA	53
4.3.6. Sensor NTC e NTC + β -CD para MGN e Timol	60
4.3.7. Interação MGN:solvente e MGN: β -CD	68
5. CONCLUSÕES	70
6. PERSPECTIVAS	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (a) Estrutura funcional da β -ciclodextrina [BUDAL, 2003]; (b) Estrutura química da β -ciclodextrina.....	2
Figura 2. Esquema da cinética de formação de SAM; (a) a etapa inicial é caracterizada pela rápida adsorção e crescimento da espessura do filme, seguida por um processo mais lento (b) de adsorção e organização, até a formação final (c) da monocamada auto-organizada [adaptado de CANCINO, 2008].....	7
Figura 3. A irregularidade da superfície do substrato de ouro sem pré-tratamento para a formação das monocamadas auto-organizadas de alcanotóis [adaptado de CANCINO, 2008].....	8
Figura 4. Representação esquemática da interação de ácido ferrocenocarboxílico em eletrodo de ouro: (a) eletrodo limpo; (b) modificado com monocamada de MUA; (c) modificado com monocamada mista de MUA/ β -CDSH [adaptado de DAMOS <i>et al.</i> , 2007].....	9
Figura 5. Estrutura numerada da C-glicosilxantona Mangiferina.....	11
Figura 6. <i>Mangifera indica</i> L., (à direita, detalhe das folhas e dos frutos). Adaptado de imagens Google – acesso 14/10/2008.....	11
Figura 7. (a) Sobreposição das moléculas de MGN, mostrando a diferença entre os ângulos de torção dos carbonos e oxigênios do grupo D-glicopiranosila; (b) empacotamento cristalino de mangiferina [adaptado de CRUZ Jr. <i>et al.</i> , 2008].	14
Figura 8. Estrutura de Timol à esquerda e planta <i>Thymus vulgaris</i> (tomilho) à direita. Extraído de imagens Google – acesso 14/10/2008.....	15
Figura 9. Esquema dos dois possíveis complexos A e B, entre Timol e β -CD [adaptado de MULINACCI <i>et al.</i> , 1996].	16
Figura 10. Esquema sintético de per-7-tio- β -ciclodextrina.....	20
Figura 11. Curva de calibração do DPPH [•] . Medida em absorvência, a $\lambda = 516$ nm. Experimento realizado em triplicata.	28

- Figura 12.** (a) Espectro UV-Vis de MGN na ausência e presença de β -CD. $[MGN] = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, meio aquoso com 20 % EtOH. (b) estrutura de Mangiferina30
- Figura 13.** Determinação da constante de equilíbrio do complexo MGN: β -CD, de acordo com a equação de Benesi-Hildebrand, para vários comprimentos de onda; $[MGN] = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (20 % EtOH). Tempo de contato de 2h.32
- Figura 14.** Determinação da constante de equilíbrio do complexo MGN: β -CD, de acordo com a equação de Benesi-Hildebrand, para $\lambda = 368 \text{ nm}$ (1,5 % EtOH). $[S]_0 = 36 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[CD] = 3,0 \times 10^{-5}$; $7,0 \times 10^{-5}$; $3,0 \times 10^{-4}$; $5,0 \times 10^{-4}$; $7,0 \times 10^{-4}$, $1,0 \times 10^{-3}$; $3,0 \times 10^{-3}$; 5×10^{-3} e $7,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Tempo de contato de 2h.33
- Figura 15.** Curvas de cinética de complexação de MGN e β -CD, $\lambda = 368 \text{ nm}$. Razão molar 1:1, 25 °C. $[MGN] = 36 \mu\text{mol L}^{-1}$. Solução aquosa com 1,5 % (v/v) de EtOH. Experimento realizado em triplicata.34
- Figura 16.** (a) Espectro UV-Vis de Timol na ausência e presença de β -CD. $[Timol] = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, em meio aquoso com 20 % EtOH. (b) Determinação da constante de equilíbrio do complexo Timol: β -CD de acordo com a equação de Benesi-Hildebrand, para $\lambda = 274 \text{ nm}$; $[Timol] = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Solução aquosa com 20 % de EtOH. Comparação entre o tempo de contato de 1 e 2h.35
- Figura 17.** Reação do radical DPPH com um antioxidante.....37
- Figura 18.** Comportamento cinético de MGN, β -CD e Ácido gálico frente ao DPPH[•]. Experimento realizado em triplicata.38
- Figura 19.** Comportamento cinético dos complexos MGN: β -CD 1A (-■- MGN 2,17 e β -CD 5,64 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 2A (-●-MGN 4,35 e β -CD 11,29 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e 3A (-▲- MGN 21,75 e β -CD 56,45 $\mu\text{g mL}^{-1}$), frente ao radical DPPH. Razão molar 1:1. Experimento realizado em triplicata.39
- Figura 20.** Comportamento cinético dos complexos MGN: β -CD 1B (-■- MGN 2,17 e β -CD 11,28 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 2B (-●- MGN 4,35 e β -CD 22,58 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e 3B (-▲-MGN 21,75 e β -CD 112,90 $\mu\text{g mL}^{-1}$) frente ao radical DPPH. Razão molar 1:2. Experimento realizado em triplicata.40

Figura 21. Porcentagem da atividade antioxidante das amostras MGN, complexos MGN: β -CD, razão molar 1:1 e 1:2, e do controle ácido gálico [AG]. Tempo de reação: 30 min. Experimento realizado em triplicata.....	41
Figura 22. Possível interação entre MGN: β -CD para a razão molar 1:1.....	42
Figura 23. Possível interação entre MGN: β -CD para a razão molar 1:2.....	43
Figura 24. (a) Voltamogramas cíclicos da MGN em várias velocidades de varredura; (b) gráfico de i_{pa} vs. v ; (c) gráfico de i_{pa} vs. $v^{1/2}$; [MGN] = $1,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ . Tampão fosfato 0,2 mol L ⁻¹ , pH 7,0; eletrodo de CV.	45
Figura 25. (a) Voltamogramas cíclicos do comportamento eletroquímico de MGN em varreduras sucessivas; [MGN] = $1,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ . Tampão fosfato 0,2 mol L ⁻¹ , pH 7,0; eletrodo de CV; $v = 0,010$ V s ⁻¹ ; (b) Voltamogramas cíclicos do comportamento eletroquímico de Timol em varreduras sucessivas; [Timol] = $1,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ . Tampão fosfato 0,2 mol L ⁻¹ , pH 7,0; eletrodo de CV; $v = 0,10$ V s ⁻¹	46
Figura 26. Possíveis mecanismos de desprotonação de MGN, útil para a determinação do pK_a [adaptado de GÓMEZ-ZALETA <i>et al.</i> , 2006].....	47
Figura 27. (a) Voltamogramas de pulso diferencial da dependência do potencial de oxidação da MGN em função do pH; (b) curva de E_{pa} vs. pH da MGN; (c) curva de i_{pa} vs. pH da MGN.....	48
Figura 28. (a) Voltamogramas de pulso diferencial da dependência do potencial de oxidação do Timol em função do pH; (b) curva de E_{pa} vs. pH do Timol; (c) curva de i_{pa} vs. pH do Timol.	49
Figura 29. Voltamogramas cíclicos de MGN ($1,0$ mmol L ⁻¹) em eletrodo de ouro e adição de β -CD sólida nas concentrações de 0,1; 1,0 e 10,0 mmol L ⁻¹ . Na ₂ SO ₄ 0,2 mol L ⁻¹ como eletrólito suporte e $v = 0,01$ V s ⁻¹ . Inserção: i_{pa} vs. [β -CD].....	50
Figura 30. Voltamogramas cíclicos de Timol ($1,0$ mmol.L ⁻¹) em eletrodo de ouro e adição de β -CD sólida nas concentrações de 0,1; 1,0 e 10,0 mmol L ⁻¹ . Na ₂ SO ₄ 0,2 mol L ⁻¹ como eletrólito suporte e $v = 0,01$ V s ⁻¹ . Inserção: i_{pa} vs. [β -CD].....	51
Figura 31. Voltamogramas cíclicos para K ₃ [Fe(CN) ₆], Fc-CO ₂ H e MGN em eletrodo de ouro modificado com β -CDSH + MUA. Na ₂ SO ₄ 0,2 mol L ⁻¹ como eletrólito suporte e $v = 0,01$ V s ⁻¹	53

- Figura 32.** (a) Voltamogramas cíclicos do efeito da concentração da MGN em SAM de β -CDSH + MUA; (b) $[MGN] / I_{p_a}$ vs. $[MGN]$. Na_2SO_4 $0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $v = 0,01 \text{ V s}^{-1}$...54
- Figura 33.** (a) Voltamogramas cíclicos de Fc-CO₂H na faixa de concentração de 5 a $120 \mu\text{mol L}^{-1}$. (b) razão $[Fc-CO_2H] / I_{p_a}$ vs. $[Fc-CO_2H]$ mostrando a saturação da SAM mista de β -CDSH + MUA (c) razão $[Fc-CO_2H] / I_{p_a}$ vs. $[Fc-CO_2H]$ para o cálculo da constante de associação. Na_2SO_4 $0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $v = 0,01 \text{ V s}^{-1}$55
- Figura 34.** (a) Voltamogramas cíclicos do efeito inibitório de MGN em solução de Fc-CO₂H. (b) ΔI_{p_a} (diferença entre a corrente de pico do processo redox de Fc-CO₂H na presença e ausência de MGN): dependência para diferentes concentrações de MGN. (c) Razão entre $[MGN]/\Delta I_{p_a}$ vs. $[MGN]$. Medidas realizadas em eletrodo modificado com β -CDSH/MUA, Na_2SO_4 $0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $v = 0,01 \text{ V s}^{-1}$57
- Figura 35.** (a) Voltamogramas cíclicos do efeito da concentração do Timol em SAM de β -CDSH + MUA; (b) razão $[Timol] / I_{p_a}$ vs. $[Timol]$ em VC. Na_2SO_4 $0,2 \text{ mol L}^{-1}$; (c) Voltamogramas de pulso diferencial do efeito da concentração do Timol em SAM de β -CDSH + MUA; Na_2SO_4 $0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $a = 50 \text{ mV}$, tempo de pulso = 70 ms , $v = 0,01 \text{ mV s}^{-1}$58
- Figura 36.** Voltamograma cíclico da dessorção reductiva em eletrodo de ouro dos grupos tióis de monocamada mista de β -CDSH + MUA; KOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$; $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$59
- Figura 37.** Representação esquemática do mecanismo de formação do compósito NTC + β -CD, [adaptado de LIU *et al.*, 2008].....61
- Figura 38.** Representação esquemática do sensor eletroquímico para MGN modificado com matriz de NTC + β -CD [adaptado de ALARCÓN-ANGELES *et al.*, 2008].62
- Figura 39.** (a) Voltamogramas de pulso diferencial da MGN em sensor de NTC-1; (b) curva de $[MGN]$ vs. I_{p_a} em sensor de NTC-1; Inserção: saturação de MGN no sensor NTC-1; (c) Voltamogramas de pulso diferencial da MGN em sensor NTC + β -CD com tratamento ácido; (d) curva de $[MGN]$ vs. I_{p_a} em sensor de NTC + β -CD com tratamento ácido; Inserção: saturação de MGN no sensor NTC + β -CD com tratamento ácido. Tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0; $a = 50 \text{ mV}$, tempo de pulso = 70 mV s^{-1} , $v = 0,02 \text{ mV s}^{-1}$64

Figura 40. (a) Voltamogramas de pulso diferencial de MGN em sensor de NTC-2; (b) curva de [MGN] vs. I_{pa} em sensor de NTC-2; Inserção: saturação de MGN no sensor NTC-2; (c) Voltamogramas de pulso diferencial da MGN em sensor de NTC-2 + β -CD; (d) curva de [MGN] vs. I_{pa} em sensor de NTC-2 + β -CD. Tampão fosfato 0,2 mol L ⁻¹ ; pH 7,0; $a = 50$ mV, tempo de pulso = 70 ms, $v = 0,02$ mV s ⁻¹	65
Figura 41. (a) Voltamogramas de pulso diferencial de Timol em sensor de NTC-2; (b) curva de [Timol] vs. I_{pa} em sensor de NTC-2; (c) Voltamogramas de pulso diferencial de Timol em sensor de NTC-2 + β -CD; (d) curva de [Timol] vs. I_{pa} em sensor de NTC-2 + β -CD; Inserção: saturação de Timol no sensor NTC-2 + β -CD. Tampão fosfato 0,2 mol L ⁻¹ ; pH 7,0; $a = 50$ mV, tempo de pulso = 70 mV s ⁻¹ ; $v = 0,02$ mV s ⁻¹	67
Figura 42. Espectro NOESY da MGN em DMSO- d_6	68
Figura 43. Espectro NOESY do complexo MGN: β -CD, razão molar 1:1 em DMSO- d_6	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Algumas propriedades físico-químicas de CDs naturais (adaptado de GIORDANO <i>et al.</i> , 2001).....	4
Tabela 2. Dados de ^1H NMR (400 MHz, CD_3SOCD_3) para o composto 1.	20
Tabela 3. Dados de ^1H NMR (400 MHz, CD_3SOCD_3) para o composto 2.	21
Tabela 4. Soluções Tampões para eletrólito suporte.....	25
Tabela 5. Constante de dissociação e formação do complexo MGN: β -CD para 2 h de contato.	32
Tabela 6. Constante de formação para o complexo MGN: β -CD para 2 e 4 h de contato.	34
Tabela 7. Parâmetros eletroquímicos encontrados para MGN. Estudo em função da velocidade de varredura. <i>Epa vs. Ag AgCl Cl⁻</i> (sat.).....	45
Tabela 8. Valores das constantes de formação (K_F) para MGN em três eletrodos de ouro.	54
Tabela 9. Valores dos excessos superficiais (Γ), obtidos a partir da primeira varredura redutiva, dos eletrodos de ouro modificados com SAM mista de β -CDSH + MUA e em comparação com dados da literatura.	60
Tabela 10. Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para sensores de NTC e NTC ácido com β -CD.	64
Tabela 11. Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para sensores de NTC-2 e NTC-2 + β -CD.	66
Tabela 12. Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para sensores de NTC-2 e NTC-2: β -CD.	67

LISTA DE ABREVIATURAS SÍMBOLOS E UNIDADES

- ν = Velocidade de varredura de potencial
 $\nu^{1/2}$ = Raiz quadrada da velocidade de varredura
 ΔE = Altura do salto de potencial
 ^{13}C -RMN = ressonância magnética nuclear de carbono
 ^1H -RMN = ressonância magnética nuclear de hidrogênio
A = Ampère
AC = ácido cumárico
AG = ácido gálico
CD = ciclodextrina
CDSH = ciclodextrina tiolada
CV = carbono vítreo
DMF = *N,N*-dimetilformamida
DMSO- d_6 = dimetilsulfóxido deuterado
DPPH $^{\bullet}$ = 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
 E = Potencial
 $E_{1/2}$ = Potencial de meia-onda
EM = espectrometria de massas
 E_{p_a} = Potencial de pico anódico
EQMs = Eletrodos quimicamente modificados
ERO = espécies reativas de oxigênio
Fc-CO $_2$ H = ácido ferrocenocarboxílico
 I = Corrente
 i_{p_a} = Corrente de pico anódica
IV = infravermelho
 K_D = constante de dissociação
 K_F = constante de formação
LD = Limite de detecção
LQ = limite de quantificação
LR-CDs = ciclodextrinas contendo de 9 a 35 unidades de glicopiranosose
MGN = Mangiferina

MPP⁺ = 1-metil-4-fenilpiridínio

MPTP = 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

M_r = Massa molecular relativa

MUA = ácido 11-mercaptoundecanóico

n = Número de elétrons

NOESY = “Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy” (Espectroscopia de Efeito Nuclear de Overhauser)

NTC = nanotubos de carbono

P.A. = Para análise

pH = Potencial hidrogeniônico

pK_a = O inverso, log 1/K_a do logaritmo da constante de acidez, K_a

RSA = “Radical Scavenging Activity” (Atividade Sequestradora de Radicais)

SAM = “Self Assembled Monolayers” (Monocamadas auto-organizadas)

SD = “Standard Deviation” (Desvio Padrão)

UV = Ultravioleta

UV-VIS = Ultravioleta-visível

v/v = Volume por volume

VC = Voltametria cíclica

VPD = Voltametria de Pulso Diferencial

μA = Microampère

RESUMO

Dois compostos fenólicos, Mangiferina (MGN) e Timol, despertam o interesse, em razão de suas consideráveis atividades farmacológicas, dentre elas a potente atividade antioxidante. No entanto, apresentam baixa solubilidade em água e, no caso do timol, também se mostra tóxico e mutagênico. Ciclodextrinas (CDs) são um grupo de oligossacarídeos cíclicos, os quais têm sido reconhecidos como excipientes farmacêuticos de grande utilidade, cuja estrutura permite formar complexos de inclusão estáveis. O presente trabalho aborda a formação de complexos entre MGN: β -CD e Timol: β -CD, buscando-se alternativas que possibilitem aumentar a solubilidade e, biodisponibilidade dos mesmos, tanto com β -CD livre (em solução), quanto em superfície eletródica. Para a última proposta, fez-se necessário a inserção de grupos tióis na molécula de β -CD. A formação dos complexos foi acompanhada por espectroscopia UV-VIS e ^1H -RMN, e principalmente por eletroquímica, sendo o foco principal deste trabalho a formação da SAM (monocamada auto-organizada) mista de β -CD + MUA (ácido 11-mercaptoundecanóico) para avaliar o comportamento eletroquímico de MGN e Timol na cavidade da β -CD. Foi possível construir uma curva de calibração para ambas as substâncias em eletrodo modificado com SAM mista e, dessa forma, calcular suas constantes de formação: $7,75 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ e $2,46 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ para MGN e Timol, respectivamente. Para MGN, esta constante foi calculada tanto pelo método direto com adição de alíquotas, quanto por competição com moléculas de ácido ferrocenocarboxílico, sendo encontrado um valor de mesma ordem de grandeza: $1,7 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$. Com o objetivo de explorar o bloqueio total da superfície eletródica modificada com a SAM mista, os excessos superficiais foram calculados por meio da carga voltamétrica obtida da dessorção redutiva. Observaram-se valores de excesso superficial próximos a $8,5 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$, o que demonstra uma excelente cobertura dos sítios da superfície, justificando assim a ausência da resposta eletroquímica para o marcador ferricianeto de potássio. Também foi observado que na presença de β -CD na razão molar 1:1, a atividade antioxidante de MGN é aumentada, porém na razão molar 1:2 (MGN: β -CD) sua atividade antioxidante é diminuída.

Palavras chave: Mangiferina, Timol, β -ciclodextrina, SAM, eletroquímica.

ABSTRACT

Two phenolic compounds, Mangiferin (MGN) and Thymol attract the attention, because of their pharmacological activities, among them, the significant antioxidant activity. However, they have low solubility in water, and thymol has toxic and mutagenic properties. Cyclodextrins (CDs) are a group of cyclic oligosaccharides which have been recognized as pharmaceutical excipients of great utility, which structure allows to form stable inclusion complexes. The present work deals with complexes formation between MGN: β -CD and Thymol: β -CD, searching for alternatives that increase their solubility and bioavailability, using free β -CD (in solution) or attached to the electrodic surface. For the last proposal, the insertion of thiol groups in the β -CD molecule was necessary. The complexes formation was followed by UV-VIS spectroscopy, NMR- ^1H , and mainly by electrochemistry. The aim of this work is the formation of mixed SAM (self-assembled monolayers) with β -CD + MUA (11-mercaptopundecanoic acid) to evaluate the electrochemical behavior of MGN and Thymol into the cyclodextrin cavity. One analytical curve was built for both compounds in modified electrode with mixed SAM, and their formation constants calculated: $7.75 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ and $2.46 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ to MGN and Thymol, respectively. This constant was calculated for MGN by the direct method with the addition of aliquots, as well by the competition method with molecules of ferrocenecarboxylic acid, being found the same order of magnitude: $1.7 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$. Aiming to explain the total blockage of the modified electrode surface with mixed SAM, the surface excess of molecules was measured by voltammetric charge required for their reductive desorption. It was observed a surface excesses near $8.5 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$, which is related to a full coverage of the active sites on the surface, thus justifying the absence of electrochemical response for the ferricyanide that works as a probe. It was observed that in the presence of β -CD in the molar reason 1:1, the antioxidant activity of MGN is increased, however in the molar reason 1:2 (MGN: β -CD) the antioxidant activity is reduced.

Keywords: Mangiferin, Thymol, β -cyclodextrin, SAM, electrochemistry

1. INTRODUÇÃO

A insolubilidade de compostos biologicamente ativos consiste em um fator que pode acarretar limitações nas aplicações farmacêuticas. Dessa forma, o desenvolvimento de metodologias que possibilitem aumentar a solubilidade de compostos insolúveis, bem como a liberação dos mesmos no alvo de ação é de extremo interesse em aplicações farmacêuticas.

Ciclodextrinas (CDs) são conhecidas na química supramolecular como receptores capazes de formar complexos de inclusão estáveis ou nanoestruturas supramoleculares organizadas, com uma variedade de moléculas, inclusive compostos orgânicos, inorgânicos e organometálicos, em sua cavidade hidrofóbica via interações não covalentes. Essas características possibilitam a aplicação de CDs em um grande número de campos, entre eles ambiental, analíticos, e em processos industriais, pois mostram alta seletividade molecular (discriminação quiral), aumentam a estabilidade inclusive de radicais eletrogerados, reduzem ou eliminam gostos ou odores desagradáveis de fármacos e alimentos, diminuem a volatilidade de perfumes, aumentam a solubilidade de substratos lipofílicos em meio aquoso e, como consequência sua biodisponibilidade, bem como a diminuição da irritabilidade e toxicidade, e liberação *in loco*, de compostos detentores de atividade biológica [LOFTSSON & MASSON, 2001; YANG *et al.*, 2004; SZENTE & SZEJTLI, 2004; SZEJTLI & SZENTE, 2005; BREWSTER & LOFTSSON, 2007; YAN *et al.*, 2007; VENTURINI *et al.*, 2008].

No presente trabalho, pretende-se analisar a formação de complexos entre β -ciclodextrina e Mangiferina e β -ciclodextrina e Timol. A Mangiferina e o Timol são compostos que apresentam um interessante espectro de atividades biológicas, principalmente antioxidante, mas tem o inconveniente da baixa solubilidade em água. Por esse motivo, buscaram-se alternativas de modo a possibilitar um aumento da solubilidade dos mesmos através da formação de complexos de inclusão, tanto com ciclodextrina livre (em solução) quanto na superfície eletródica. No caso desta última proposta, foi necessária funcionalização da molécula de ciclodextrina, com grupos tiól.

1.1. Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CDs) compreendem uma família de oligossacarídeos cíclicos de ocorrência natural ou semissintética, constituídas por unidades de glicopirranose unidas por ligações α -1,4 (Figura 1a). Existem CDs contendo seis (α -CD), sete (β -CD) (Figura 1b), oito (γ -CD), nove (δ -CD), dez (ϵ -CD) ou mais unidades de α -D-glicopirranose; no entanto, as mais importantes são α -CD, β -CD e γ -CD [BREWSTER & LOFTSSON, 2007].

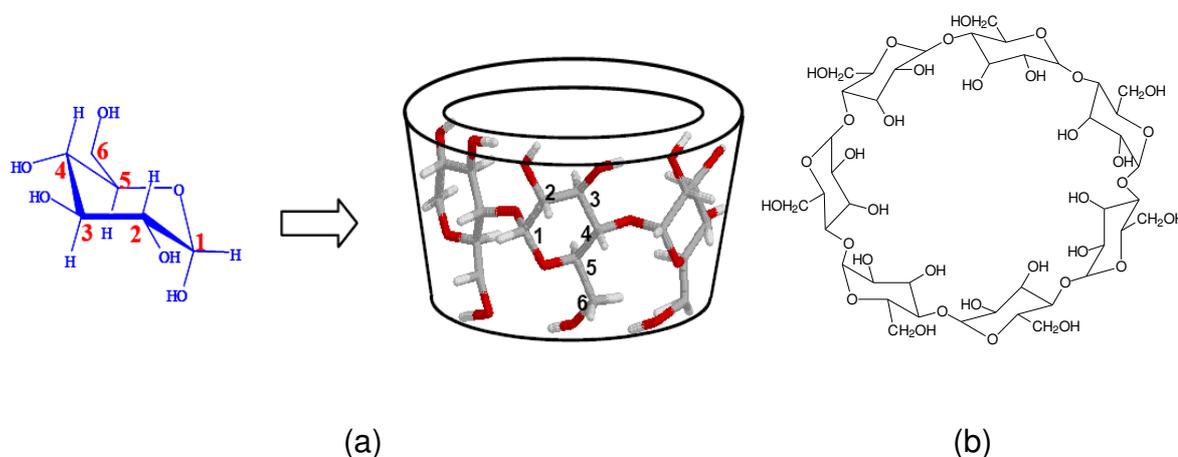


Figura 1. (a) Estrutura funcional da β -ciclodextrina [BUDAL, 2003]; (b) Estrutura química da β -ciclodextrina.

As CDs foram descobertas pelo pesquisador francês A. Villiers em 1891, o qual descreveu a ação de enzimas denominadas CD glicosiltransferases (CGTases) sobre o amido [VENTURINI *et al.*, 2008], cujo processo envolve duas etapas: a quebra da cadeia polissacarídica em oligossacarídica e a liberação das duas extremidades para formar uma estrutura cíclica [GIORDANO *et al.*, 2001]. Ele obteve uma substância cristalina e os resultados experimentais indicaram que a substância era uma dextrina, então Villiers a nomeou celulosina por apresentar características semelhantes à celulose, como resistência a hidrólise ácida e por não ser redutora, e ainda observou que ocorriam duas “celulosinas” distintas. Em 1903, um microbiologista austríaco, Franz Schardinger, descreveu o processo de preparação e isolamento de α -CD e β -CD a partir da digestão bacteriana do amido da batata, e ainda teve o mérito de distinguir ambas por meio do método do iodo [BREWSTER & LOFTSSON, 2007; VENTURINI *et al.*, 2008].

A partir das décadas de 70 e 80, surgiram derivados de α -CD, β -CD e γ -CD, na tentativa de melhorar suas estruturas, a fim de obter complexos de inclusão adequados a vários setores, como o industrial, o alimentício e o farmacêutico [BREWSTER & LOFTSSON, 2007; VENTURINI *et al.*, 2008]. CDs contendo de 9 a 35 unidades de glicopirranose, denominadas de ciclodextrinas com anéis grandes (LR-CDs do inglês *Large Rings-CDs*), foram purificadas e caracterizadas, contudo, não apresentaram a mesma atividade solubilizadora para muitas drogas como são α -CD, β -CD e γ -CD. Além disso, é difícil produzir LR-CDs, uma vez que são pouco estáveis em solução aquosa [BREWSTER & LOFTSSON, 2007].

Devido à conformação em cadeira das unidades glicopiranosila, as CDs apresentam-se na forma de um cone truncado. As funções hidroxila são orientadas para fora do cone, com as hidroxilas primárias do resíduo sacarídico voltadas para extremidade estreita do cone e as hidroxilas secundárias voltadas para a extremidade larga (Figura 1a) [LOFTSSON & MASSON, 2001; BREWSTER & LOFTSSON, 2007]. Esse grande número de hidroxilas permite a formação de ligações-de-hidrogênio intramoleculares (entre os grupos hidroxila 2- e 3- da unidade glicosídica adjacente) ou intermolecular (entre CDs e moléculas hospedeiras) [YANG *et al.*, 2004].

A cavidade central da molécula está alinhada com o esqueleto de carbonos e oxigênios etéreos do resíduo glicosídico, o que proporciona um microambiente lipofílico; a outra superfície apresenta caráter hidrofílico. Estima-se que a polaridade da cavidade seja similar a uma solução etanólica aquosa. Em solução aquosa, os grupos hidroxila formam ligação-de-hidrogênio com as moléculas de água, resultando em hidratação ao redor da molécula de CD dissolvida [BREWSTER & LOFTSSON, 2007]. A cavidade ligeiramente não-polar também é ocupada por moléculas de água, que são facilmente substituídas por um substrato menos polar do que a água, levando a um estado energeticamente mais favorável, dada a natureza da interação polar não-polar [VENTURINI *et al.*, 2008].

Durante a formação do complexo substrato-CD nenhuma ligação covalente é formada ou rompida e, em solução aquosa, os complexos dissociam-se rapidamente. Os valores da constante de formação $K_{1:1}$ situam-se freqüentemente entre 50 e 2000 L mol⁻¹, com um valor médio de 130, 490 e 350 L mol⁻¹ para α -CD,

β -CD e γ -CD, respectivamente. São conhecidos quatro tipos de estequiometria CD-substrato: 1:1, 1:2, 2:1 e 2:2; sabe-se, ainda que CDs formam tanto complexos de inclusão como de não-inclusão ou, mesmo, ambos, com os substratos. Todavia, os complexos de inclusão do tipo hospedeiro:hóspede (host-guest), são provavelmente muito mais comuns do que os complexos de não-inclusão [BREWSTER & LOFTSSON, 2007; VENTURINI *et al.*, 2008].

As ligações que estabilizam o complexo de inclusão são atribuídas a interações hidrofóbicas, eletrostáticas, e do tipo dipolo-dipolo, transferência de cargas, ligações de van der Waals entre a metade hidrofóbica de uma molécula e a cavidade da CD e ligações-de-hidrogênio entre grupos funcionais próticos de uma molécula hóspede e os grupos hidroxila da CD, como também outros fatores, tais como a liberação de moléculas de água de alta energia da cavidade da CD, diminuição da energia de tensão da estrutura da CD e estabilização energética por meio de mudanças conformacionais [YANG *et al.*, 2004; BREWSTER & LOFTSSON, 2007; VENTURINI *et al.*, 2008].

O fator considerado mais importante no processo de complexação é o arranjo espacial. O tamanho da molécula a ser encapsulada deve ser compatível com a cavidade da CD; nesse caso, moléculas pequenas formam complexos mais facilmente com α - ou β -CD. Para a γ -CD, se o substrato for muito pequeno, o encaixe torna-se desfavorável, devido ao tamanho muito maior da cavidade da mesma [VENTURINI *et al.*, 2008]. A Tabela 1 mostra algumas propriedades físicas e químicas de alguns membros da família.

Tabela 1. Algumas propriedades físico-químicas de CDs naturais (adaptado de GIORDANO *et al.*, 2001).

	α -CD	β -CD	γ -CD
Massa Molecular relativa, Mr	972	1135	1297
Unidades de glicose	6	7	8
Solubilidade em água (g/100 mL)	14,5	1,85	23,2
Diâmetro da cavidade (nm)	0,47-0,53	0,60-0,65	0,75-0,83
Diâmetro total (nm)	1,46	1,54	1,75
Número de moléculas de água solvatadas	6-7	11-12	17

Entre as três ciclodextrinas não modificadas, a β -CD é a mais estudada, pois além de apresentar uma cavidade com tamanho ideal para se ligar a uma variedade de resíduos aromáticos e alifáticos, é a que apresenta a menor solubilidade, sendo industrialmente a mais facilmente recuperada através do processo de recristalização. Por isso, a produção de β -CD, hoje, é a mais economicamente viável, custando em média 5-6 US\$/kg, enquanto que a α -CD e a γ -CD demandam processos de purificação mais sofisticados, o que eleva o custo para 45 e 80 US\$/kg respectivamente [SZENTE & SZEJTLI, 2004; BREWSTER & LOFTSSON, 2007].

A inclusão na cavidade da ciclodextrina altera as características físico-químicas do substrato, fornecendo meios para se detectar o fenômeno da complexação. Em solução, há um equilíbrio entre as moléculas complexadas; se ocorre complexação, há uma alteração no espectro de absorção UV/VIS do substrato (deslocamentos ou aumento/diminuição do pico de absorção máximo) que, muitas vezes, são similares aos efeitos causados por solventes com diferentes polaridades, sugerindo que a molécula hóspede fora transferida de um meio polar para a cavidade não-polar das ciclodextrinas. Quando uma substância se encontra em presença de CDs ocorrem perturbações eletrônicas na molécula complexada, causadas pela interação direta com a cavidade da ciclodextrina, pela exclusão de moléculas de água da cavidade ou por uma combinação dos dois efeitos [MORAES *et al.*, 2007; GRILLO *et al.*, 2008].

O estudo da formação de complexos (host-guest) entre CDs e compostos orgânicos, inorgânicos e organometálicos, pode se dar através de métodos espectroscópicos, que se baseiam nas mudanças observadas nos espectros de absorção das substâncias em análise pós complexação. No entanto, técnicas eletroquímicas também apresentam um comportamento particular que permite o estudo da formação de complexos por inclusão com CDs. Nesse sentido, medidas eletroquímicas podem confirmar a formação desses complexos através das mudanças observadas na corrente de pico, bem como no potencial de redução e/ou oxidação após inclusão do substrato.

1.2. Eletrodos Modificados – SAMs (Monocamadas Auto-Organizadas)

Nos últimos anos cresceu o interesse em eletrodos quimicamente modificados (EQMs). Esses sensores são eletrodos com espécies ativas imobilizadas em sua superfície; com isso, a natureza físico-química da interface eletrodo-solução é alterada, aumentando a reatividade e seletividade do sensor-base. Essas modificações conferem propriedades muito mais atraentes e possibilitam o desenvolvimento de sensores para diversos fins e aplicações, que vão desde a catálise de reações orgânicas e inorgânicas até a transferência de elétrons para moléculas diversas, pois são seletivos, sensíveis, estáveis, reproduzíveis e de aplicação superior àquelas de um eletrodo base sem modificação [PEREIRA *et al.*, 2002].

O uso de ciclodextrinas em sistemas de reconhecimento molecular hóspede-hospedeiro atrai o interesse de pesquisadores por sua estabilidade física e química, e principalmente pelo fato de que as moléculas dispõem de uma cavidade bem definida tendo a habilidade de acomodar uma variedade de moléculas hospedeiras [BOUZITOUN *et al.*, 2007]. Muitas das aplicações analíticas de ciclodextrinas requerem sua imobilização em uma superfície. A estratégia consiste em modificar a ciclodextrina com grupos organo-tiólicos, que apresentam grande afinidade por superfícies de ouro. Estudos descrevem síntese e imobilização de derivados tiólicos de ciclodextrinas em superfícies de ouro, bem como a utilização da resposta voltamétrica desses sensores para a detecção de espécies orgânicas eletroativas [ROJAS *et al.*, 1995; MAEDA *et al.*, 1997; BEULEN *et al.*, 1998; BOLLO *et al.*, 2003, CHOI *et al.*, 2005]. Dessa forma, os estudos são direcionados às monocamadas auto-organizadas (SAMs do inglês *self-assembled monolayers*), que são formadas espontaneamente como consequência da imersão de uma superfície sólida em solução constituída de moléculas anfotéricas [FREIRE *et al.*, 2003].

Para a formação dessas camadas auto-organizadas, o grupo mais empregado e estudado é, sem dúvida, constituído de tióis e alcanotióis sobre superfícies de ouro, devido à estabilidade da ligação Au-SR que resulta em uma estrutura altamente ordenada e inclinada de 20 a 30 graus em relação à normal (Figura 2c). A técnica de imobilização de SAM sobre a superfície do eletrodo por

meio da imersão em solução é frequentemente realizada em um período de 24 horas, em que o acoplamento do adsorvato é uma etapa relativamente rápida, seguido por um processo de organização muito mais lento (Figura 2a-c). [FREIRE *et al.*, 2003; CANCINO, 2008]. Várias técnicas de superfície podem ser utilizadas para verificar a organização final da monocamada, principalmente espectroscópicas (espectroscopia no infravermelho, raios-X, microscopia, etc.) e eletroquímicas (voltametria, impedância, etc.), bem como medidas em microbalança de cristal de quartzo [FREIRE *et al.*, 2003; LEE & PARK 1998].

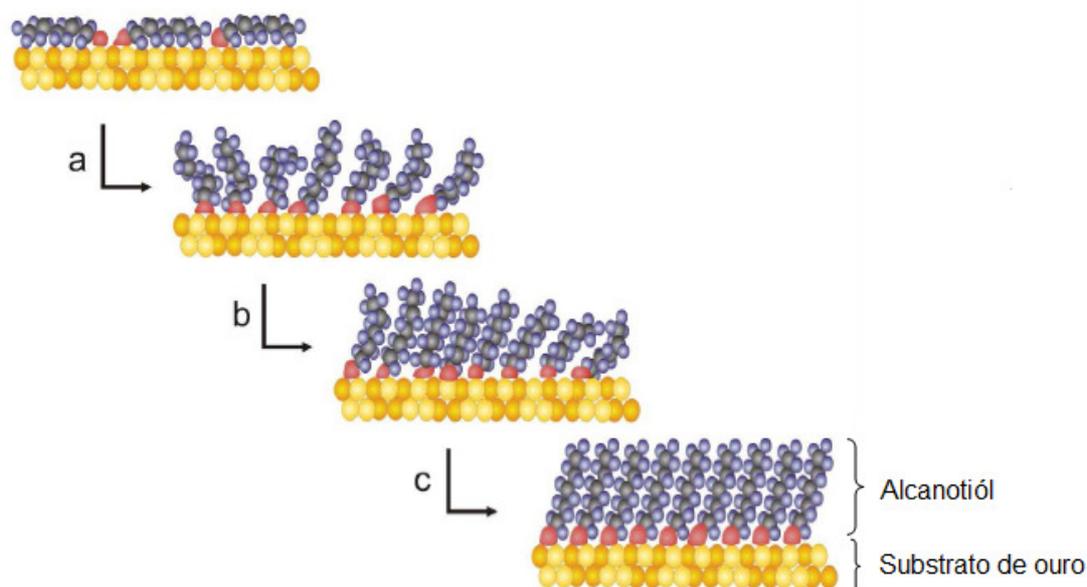


Figura 2. Esquema da cinética de formação de SAM; (a) a etapa inicial é caracterizada pela rápida adsorção e crescimento da espessura do filme, seguida por um processo mais lento (b) de adsorção e organização, até a formação final (c) da monocamada auto-organizada [adaptado de CANCINO, 2008].

A estabilidade e reprodutibilidade de SAMs estão diretamente relacionadas com a planaridade da superfície do eletrodo, do contrário, a existência de defeitos na monocamada seria inevitável (Figura 3). Dessa forma, faz-se necessário um rigoroso pré-tratamento da superfície antes da formação da monocamada. Várias metodologias de pré-tratamento da superfície de ouro foram já relatadas, incluindo desde polimento mecânico com alumina, oxidação química por meio da radiação UV,

plasma de O_2 , ou por solução fortemente oxidante como H_2SO_4/H_2O_2 (solução piranha) e limpeza eletroquímica em solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 , pela ciclagem do potencial do eletrodo de ouro entre $-0,4$ a $1,5 \text{ V}$ [FREIRE *et al.*, 2003; CANCINO, 2008].

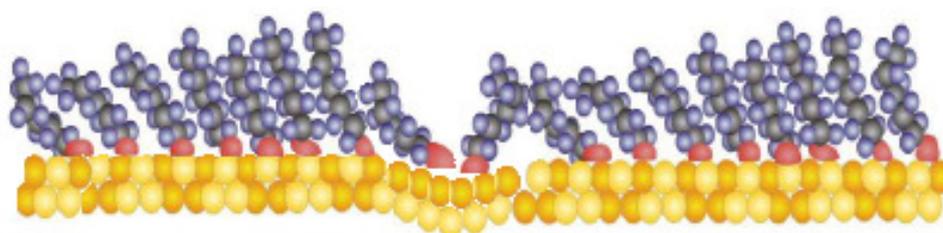


Figura 3. A irregularidade da superfície do substrato de ouro sem pré-tratamento para a formação das monocamadas auto-organizadas de alcanotióis [adaptado de CANCINO, 2008].

Uma possível limitação na preparação de SAMs de ciclodextrina em superfícies de ouro, que pode mascarar a interpretação de dados, consiste na possibilidade de mau recobrimento da superfície do eletrodo. Nesse sentido, uma alternativa para preencher as lacunas oriundas desse mau recobrimento, bloqueando assim a superfície exposta, é a inserção de um tiol adicional. Estudo recente relata a modificação de eletrodos de ouro com derivado tiólico de β -ciclodextrina (β -CDSH), em que moléculas do ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) foram utilizadas para promover o recobrimento da superfície ainda exposta, em consequência do recobrimento inadequado da superfície eletródica (Figura 4) [DAMOS *et al.*, 2007]. Em eletrodo modificado com MUA (Figura 4b), o ácido ferrocenocarboxílico não apresenta resposta voltamétrica; dessa forma, depois do tratamento descrito acima pode-se obter uma superfície completamente recoberta (Figura 4c) e, desse modo, a resposta eletroquímica mensurada em presença do ácido deve-se apenas ao encapsulamento do mesmo na cavidade da ciclodextrina e não à uma transferência eletrônica direta entre o eletrodo e a substância.

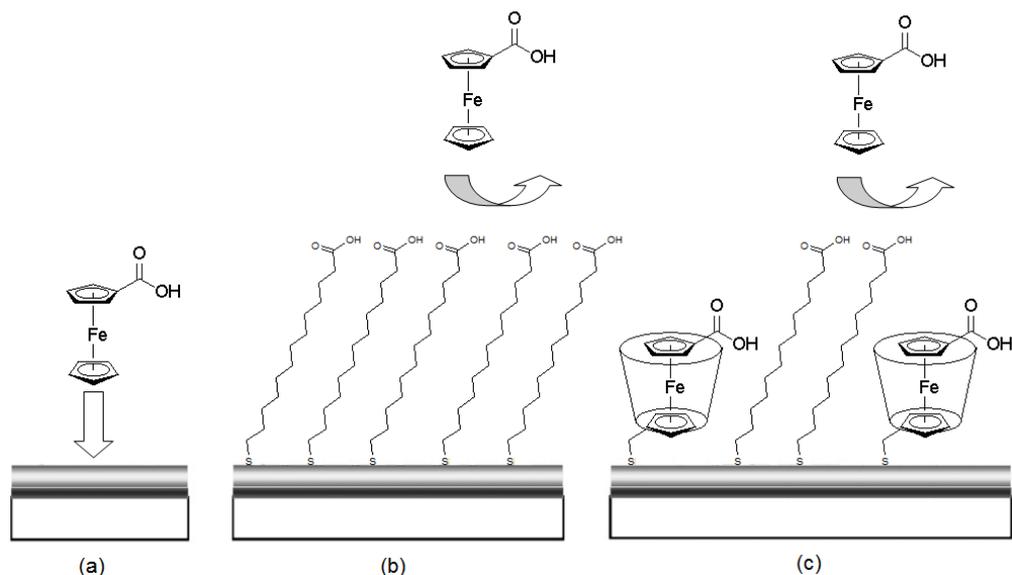


Figura 4. Representação esquemática da interação de ácido ferrocenocarboxílico em eletrodo de ouro: (a) eletrodo limpo; (b) modificado com monocamada de MUA; (c) modificado com monocamada mista de MUA/ β -CDSH [adaptado de DAMOS *et al.*, 2007].

1.3. Antioxidantes e Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e de Nitrogênio (ERN)

Atualmente existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo. A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Esses radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados espécies reativas de oxigênio (ERO) ou nitrogênio (ERN) [BARREIROS *et al.*, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2007].

As principais ERO distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila (HO^\bullet), ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), radicais peroxila (RO_2^\bullet) e alcóxila (RO^\bullet); e os não-radicalares: oxigênio simpleto ($^1\text{O}_2^*$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ozônio (O_3) e ácido hipocloroso (HOCl). Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico (NO^\bullet), dióxido de nitrogênio (NO_2^\bullet), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-) [BARREIROS *et al.*, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2007].

No organismo ERO e ERN, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA. Dessa forma, encontram-se relacionados com várias patologias, tais como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral [BARREIROS *et al.*, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2007].

O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. O termo antioxidante, é definido como qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo [BARREIROS *et al.*, 2006].

Vários estudos demonstram a potente ação antioxidante de polifenóis, isso sugere, inclusive que eles podem prevenir doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Com isso, os compostos fenólicos Mangiferina e Timol atraem a atenção, em razão de suas consideráveis atividades farmacológicas dentre elas a potente atividade antioxidante.

1.3.1. Mangiferina

A mangiferina (2-β-D-glicosil-1,3,6,7-tetraidroxixantona) (Figura 5) é uma C-glicosilxantona de ocorrência natural em diversos vegetais. Uma das espécies em que se pode encontrar mangiferina é a *Mangifera indica* L. (nome comum: mangaueira) [GÓMEZ-ZALETA *et al.*, 2006]. O seu fruto, a manga, é o segundo fruto tropical mais importante e cultivado no mundo sendo o Brasil, o quinto maior produtor [BARRETO *et al.*, 2008].

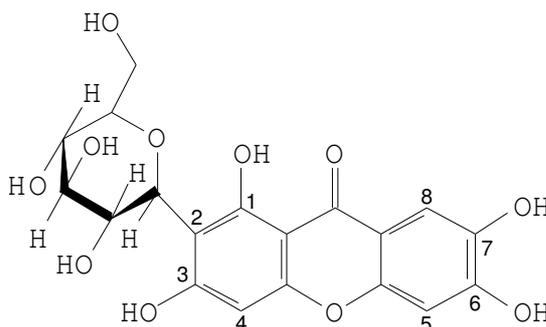


Figura 5. Estrutura numerada da C-glicosilxantona Mangiferina.

Mangifera indica L. (Figura 6) é uma planta largamente usada na medicina tradicional da Índia com um amplo número de ações farmacológicas. O extrato aquoso da casca do caule de *M. indica* L., é utilizado em Cuba como um suplemento nutricional com nome comercial de Vimang®, sendo a mangiferina seu principal componente (10 %) [GARRIDO *et al.*, 2004].



Figura 6. *Mangifera indica* L., (à direita, detalhe das folhas e dos frutos). Adaptado de imagens Google – acesso 14/10/2008.

A mangiferina (MGN) desperta considerável interesse por suas inúmeras atividades farmacológicas, e é bem relatada na literatura. MIURA *et al.* (2001), mostraram que MGN exerce atividade antidiabética em ratos, diminuindo a resistência à insulina. Em estudos posteriores MIURA *et al.* (2001) sugeriram que MGN pode ser benéfica na hiperglicemia e hiperlipidemia, em diabetes do tipo 2.

Segundo LEIRO *et al.* (2003), mangiferina é um potente antioxidante que age primariamente como um sequestrador de ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), modula a expressão de alguns genes e pode ser valiosa no tratamento de desordens imunopatológicas caracterizadas pela sobreprodução de $NO/O_2^{\cdot-}$, que resultam em doenças inflamatórias, aterosclerose ou choque séptico. Com isso, mangiferina pode ser usada na prevenção de carcinogênese, bloqueando o crescimento de tumores ou proteger contra doenças auto-imunes.

PARDO-ANDREU *et al.* (2005), mostraram que mangiferina é capaz de inibir a lipoperoxidação mitocondrial induzida por Fe^{2+} -citrato em mitocôndria isolada de fígado de rato. No processo, mangiferina remove íons ferro do complexo Fe^{2+} -citrato e forma um complexo instável com ele, favorecendo a oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+} com subsequente formação de um complexo mais estável com Fe^{3+} que não é capaz de iniciar e/ou propagar a peroxidação lipídica mitocondrial. Esse complexo Fe^{3+} -mangiferina prejudica a redução de íons férrico a ferroso através de redutores endógenos, como ascorbato, poupando e também prevenindo Fe^{2+} de voltar ao sistema biológico, em que pode participar prontamente de reações do tipo Haber-Weiss, envolvidas na formação de HO^{\cdot} .

Em estudos posteriores, PARDO-ANDREU *et al.* (2006), mostraram que mangiferina é capaz de prevenir danos de processos patológicos mediados por ferro e ERO, tais como β -talassemia, ataxia de Friedreich e hemocromatose, assim como em várias outras condições patológicas, inclusive infecção, neoplasia, cardiomiopatia, aterosclerose, neurodegeneração, e, também envelhecimento, em que o ferro é um possível mediador para ação de ERO. A ação da mangiferina pode ser explicada pela formação de um complexo ativo redox mangiferina- Fe^{3+} , que mimetiza a atividade da dismutase superóxido, que mantém o Fe-quelado, com uma contínua conversão Fe^{3+} - Fe^{2+} - Fe^{3+} , sem acúmulo significativo de Fe^{2+} ou superóxido. A estrutura altamente hidroxilada da mangiferina sugere que tais

mecanismos de interação com ferro, poderiam explicar a proteção contra danos a 2-desoxirribose induzida por ferro visto que, na ausência de ferro, há necessidade de uma concentração muito maior de mangiferina para alcançar o mesmo nível de citoproteção. Como mangiferina é uma substância que pode ser obtida de extratos naturais, ela pode ser usada como uma intervenção terapêutica contra danos em tecidos induzidos por sobrecarga de ferro.

PRABHU *et al.* (2006) demonstraram que o efeito cardioprotetor de mangiferina em miocárdio de ratos infartados, induzidos experimentalmente por isoproterenol pode estar relacionado a suas propriedades antioxidantes e cardiotônicas. Em estudos posteriores, PRABHU & DEVI (2006) mostraram que mangiferina reduz significativamente os níveis de colesterol, triglicerol e ácidos graxos livres em soro e coração de ratos que sofreram infarto cardiotoxico do miocárdio, além de aumentar o nível de fosfolipídios desse tecido; dessa forma mangiferina exhibe efeitos cardioprotetor e hipolipidêmico.

O uso de mangiferina pode reduzir efeitos tóxicos da radiação induzida em pacientes submetidos a radioterapia, bem como também durante as exposições ocupacionais, acidentais e ataques terroristas nucleares, visto que, mangiferina protege linfócitos humanos de lesões ao DNA, quando expostos a radiação- γ . [JAGETIA & BALIGA, 2005; JAGETIA & VENKATESHA, 2006].

AMAZZAL *et al.* (2007) avaliaram a capacidade protetora de mangiferina contra a toxicidade de MPP⁺ (1-metil-4-fenilpiridínio) que induz a formação de ERO, tais como radicais hidroxila e superóxido. MPP⁺ é um metabólito ativo de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) responsável por causar a síndrome parkinsoniana em humanos e animais. Como mangiferina é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, ela é sugerida como um potencial agente para combater o estresse oxidativo observado em doenças neurodegenerativas.

Apesar de todas as atividades farmacológicas de mangiferina, sua solubilidade em água é baixa [GÓMEZ-ZALETA *et al.*, 2006], o que pode limitar suas aplicações farmacológicas. Dessa forma, desenvolvem-se estudos no sentido de se encontrarem derivados de melhor solubilidade e conseqüentemente facilitando sua biodisponibilidade [TENG *et al.*, 2008].

Segundo o estudo cristalográfico realizado por CRUZ Jr. *et al.* (2008), MGN apresenta duas moléculas na cela unitária assimétrica, onde as principais diferenças entre ambas são os ângulos de torção dos carbonos e oxigênios do grupo *D*-glicopiranosose. Desconsiderando o grupo *D*-glicopiranosose, a geometria das duas moléculas é muito similar, com os anéis da unidade xantona quase no plano (Figura 7a). O estudo também mostrou que as moléculas estão unidas por ligações-de-hidrogênio intermolecular, formando uma linha do tipo cabeça-cauda. E os planos também se ligam uns aos outros por outras ligações-de-hidrogênio (Figura 7b).

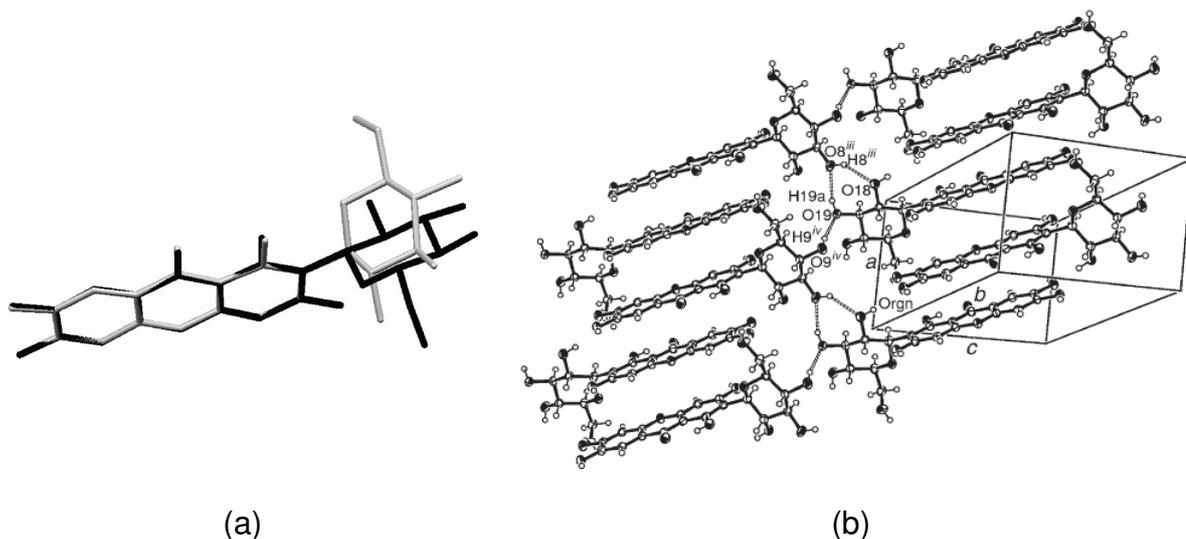


Figura 7. (a) Sobreposição das moléculas de MGN, mostrando a diferença entre os ângulos de torção dos carbonos e oxigênios do grupo *D*-glicopiranosila; (b) empacotamento cristalino de mangiferina [adaptado de CRUZ Jr. *et al.*, 2008].

1.3.2. Timol

O timol é um fenol de origem natural encontrado em diversas espécies vegetais, entre elas as das famílias Lamiaceae e Verbenaceae [EL-GENGAIHI *et al.*, 1996; LEAL *et al.*, 2003]. O timol é o mais abundante constituinte de *Thymus vulgaris* (40 % do óleo) (Figura 8) e do óleo de *Lippia sidoides* (66 % do óleo) [JUKIC & MILOS, 2005; MONTEIRO *et al.*, 2007; DEL NOBILE *et al.*, 2008] e usado, por séculos, como tempero, em remédios caseiro, perfume e inseticida. Na medicina, ele é usado como espasmolítico, antibacteriano, antifúngico, secretolítico, expectorante, antiséptico, anti-helmíntico e antitussígeno [ÖZGÜVEN & TANSI, 1998; LEAL *et al.*,

2003; DEL NOBILE *et al.*, 2008]. Além dessas atividades, o timol isoladamente apresenta ações larvicida, repelente e se mostra tóxico a larvas de *B. microplus* [NOVELINO *et al.*, 2007], assim como apresenta forte atividade antioxidante [JUKIC & MILOS, 2005; MONTEIRO *et al.*, 2007].

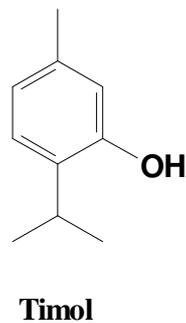


Figura 8. Estrutura de Timol à esquerda e planta *Thymus vulgaris* (tomilho) à direita. Extraído de imagens Google – acesso 14/10/2008.

Para avaliar o espectro de ação do óleo essencial das folhas de *Lippia sidoides*, MONTEIRO *et al.*, (2007) realizaram estudos farmacológicos com respeito a inflamação tópica e lesão gástrica, induzidas por etanol, em ratos. O trabalho mostrou que o óleo essencial não apresentou toxicidade aguda e apresentou potencial como agente gastroprotetor e como antiinflamatório e, além de a atividade antioxidante do óleo essencial poder contribuir para essas ações. Como o timol é o principal constituinte de *Lippia sidoides* (66 % do óleo), os efeitos antiinflamatório e antioxidante podem ser atribuídos a ele.

BEER *et al.* (2007), estudaram os efeitos de timol na atividade espontânea contrátil em músculos lisos. Eles concluíram que timol apresenta efeito analgésico por sua ação nos receptores α_2 -adrenérgico das células nervosas. Ao agonizar os receptores β -adrenérgicos nas células gordurosas, é possível que induza o aumento da síntese de ácidos graxos e glicerol.

BRAGA *et al.* (2007, 2008) investigaram a capacidade de timol de interferir na formação de biofilmes de *Candida albicans*. Eles mostraram que timol interfere na adesão de *C. albicans* nas mucosas de humanos e pode interferir significativamente

não somente com a fase inicial da formação do biofilme, mas também com o biofilme maduro inibindo sua atividade metabólica.

SOMEYA *et al.* (2008), realizaram o estudo da atividade clastogênica de sete medicamentos endodônticos usados na prática dental em humanos, dentre eles o timol. Eles concluíram que timol induz transformações farmacológicas e síntese não programada de DNA em células de embrião de rato sírio, sendo potencialmente mutagênico para células humanas.

O Timol é um efetivo antifúngico com aplicações potenciais no controle de doenças de plantas, particularmente em frutas. SVIRCEV *et al.* (2007) examinaram o efeito de vapores de timol na viabilidade, morfologia e ultraestrutura de *M. fructicola* obtidas da superfície de ameixas infetadas. Eles mostraram que quando timol é depositado na superfície fúngica da fruta, parece induzir séria desintegração de membranas e organelas no nível celular.

MULINACCI *et al.* (1996), estudaram a estrutura conformacional do complexo Timol: β -CD usando as técnicas de H^1 RMN e modelagem molecular. Eles mostraram que dois possíveis complexos podem ser formados, A e B uma vez que ambas as estruturas mostraram os mesmos valores de energia conformacional (Figura 9). Os dados experimentais, contudo, mostraram que o complexo real que existe em solução aquosa é o complexo A, que tem os hidrogênios do grupo isopropila do timol do lado largo da cavidade hidrofóbica da β -CD.

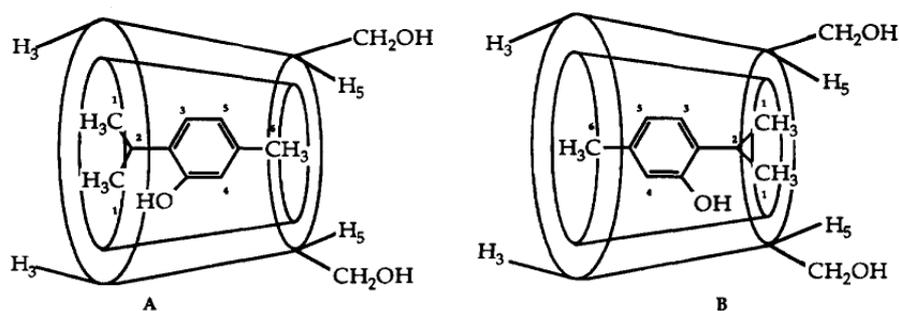


Figura 9. Esquema dos dois possíveis complexos A e B, entre Timol e β -CD [adaptado de MULINACCI *et al.*, 1996].

2. OBJETIVOS

A Mangiferina e o Timol são compostos que apresentam um interessante espectro de atividades biológicas, principalmente antioxidante, mas que mostram baixa solubilidade no meio aquoso e, no caso do timol, além da baixa solubilidade no meio aquoso, também se mostra tóxico e mutagênico. Tendo em vista todas as vantagens que ciclodextrinas podem oferecer na forma de complexos de inclusão, buscou-se estudar a interação de mangiferina e timol com β -ciclodextrina através de técnicas espectroscópicas e eletroquímicas.

Desta forma, os objetivos do presente trabalho são:

- ✓ Verificar a interação de mangiferina e timol com β -CD de forma a estimar suas respectivas constantes de formação (K_F);
- ✓ Avaliar a interação, em solução, de mangiferina com β -CD, e a capacidade antioxidante de mangiferina na forma livre e complexada com β -CD na razão molar 1:1 e 1:2, com a utilização da espectroscopia de UV-VIS. Utilizar o mesmo procedimento para avaliar a interação de timol com β -CD em solução;
- ✓ Realizar o estudo espacial dos complexos MGN: β -CD e Timol: β -CD, utilizando a espectroscopia de RMN;
- ✓ Realizar o estudo eletroquímico de mangiferina e timol em meio prótico, em eletrodo de carbono vítreo na presença e na ausência de β -CD e, ainda, em eletrodo de ouro, de forma a preparar, caracterizar e utilizar os eletrodos de ouro modificados com monocamadas mistas de β -CDSH + MUA, estudar a transferência eletrônica de mangiferina e timol através de técnicas eletroquímicas;
- ✓ Determinar ainda, o excesso superficial da monocamada auto-organizada, através do estudo de dessorção redutiva;
- ✓ Preparar sensores de nanotubos de carbono, para estudar o comportamento eletroquímico de mangiferina e timol.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Produtos Químicos e Solventes

A Mangiferina (MGN) pura ($M_r = 422 \text{ g mol}^{-1}$) foi gentilmente cedida pela Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Salles Trevisan, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, em colaboração com o Laboratório de Eletroquímica do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL. A Mangiferina foi obtida do extrato etanólico das cascas de *Mangifera Indica* L. e recristalizada em solução aquosa de acetato de etila. Todos os dados físico-químicos (IV, EM, $^1\text{H-RMN}$, $^{13}\text{C-RMN}$) são compatíveis com a estrutura química do composto.

O Timol ($M_r = 140,22 \text{ g mol}^{-1}$) foi obtido da Ecibra. O radical DPPH $^{\bullet}$ (2,2'-difenil-2-picril-hidrazil) e β -ciclodextrina (β -CD) foram adquiridos da Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Ácido Gálico (AG), iodo, tiouréia, hidróxido de sódio (NaOH), sulfato de sódio (Na_2SO_4) e hidrogenossulfato de potássio (KHSO_4) têm procedência da Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil). Trifenilfosfina (PPh_3) foi adquirida da Fluka. Ácido ferrocenocarboxílico ($\text{Fc-CO}_2\text{H}$) e metóxido de sódio (MeOH) foram obtidos da Alfa Aesar. Ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) foi obtido da Merck. Nanotubos de carbono (NTC) de parede múltipla (>95 % pureza, 10-20 nm de diâmetro), foram adquiridos da NanoLab, Inc. (Brighton, MA, USA) e Aldrich. Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas em água ultrapura (18 $\text{M}\Omega \text{ cm}$) de um sistema de purificação Milli-Q da Millipore Inc.

3.1.1. Síntese de Tio- β -ciclodextrina

A β -CDSH (β -ciclodextrina tiolada) foi sintetizada de acordo com o procedimento descrito na literatura por CHOI *et al.* (2005).

3.1.2. Síntese de per-7-iodo- β -ciclodextrina

Para a síntese da per-7-iodo- β -Ciclodextrina, 3,48 g de trifetilfosfina (PPh_3) foi dissolvida sob agitação em 13,78 mL de *N,N*-dimetilformamida (DMF) previamente seco sob atmosfera de nitrogênio (N_2); em seguida, 3,49 g de Iodo (I_2) foi adicionado lenta e cuidadosamente até levar a uma coloração castanho escura. Ao se completar metade da quantidade de iodo prevista, um precipitado ligeiramente claro é formado, mas, ao se prosseguir com a adição de iodo, o precipitado solubiliza-se novamente. Finalmente, 0,58 g de β -CD hidratada, seca sob pressão reduzida a 100 °C, foi adicionada à esta solução marrom e o sistema mantido sob agitação, a 70 °C e sob atmosfera de N_2 , por 18 horas. Ao final, a solução foi concentrada sob vácuo e em seguida o pH da solução ajustado a pH 9-10 pela adição de metóxido de sódio 3,0 mol L⁻¹. A solução foi deixada em repouso por 30 minutos, para destruir o éster formado na reação e, em seguida, a mistura foi vertida sobre 35 mL de metanol (MeOH) e deixada em repouso por ~25 minutos para precipitação. O precipitado formado foi filtrado e lavado com MeOH até não mais colorir a solução. O produto obtido (1) foi seco sob vácuo à temperatura ambiente e encaminhado para análise por RMN em dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$). Rendimento 43,6 %.

3.1.3. Síntese de per-7-tio- β -ciclodextrina

A iodo- β -Ciclodextrina (0,4241 g) foi dissolvida sob agitação em 4,4 mL de DMF seco; depois da completa solubilização da iodo- β -ciclodextrina, 0,1364 g de tiouréia foi adicionado à solução e a mistura foi aquecida a 70 °C, sob atmosfera de N_2 . Decorridas 19 horas de agitação, o DMF foi removido sob sucção, sendo obtido um óleo amarelo, que foi dissolvido em 22 mL de água. Subsequentemente, uma solução aquosa de $5,71 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹ de NaOH foi adicionada e o sistema mantido sob refluxo e em atmosfera de N_2 . Após 1 hora, a suspensão foi acidificada com solução aquosa de $3,23 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹ de KHSO_4 . O precipitado foi filtrado e abundantemente lavado com água, resultando em um pó fino de coloração

acinzentado. O precipitado (2) foi seco sob vácuo e encaminhado para análise por RMN em DMSO- d_6 (Figura 10). Rendimento 16,2 %.

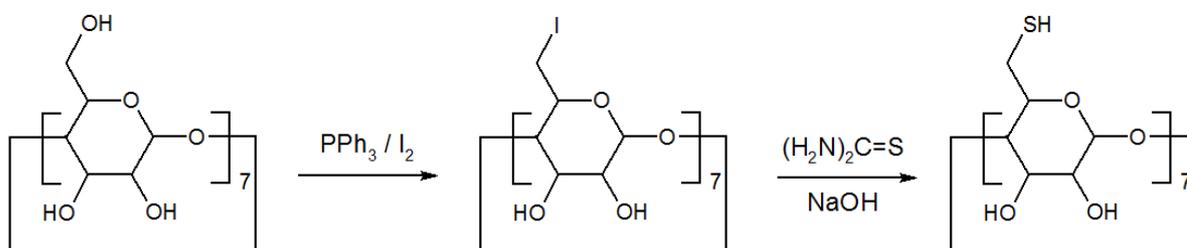


Figura 10. Esquema sintético de per-7-tio-β-ciclodextrina.

3.1.4. Caracterização por RMN dos Produtos da Síntese 1 e 2

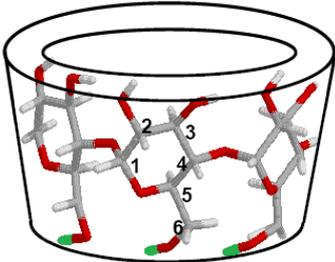
A caracterização de **1** e **2** mostrou concordância com os dados da literatura [CHOI *et al.*, 2005]. Os deslocamentos químicos e multiplicidades do composto denominado **1** estão apresentados na Tabela 2, confirmando ser per-7-iodo-β-ciclodextrina.

Tabela 2. Dados de ^1H NMR (400 MHz, CD_3SOCD_3) para o composto **1**.

	H	δ ^1H	Multiplicidade
	H-2; H-4; H-6 _a	3,2-3,4	m; 21H
	H-3; H-5	3,5-3,7	m; 14H
	H-6 _b	3,8	d; 7H
	H-1	4,9	d
	OH-3	5,9	d; 7H
	OH-2	6,05	d; 7H

O composto denominado **2** foi confirmado ser per-7-tio-β-ciclodextrina, de acordo com os dados de deslocamento químico e multiplicidade, como mostrado na Tabela 3. Tendo em vista sua caracterização, a β-CDSH foi utilizada na preparação da monocamada auto-organizada.

Tabela 3. Dados de ^1H NMR (400 MHz, CD_3SOCD_3) para o composto **2**.

	H	δ ^1H	Multiplicidade
	SH	2,1	t; 7H
	H-6 _a	2,7	m; 7H
	H-6 _b	3,2	br, m; 7H
	H-2; H-4; H-5; H-3	3,4-3,7	m; 28H
	H-1	4,9	d; 7H
	OH-3	5,83	s; 7H
	OH-2	5,95	d; 7H

3.2. Instrumentos

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PGSTAT (AUT73222) da Autolab[®] em um sistema de três eletrodos: eletrodo de carbono vítreo (BAS, diâmetro 1,6 mm) e eletrodos de ouro (BAS, diâmetro 1,6 mm e Methrom, diâmetro 3,0 mm), eletrodo de fio de platina espiralado como auxiliar e como eletrodo de referência $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{Cl}^-$ (saturado) da BAS. As medidas foram realizadas à temperatura ambiente. O tratamento posterior dos gráficos foi realizado através do programa Origin 6.0. A verificação do pH das soluções tampão foi realizado em pHmetro da Quimis.

Os espectros no UV-Vis foram obtidos em um espectrômetro Shimadzu Multispec-1501, numa faixa de absorção de 200 a 400 nm.

O estudo da atividade antioxidante foi realizado monitorando-se o consumo do radical livre DPPH^\bullet , em um espectrofotômetro UV-Vis Femto 700 Plµs.

Todos os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizados em um espectrômetro BRUKER AVANCE 400, operando na frequência de 400 MHz para ^1H (9,4 Tesla). TMS foi o padrão interno e as soluções foram preparadas em $\text{DMSO}-d_6$.

3.2.1. Limpeza Padrão dos Eletrodos de Ouro e Carbono Vítreo

O pré-tratamento da superfície de ouro é uma das etapas mais importantes na formação de monocamadas auto-organizadas. No presente trabalho, os eletrodos de ouro passaram por uma limpeza mecânica seguida de uma etapa eletroquímica, no entanto, para os fins utilizados, os eletrodos de carbono vítreo passaram apenas por uma limpeza mecânica de polimento.

Inicialmente os eletrodos de ouro (BAS e METHROM) e carbono vítreo (BAS) foram polidos com alumina (0,3 μm) e lavados abundantemente com água, antes de serem levados ao ultrassom por 30 s em etanol; posteriormente foram polidos com pasta de diamante (0,1 μm) e o excesso retirado com algodão embebido em acetona, antes de serem novamente levados ao ultrassom por 30s em etanol para remoção das partículas residuais. Em seguida, os eletrodos de ouro foram lavados com água e submetidos ao tratamento eletroquímico, em solução de H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} , na faixa de potencial de -0,4 a 1,5 V (0,1 V s^{-1}) durante 10 ciclos.

Após o procedimento de limpeza dos eletrodos de ouro e carbono vítreo, foi realizado o teste com a sonda ferricianeto de potássio [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$], para verificar a área eletroativa do eletrodo de ouro. Em seguida, os eletrodos foram utilizados no estudo eletroquímico de MGN ou Timol, na presença e na ausência de β -CD.

3.2.2. Eletrodo de Ouro Modificado com SAM Mista de β -CDSH + MUA

No preparo das SAM foram utilizadas duas metodologias descritas na literatura. A primeira segundo ROJAS *et al.* (1995), e a segunda conforme CHOI *et al.* (2005).

Metodologia segundo ROJAS *et al.* (1995).

A preparação da monocamada foi realizada em duas etapas. Primeiro os eletrodos de ouro limpos foram imersos em uma solução $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} de β -CDSH em DMSO: H_2O (60:40 v/v) desaerada com N_2 , e permaneceram nesta

solução por toda a noite. Em seguida, para recobrir os defeitos, os eletrodos foram então imersos em uma solução $0,75 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de MUA + $0,75 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de Fc-CO₂H em EtOH:H₂O (50:50 v/v) por 2 h. Antes dos experimentos voltamétricos, os eletrodos foram lavados abundantemente com EtOH e água.

Metodologia segundo CHOI *et al.* (2005)

Depois de limpos, os eletrodos foram introduzidos em uma solução contendo uma razão apropriada de β -CDSH:Fe-CO₂H:MUA (2:2:1 m/m/m) em uma mistura de solventes (DMSO:EtOH:H₂O – 5:3:2 v/v/v). Inicialmente, os eletrodos foram levados a uma solução de β -CDSH dissolvida em DMSO, desaerada com N₂ e sob agitação, em que se adicionou o Fc-CO₂H solubilizado em EtOH. Os eletrodos permaneceram na solução por 1 hora, para que se formasse o complexo entre Fc-CO₂H e a cavidade da β -CDSH. Depois disso, a MUA e água foram adicionadas à solução e a mistura foi novamente desaerada com N₂. Os eletrodos permaneceram em repouso nessa solução por 24 horas. Antes dos experimentos voltamétricos, os eletrodos foram lavados abundantemente com EtOH e água.

A metodologia que apresentou os melhores resultados foi a realizada segundo CHOI *et al.* (2005).

3.2.3. Eletrodos de Carbono Vítreo Modificado com Nanotubos de Carbono (NTC)

Três metodologias de construção do sensor de NTC foram realizadas para verificar em qual delas é observado os melhores valores de corrente e potencial de pico, como também os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).

Eletrodo modificado com NTC denominado: Sensor NTC-1

Foi retirado 7,5 μL de uma solução de NTC ($0,2 \text{ mg mL}^{-1}$) disperso em DMF utilizando ultrassom por 2 h, e colocada sobre a superfície de um eletrodo de carbono vítreo (CV) devidamente limpo, o qual foi levado a estufa a 80 °C por 30 min. Logo após este procedimento, o eletrodo foi lavado cuidadosamente com água deionizada e disposto para análise eletroquímica de MGN e Timol.

Eletrodo modificado com NTC denominado: Sensor NTC ácido + β -CD

Para eliminar impurezas de metal, o NTC foi suspenso em solução $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido nítrico durante 24 h a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, lavado exaustivamente com água deionizada até pH neutro e finalmente submetido a secagem.

Uma quantidade de 1,0 mg do NTC foi dispersa utilizando ultrassom em 1,0 mL de β -CD a 10 % em água. A essa solução, foi adicionado 30 % do seu volume total de DMF. 7,5 μL desta solução foram adicionadas à superfície de um eletrodo de CV previamente limpo e levado a estufa, a $80 \text{ }^\circ\text{C}$, por 30 min e, depois disso, lavado cuidadosamente com água deionizada, antes de ser utilizado [ALARCÓN-ANGELES *et al.*, 2008].

Eletrodo modificado com NTC denominado: Sensor NTC-2

2,0 mg de NTC (denominado NTC-2) foi suspenso em 10,0 mL de DMF e a solução foi dispersa utilizando ultrassom por 30 min e, em seguida, a solução foi separada em duas porções de 5,0 mL cada. A uma das porções adicionou-se 0,5 mg de β -CD. Ambas as soluções foram dispersas utilizando ultrassom por 2 h antes de serem depositadas sobre a superfície de eletrodos de CV. Da solução contendo apenas NTC-2 foram utilizados 10 μL e da solução contendo NTC-2 + β -CD foram utilizados 15 μL . Os eletrodos foram levados à estufa a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min e depois disso lavados cuidadosamente com água deionizada antes de serem utilizados.

3.3. Preparo das Soluções

Soluções-estoque da MGN e Timol foram preparadas na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em EtOH imediatamente antes de sua utilização no estudo eletroquímico. Todos os estudos eletroquímicos de SAM foram realizados utilizando solução de Na_2SO_4 $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte.

Desenvolveu-se o estudo da dependência do potencial de oxidação dos compostos Mangiferina e Timol com o pH, utilizando-se a técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD). Os tampões usados foram preparados adicionando-se

volumes conhecidos de eletrólitos 1 e 2, e completando-se o volume para 100 mL com água deionizada de acordo com a Tabela 4.

Tabela 4. Soluções Tampões para eletrólito suporte.

Tampão (diluído para 100 mL)					
Solução do eletrólito 1	C (mol L ⁻¹)	Solução do eletrólito 2	C (mol L ⁻¹)	pH	Força iônica
KCl (25 mL)	0,20	+ HCl (42,5 mL)	0,20	0,60	0,135
KCl (25 mL)	0,20	+ HCl (6,5 mL)	0,20	1,10	0,063
KCl (25 mL)	0,20	+ HCl (6,5 mL)	0,20	2,00	0,063
NaOAc (3,7 mL)	0,20	+ HOAc (46,3 mL)	0,20	2,93	0,100
NaOAc (13,2 mL)	0,20	+ HOAc (36,8 mL)	0,20	4,00	0,100
NaOAc (7,2 mL)	1,00	+ HOAc (12,5 mL)	1,00	4,47	0,197
NaOAc (41,2 mL)	0,20	+ HOAc (8,8 mL)	0,20	5,10	0,100
Na ₂ HPO ₄ (6,15 mL)	0,20	+ NaH ₂ PO ₄ (43,85 mL)	0,20	5,90	0,125
Na ₂ HPO ₄ (30,5 mL)	0,20	+ NaH ₂ PO ₄ (19,5 mL)	0,20	6,82	0,222
Na ₂ HPO ₄ (47,35 mL)	0,20	+ NaH ₂ PO ₄ (2,65 mL)	0,20	7,80	0,289
Na ₂ CO ₃ (10 mL)	0,10	+ NaHCO ₃ (90 mL)	0,10	9,11	0,105
NaHCO ₃ (50 mL)	0,05	+ NaOH (12,2 mL)	0,10	10,14	0,037
Na ₂ HPO ₄ (50 mL)	0,05	+ NaOH (3,3 mL)	0,10	10,91	0,368
Na ₂ HPO ₄ (50 mL)	0,05	+ NaOH (23 mL)	0,10	11,91	0,061

3.4. Estudos Eletroquímicos

3.4.1. Estudo da Mangiferina ou Timol em Solução com β -CD em Eletrodo de Carbono Vítreo

Uma solução aquosa de MGN ou Timol ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foi preparada em Na_2SO_4 $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando-se 20 % (v/v) de EtOH para solubilizar as substâncias e sua resposta eletroquímica foi registrada. Em seguida, β -CD foi adicionada nas concentrações $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, tendo-se sempre o cuidado de polir o eletrodo depois de cada varredura.

3.4.2. Determinação da Mangiferina e do Timol por VC, em SAM, e por Eletrodo Modificado com NTC

A 10,0 mL da solução de Na_2SO_4 $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ contidos na célula eletroquímica adicionou-se alíquotas de solução-estoque de MGN ou Timol. Depois da adição de cada alíquota e agitação, foram realizadas varreduras na velocidade de $0,01 \text{ V s}^{-1}$, na faixa de potencial de 0 a 0,9 V. As concentrações escolhidas para a confecção da curva foram: 5; 10; 15; 20; 25; 30; 40; 45; 50; 55; 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ou até a saturação da monocamada. No estudo realizado em eletrodo modificado com NTC, foi empregado como eletrólito suporte, tampão fosfato pH 7,0 ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$), utilizando o procedimento de efeito da concentração reportado acima.

3.5. Estudos Espectroscópicos

3.5.1. Análise Espectroscópica dos Complexos MGN: β -CD e Timol: β -CD

Uma solução aquosa de MGN ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) foi preparada com 20 % (v/v) de etanol. Sete alíquotas de 25 mL dessa solução foram retiradas e misturadas com quantidades apropriadas de β -CD para obter concentrações de $5,0 \times 10^{-5}$ a $7,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de β -CD. A mistura foi agitada (170 rpm) por 2 horas, a 25 °C. Os

valores de absorção foram medidos na faixa de comprimento de onda de 240 a 368 nm. O mesmo procedimento foi realizado para o complexo Timol:β-CD.

Para verificar a influência de etanol no processo de encapsulação, uma solução aquosa de MGN ($36 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi preparada com 1,5 vol. % de etanol. Sete alíquotas de 25 mL dessa solução foram retiradas e misturadas com quantidades apropriadas de β-CD para a obtenção de concentrações de $3,0 \times 10^{-4}$ a $7,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de β-CD. A mistura foi agitada (170 rpm) por 4 horas, a 25 °C. Os valores de absorção foram medidos a 368 nm. Todas as análises foram realizadas em um espectrômetro Shimadzu Multispec-1501 UV-VIS.

3.5.2. Preparo do Complexo MGN:β-CD

O complexo de inclusão de MGN em β-CD foi obtido misturando-se MGN com β-CD em uma razão molar de 1:1 em DMSO- d_6

3.6. Capacidade Antioxidante Frente ao Radical DPPH[•]

A avaliação da capacidade antioxidante de MGN e β-CD e dos complexos MGN:β-CD (1:1 e 1:2) foi realizado de acordo com SÂNCHEZ-MORENO *et al.* (1999) com algumas modificações.

3.6.1. Curva de Calibração

A curva de calibração do DPPH[•] foi construída numa faixa de concentração de 1 a 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Inicialmente foram preparados 25,0 mL de solução estoque de DPPH[•] em metanol na concentração de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, que foi mantida sob refrigeração e protegida da luz. Em seguida, foram efetuadas diluições de 1; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A curva de calibração (Figura 11) foi construída a partir dos valores da absorvência a 516 nm de todas as soluções preparadas nas diferentes concentrações descritas acima.

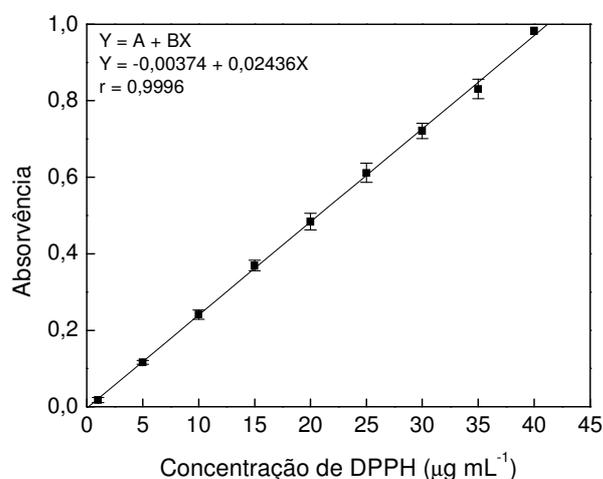


Figura 11. Curva de calibração do DPPH*. Medida em absorvência, a $\lambda = 516$ nm. Experimento realizado em triplicata.

3.6.2. Preparo das Amostras para Análise da Capacidade Antioxidante

Soluções aquosas de MGN e β -CD foram preparadas em etanol 5 % (v/v). Para a formação do complexo MGN: β -CD (razão molar 1:1): 0,22 mg de MGN foi dissolvido em 0,50 mL de etanol e 0,56 mg de β -CD foi acrescentado para um volume total de 10 mL, a 25 °C. A mistura foi agitada (40 rpm) por 24 h em ausência de luz. A razão molar do complexo é 1:1. O complexo foi identificado como complexo 1A. A concentração final de cada composto foi de 2,17 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de MGN e 5,64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de β -CD. Esse mesmo experimento foi repetido para a formação de complexo 2A, com concentração final de 4,35 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de MGN e 11,29 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de β -CD; e o complexo 3A foi obtido com concentração final de 21,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de MGN e 56,45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de β -CD. O complexo MGN: β -CD (1:2) também foi avaliado, e identificado como 1B, 2B e 3B.

3.6.3. Medidas da Capacidade Antioxidante das Amostras

A capacidade antioxidante das amostras MGN, β -CD, dos complexos MGN: β -CD (razão molar 1:1 e 1:2) e do controle positivo ácido gálico (AG) foram medidas em termos de sua capacidade de sequestrar radicais, usando o método do DPPH \cdot . Assim, 0,30 mL das soluções de MGN, β -CD ou MGN: β -CD foi misturado, a cada vez, com 2,7 mL da solução do radical DPPH \cdot (40 μ g mL $^{-1}$ em metanol) em uma cubeta de quartzo de 3,0 mL. A mistura foi homogeneizada e mantida ao abrigo da luz antes da análise. Os valores de absorção do DPPH \cdot foram obtidos a 516 nm a cada 5 min durante 50 min. A porcentagem de DPPH \cdot remanescente (DPPH \cdot _R) foi calculada como segue:

$$\%DPPH\cdot_R = 100 \times \left[\frac{(DPPH\cdot)_t}{(DPPH\cdot)_{t=0}} \right] \quad \text{Eq. 1}$$

onde: DPPH \cdot _t corresponde à concentração de DPPH \cdot no tempo t; DPPH \cdot _{t=0} é a concentração DPPH \cdot no tempo zero. Os resultados encontram-se como DPPH \cdot (%) em função do tempo. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A porcentagem da atividade seqüestradora de radicais (RSA-DPPH \cdot) de cada amostra foi calculado como abaixo:

$$\%RSA = (1 - A_S / A_D) \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

onde: A_S é a absorvência da solução quando a amostra foi adicionada em um nível particular; A_D é a absorvência da solução de DPPH \cdot . Os resultados encontram-se como RSA%-DPPH \cdot contra a concentração total de amostra na cubeta.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo UV-Vis

O espectro UV-Vis da MGN em 20 % (v/v) EtOH (Figura 12) mostra quatro bandas de absorção: a primeira em $\lambda = 240$ nm pode ser atribuída à energia média da transição $\pi \rightarrow \pi^*$ do anel aromático, enquanto que a segunda, em $\lambda = 257$ nm, é devida à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ no sistema s-trans enona pela presença da β -dicetona cíclica. A banda em $\lambda = 318$ nm está relacionada à transição $n \rightarrow \pi^*$ no anel aromático. A última banda, próxima à região do visível, pode ser atribuída a absorção de transferência de carga intramolecular [GÓMEZ-ZALETA *et al.*, 2006].

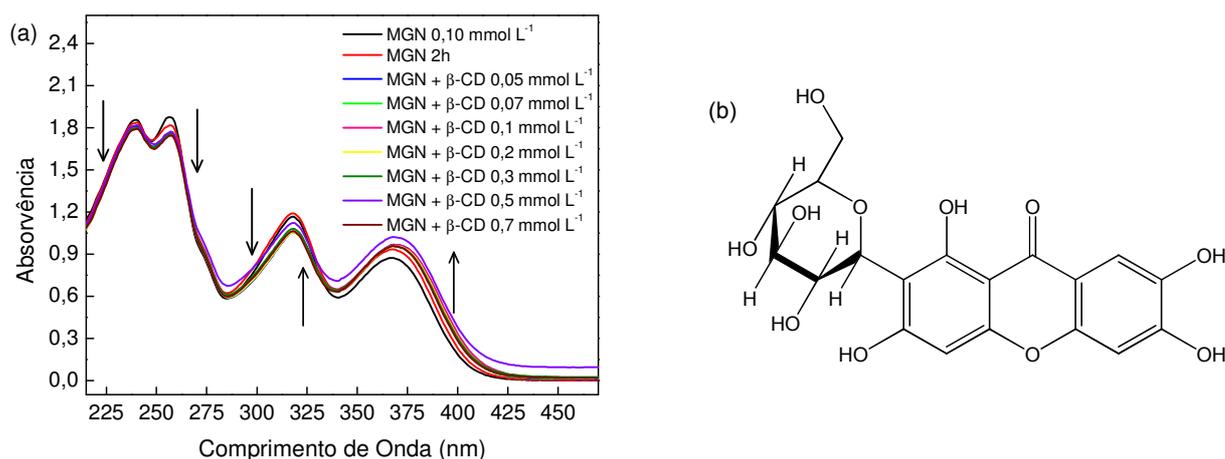


Figura 12. (a) Espectro UV-Vis de MGN na ausência e presença de β -CD. $[MGN] = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, meio aquoso com 20 % EtOH. (b) estrutura de Mangiferina

A Figura 12 mostra a evolução do espectro de absorção de MGN com o aumento da concentração de β -CD. Os resultados do estudo espectroscópico de MGN em solução aquosa 20 % (v/v) EtOH com o aumento da concentração de β -CD mostram que, nos comprimentos de onda de $\lambda = 340$ e 368 nm a absorvência de MGN aumenta e, em $\lambda = 240$, 247 , 257 e 318 nm a absorvência diminui. Tal comportamento pode estar relacionado, em princípio, à desagregação das moléculas

de MGN (visto que as moléculas de MGN encontram-se ligadas por ligações de hidrogênio intermolecular, CRUZ Jr. *et al.*, 2008), e posteriormente a sua inclusão na cavidade da β -CD. Comportamento similar é reportado na literatura, em que se relata que a complexação com ciclodextrinas provoca desagregação de dímeros de moléculas de corantes, pela inclusão seletiva na cavidade da ciclodextrina do monômero dos corantes fenotiazina e cianina [RAJ & RAMARAJ, 1996; RAO *et al.*, 1998].

A formação do complexo de inclusão de MGN com β -CD foi realizado mantendo-se fixa a concentração de MGN e variando a concentração de β -CD. Utilizando a equação de Benesi-Hildebrand (Equação 3) [HERNÁNDEZ-BENITO *et al.*, 1999] foi possível calcular as constantes de dissociação K_D e formação $K_F = 1/K_D$ para o complexo estudado (Tabela 4)

$$\frac{[CD][S]_0}{\Delta A} = \frac{K_D}{\Delta \epsilon} + \frac{[CD]}{\Delta \epsilon} \quad \text{Eq. 3}$$

em que: [CD] refere-se a concentração de β -CD; $[S]_0$ a concentração inicial do substrato; K_D é a constante de dissociação do complexo; $\Delta \epsilon$ corresponde a variação da absorvância molar e ΔA é a variação da absorvância.

Traçando o gráfico dos valores de $[CD] [S]_0 / \Delta A$ contra [CD] foi possível encontrar uma linha reta. O quociente entre os valores do intercepto do eixo y e da inclinação nos dá o valor de K_D . A Figura 13 mostra o excelente ajuste da equação de Benesi-Hildebrand para vários comprimentos de onda. A Tabela 4 mostra os resultados obtidos para seis comprimentos de onda diferentes, em 2h de contato. Observa-se, que os valores de K_F estão na ordem de grandeza de 10^4 e 10^5 L mol⁻¹ para 2h de contato a depender do comprimento de onda.

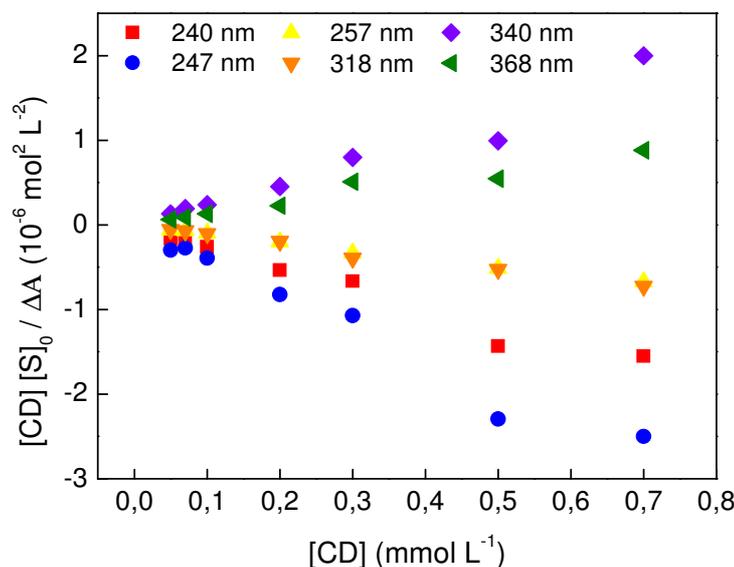


Figura 13. Determinação da constante de equilíbrio do complexo MGN:β-CD, de acordo com a equação de Benesi-Hildebrand, para vários comprimentos de onda; [MGN] = $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (20 % EtOH). Tempo de contato de 2h.

Tabela 5. Constante de dissociação e formação do complexo MGN:β-CD para 2 h de contato.

λ / nm	2h	
	K_D / mol L ⁻¹	K_F / L mol ⁻¹
240	$9,03 \times 10^{-6}$	$1,11 \times 10^5$
247	$3,70 \times 10^{-5}$	$2,70 \times 10^4$
257	$4,30 \times 10^{-6}$	$2,32 \times 10^5$
318	$4,10 \times 10^{-6}$	$2,44 \times 10^5$
340	$1,97 \times 10^{-5}$	$5,08 \times 10^4$
368	$5,88 \times 10^{-6}$	$1,70 \times 10^5$

Nota: valores obtidos para equação de Benesi-Hildebrand. Solução aquosa com 20% EtOH. $[S]_0 = 1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹; $[CD] = 0; 5,0 \times 10^{-5}; 7,0 \times 10^{-5}; 1,0 \times 10^{-4}; 2,0 \times 10^{-4}; 3,0 \times 10^{-4}; 5,0 \times 10^{-4}; 7,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

ABREU *et al.* (2007), mostraram a influência da concentração de etanol na formação do complexo β-lapachona:β-CD. Segundo eles, quanto maior a concentração de EtOH no meio, menor a interação da β-lapachona com a cavidade da β-CD devido à competitividade entre as moléculas.

Dessa forma, estudou-se a interação de MGN com β -CD na presença de 1,5 % (v/v) de EtOH; além disso, nesse experimento optou-se por estudar uma faixa maior de concentrações de β -CD, sendo avaliado apenas o comprimento de onda de 368 nm. O diagrama apresentado na Figura 14 mostra que para concentrações na faixa $3,0 \times 10^{-5}$ a $7,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, MGN apresenta um comportamento crescente com relação a $[CD] [S]_0 / \Delta A$ e decrescente para a faixa de concentração de β -CD de $1,0 \times 10^{-3}$ a $7,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹.

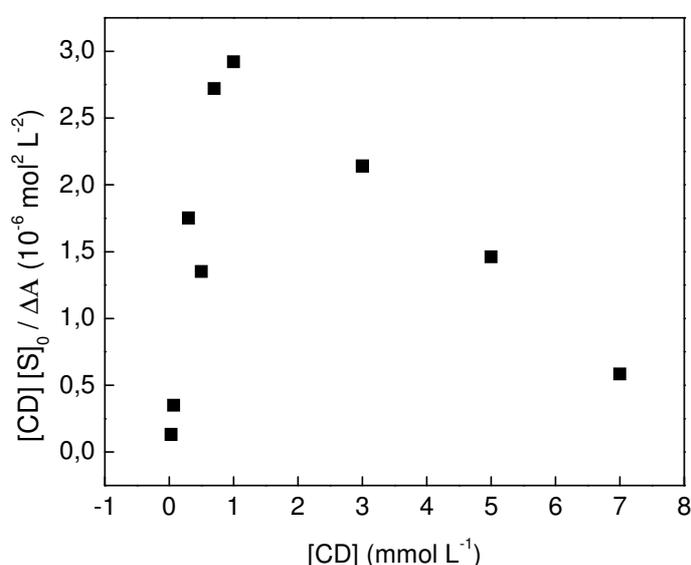


Figura 14. Determinação da constante de equilíbrio do complexo MGN: β -CD, de acordo com a equação de Benesi-Hildebrand, para $\lambda = 368$ nm (1,5 % EtOH). $[S]_0 = 36 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[CD] = 3,0 \times 10^{-5}$; $7,0 \times 10^{-5}$; $3,0 \times 10^{-4}$; $5,0 \times 10^{-4}$; $7,0 \times 10^{-4}$, $1,0 \times 10^{-3}$; $3,0 \times 10^{-3}$; 5×10^{-3} e $7,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Tempo de contato de 2h.

As constantes de formação determinadas no presente experimento estão apresentadas na Tabela 5, para os cinco primeiros e quatro últimos pontos do gráfico, em um tempo de contato de 2 e 4h respectivamente. Nota-se que, a constante de formação correspondente aos cinco primeiros pontos do gráfico, no tempo de 2h, está na mesma ordem de grandeza que as constantes de formação apresentadas na Tabela 4 para o experimento com 20 % de etanol. No entanto, vê-se que a constante de formação do complexo MGN: β -CD é influenciada tanto pelo tempo de contato quanto pelo aumento na concentração de ciclodextrina.

Tabela 6. Constante de formação para o complexo MGN: β -CD para 2 e 4 h de contato.

	2h	4h
Cinco primeiros pontos	$K_F = 2,19 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$	$K_F = 1,37 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$
Quatro últimos pontos	$K_F = 1,16 \times 10^2 \text{ L mol}^{-1}$	$K_F = 9,78 \times 10^1 \text{ L mol}^{-1}$

Determinou-se a cinética de complexação para MGN e β -CD, acompanhando o pico de absorção da MGN, no comprimento de onda de 368 nm, em função do tempo, utilizando-se a técnica UV-VIS. A curva de cinética de complexação é mostrada na Figura 15. O valor de absorvência foi normalizado (Absorvência normalizada = Absorvência tempo t / Absorvência tempo zero). O comportamento de MGN em solução foi acompanhado em função do tempo, para verificar se a variação observada na absorvência é devida a complexação ou a própria MGN em função do tempo.

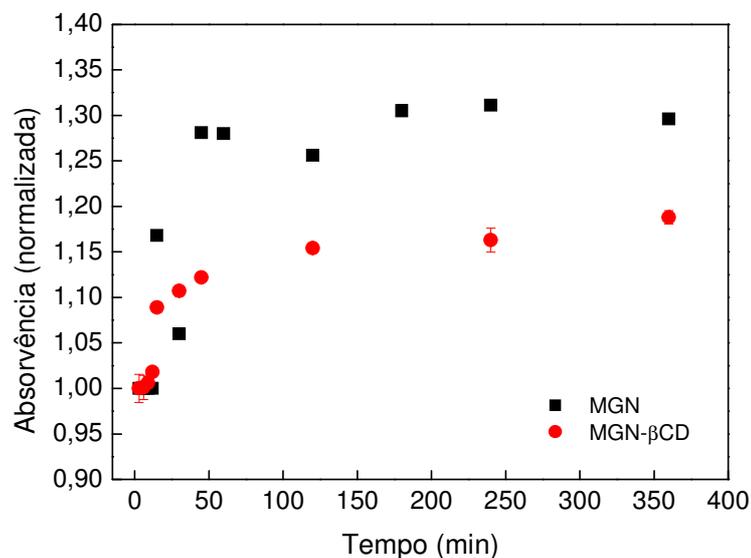


Figura 15. Curvas de cinética de complexação de MGN e β -CD, $\lambda = 368 \text{ nm}$. Razão molar 1:1, $25 \text{ }^\circ\text{C}$. $[\text{MGN}] = 36 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Solução aquosa com 1,5 % (v/v) de EtOH. Experimento realizado em triplicata.

O gráfico da Figura 15 mostra a variação na absorvência de MGN no período de 6 horas de experimento, sendo que na primeira hora a variação é mais pronunciada, o que está de acordo com os dados da literatura [GÓMEZ-ZALETA *et al.*, 2006]. A interação entre MGN e β -CD é rápida e atinge o equilíbrio em um

período de aproximadamente 2 horas. Nota-se que a absorvência normalizada do complexo MGN: β -CD é menor que a absorvência da MGN, visto que nesse comprimento de onda a absorvência aumenta com o aumento da concentração de β -CD (Figura 11), este comportamento pode ser devido à desagregação das moléculas de MGN para interagirem com a cavidade da β -CD.

O timol apresenta uma única banda em seu espectro de absorção e na Figura 16a, está representada a evolução do espectro de absorção do Timol com o aumento da concentração de β -CD. A equação de Benesi-Hildebrand também foi utilizada para determinar a constante de formação do complexo Timol: β -CD. A Figura 16b mostra comportamento linear para $[CD] [S]_0 / \Delta A$ versus $[CD]$ para Timol, no comprimento de onda de 274 nm, levando a um valor de $K_F = 3,43 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ para um tempo de agitação de 1 h e $K_F = 4,54 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ para um tempo de agitação de 2 h.

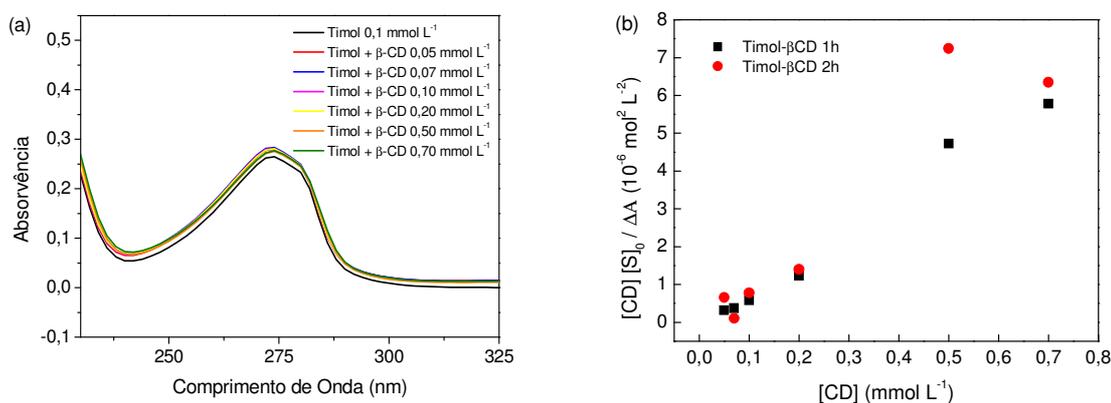


Figura 16. (a) Espectro UV-Vis de Timol na ausência e presença de β -CD. $[\text{Timol}] = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, em meio aquoso com 20 % EtOH. (b) Determinação da constante de equilíbrio do complexo Timol: β -CD de acordo com a equação de Benesi-Hildebrand, para $\lambda = 274 \text{ nm}$; $[\text{Timol}] = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Solução aquosa com 20 % de EtOH. Comparação entre o tempo de contato de 1 e 2h.

4.2. Capacidade Antioxidante

É crescente o interesse no uso terapêutico de antioxidantes, para prevenir danos em tecidos, causados pela alta concentração de ERO, pela redução da

formação de radicais livres ou pelo seqüestro ou decomposição dessas espécies. Experimentos em diferentes sistemas *in vitro* ou *in vivo* demonstram a potente ação de compostos fenólicos e sua capacidade em prevenir doenças relacionadas ao estresse oxidativo [LEIRO *et al.*, 2003; DAR *et al.*, 2005].

A capacidade antioxidante do polifenól mangiferina é bem conhecida e reportada na literatura. Dispondo de uma estrutura altamente hidroxilada, a mangiferina é responsável por diversas propriedades farmacológicas como antidiabética, anti-HIV, anticâncer, imunomoduladora, antimicrobiana e antioxidante [LEIRO *et al.*, 2003; PARDO-ANDREU *et al.*, 2005, 2006]. Apesar de suas propriedades farmacológicas, MGN tem baixa solubilidade em água [GÓMEZ-ZALETA *et al.*, 2006] o que pode acarretar limitações em suas aplicações farmacêuticas. Por outro lado, a formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas oferece uma solução para esse último problema, permitindo um aumento da solubilidade em meio aquoso, como também estabilidade e biodisponibilidade da molécula hospedeira [ALVAREZ-PARRILLA *et al.*, 2005; KARATHANOS *et al.*, 2007; LÓPEZ-NICOLÁS *et al.*, 2008; STRAZISAR *et al.*, 2008]. Com isso, propusemo-nos a estudar o comportamento da MGN em relação a sua capacidade antioxidante, quando complexada por β -CD, usando o método do DPPH $^{\bullet}$.

4.2.1. Capacidade Seqüestradora de Radicais Frente ao DPPH $^{\bullet}$

Dos vários métodos utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas, o ensaio com o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH $^{\bullet}$) é um dos mais usados. Sendo uma espécie radicalar estável e disponível comercialmente, o DPPH $^{\bullet}$ tem a vantagem de não ser afetado por reações laterais, como quelação com íons metálicos e inibição de enzimas. Uma solução de DPPH $^{\bullet}$ recentemente preparada apresenta coloração púrpura (516 nm). Quando na presença de um antioxidante ou de uma espécie radicalar, o DPPH $^{\bullet}$ é reduzido, formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção (Figura 17), podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorvência. A partir dos resultados obtidos determina-se a

percentagem de atividade antioxidante ou seqüestradora de radicais e/ou a percentagem de DPPH[•] remanescente no meio reacional [SOUSA *et al.*, 2007].

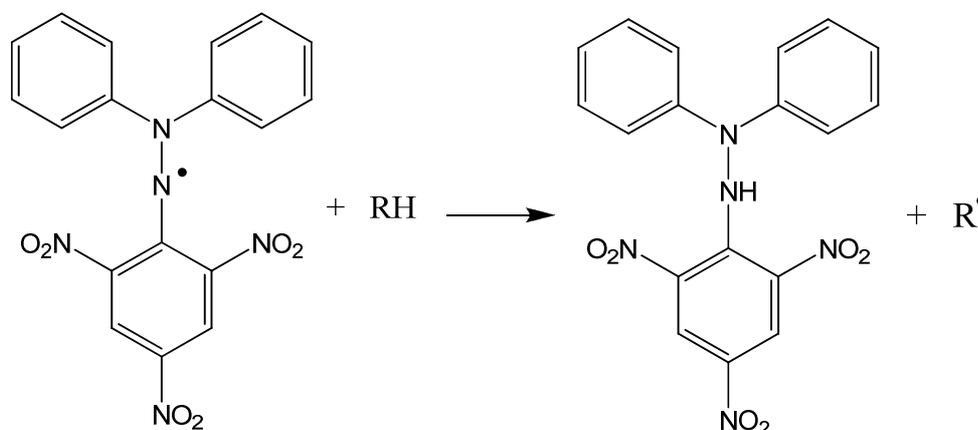


Figura 17. Reação do radical DPPH com um antioxidante.

Este ensaio permitiu comparar as reatividades de um antioxidante potente como o ácido gálico (AG) com as da mangiferina (MGN) e os complexos MGN:β-CD (1:1 e 1:2). As Figuras 18, 19 e 20 mostram o percentual de seqüestro de radicais em função do tempo (DPPH_R[•]) para amostras de MGN, β-CD e dos complexos MGN:β-CD na razão molar 1:1 e 1:2, por comparação com o controle AG.

A Figura 18 mostra que ácido gálico (4,35 μg mL⁻¹ ou 2,34 x 10⁻⁴ mol L⁻¹) consome mais que 90 % de DPPH[•] nos primeiros 5 min de reação. Para concentrações de MGN de 2,17; 4,35 e 21,75 μg mL⁻¹ (ou 5,21 x 10⁻⁵, 1,04 x 10⁻⁴ e 5,15 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ respectivamente), o consumo percentual de DPPH[•] foi de 25, 52 e 89 %, respectivamente, para 5 min de reação. O resultado indica que a concentração de MGN mais alta revela uma percentagem de DPPH[•] (DPPH_R[•]) próxima á do ácido gálico. Para isso, houve necessidade de uma concentração de MGN cinco vezes maior do que a observada para ácido gálico. Valores similares da atividade antioxidante de mangiferina usando o ensaio do DPPH[•], também foram observados por DAR *et al.* (2005).

A atividade antioxidante de β-CD nas concentrações de 11,29 e 56,45 μg mL⁻¹ (ou 9,95 x 10⁻⁵ e 4,97 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ respectivamente) utilizadas na formação do

complexo 1:1 com MGN foi tão pequena que pode ser considerada desprezível no cálculo da atividade antioxidante do complexo. (Figura 18).

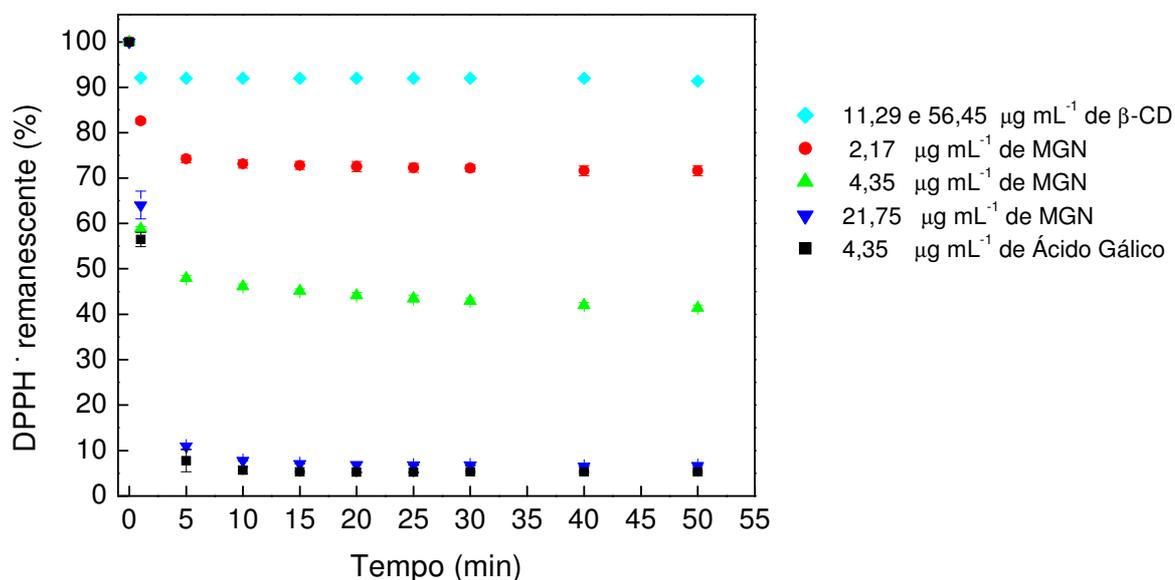


Figura 18. Comportamento cinético de MGN, β -CD e Ácido gálico frente ao DPPH \cdot . Experimento realizado em triplicata.

A Figura 19 mostra que MGN na forma complexada (1:1) aumentou a habilidade de eliminação do radical DPPH quando comparada com sua forma livre (Figura 17). Para o complexo 1A, MGN alcançou 60 % de seqüestro nos primeiros 5 min, enquanto na sua forma livre esse percentual ficou em torno de 25 %. No caso do complexo 2A, MGN aumentou para 75 %, nos primeiros 5 min de reação. No entanto, não se observaram diferenças entre MGN ($21,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ ou $5,15 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em suas formas complexada e livre.

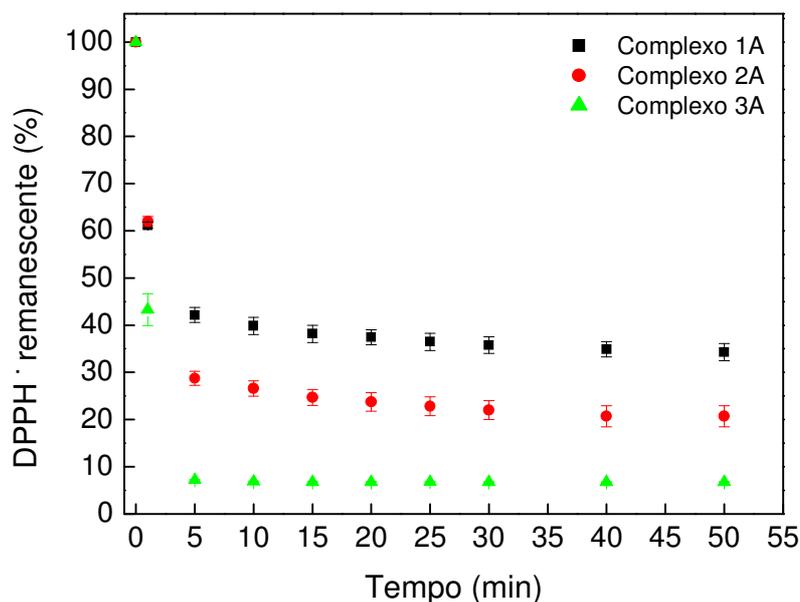


Figura 19. Comportamento cinético dos complexos MGN:β-CD 1A (-■- MGN 2,17 e β-CD 5,64 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 2A (-●- MGN 4,35 e β-CD 11,29 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e 3A (-▲- MGN 21,75 e β-CD 56,45 $\mu\text{g mL}^{-1}$), frente ao radical DPPH. Razão molar 1:1. Experimento realizado em triplicata.

A mesma análise foi realizada para o complexo MGN:β-CD 1:2 e é mostrado na Figura 20. A habilidade de eliminar o radical DPPH \cdot do complexo MGN:β-CD 1:2 diminuiu quando comparada com sua forma livre e ao complexo 1:1 (Figuras 18 e 19). Para o complexo 1B, MGN alcançou 25 % de seqüestro nos primeiros 5 min, a mesma proporção que em sua forma livre. No caso do complexo 2B, MGN aumentou para 44 %, nos primeiros 5 min de reação, 31 % a menos que no complexo 1:1. Contudo no complexo 3B, não se observou qualquer diferença entre MGN (21,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em suas formas livre e no complexo 1:1, em razão de sua alta concentração.

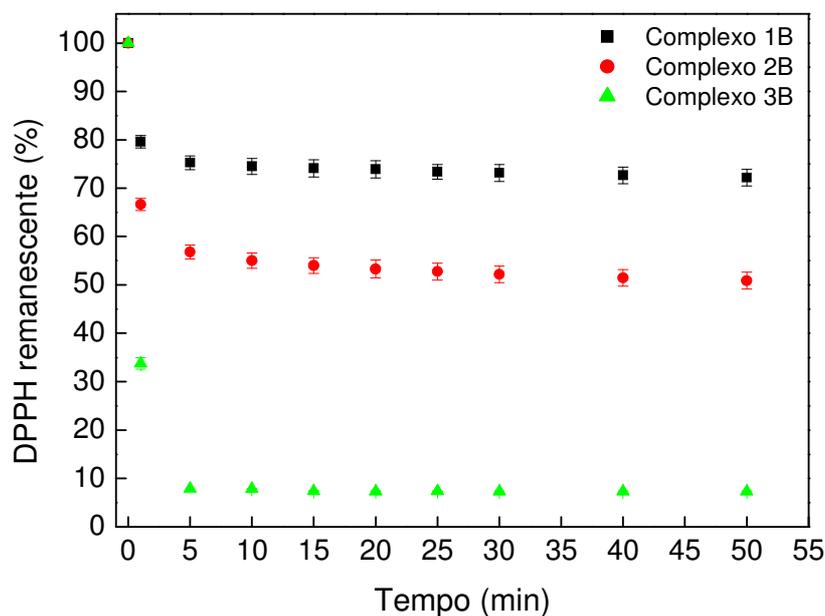


Figura 20. Comportamento cinético dos complexos MGN: β -CD 1B (-■- MGN 2,17 e β -CD 11,28 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 2B (-●- MGN 4,35 e β -CD 22,58 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e 3B (-▲- MGN 21,75 e β -CD 112,90 $\mu\text{g mL}^{-1}$) frente ao radical DPPH. Razão molar 1:2. Experimento realizado em triplicata.

A Figura 21 mostra a porcentagem da atividade sequestradora do radical DPPH (RSA-DPPH^{*}) das amostras MGN, dos complexos 1, 2 e 3 MGN: β -CD (1:1) e (1:2), por comparação com o controle ácido gálico. Note que MGN no complexo 1:1 apresenta maior atividade antioxidante quando comparada com sua forma livre nas concentrações de 2,17 e 4,35 $\mu\text{g mL}^{-1}$. No caso do complexo MGN: β -CD 1:2, a atividade antioxidante de MGN foi menor quando comparado ao complexo 1:1 para as concentrações de MGN 2,17 e 4,35 $\mu\text{g mL}^{-1}$, porém para a concentração de 21,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a atividade antioxidante foi igual a MGN na forma livre e no complexo 1:1.

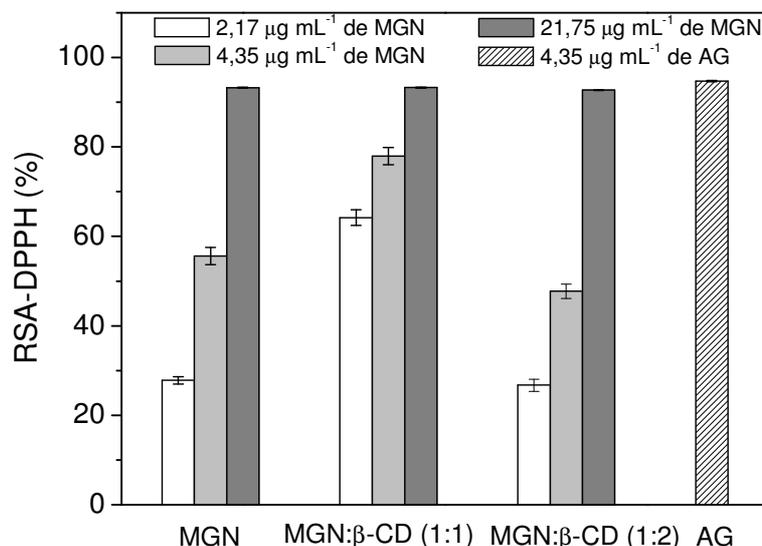


Figura 21. Porcentagem da atividade antioxidante das amostras MGN, complexos MGN:β-CD, razão molar 1:1 e 1:2, e do controle ácido gálico [AG]. Tempo de reação: 30 min. Experimento realizado em triplicata.

Nota-se que o efeito de β-CD na habilidade de eliminar o radical DPPH[•] de MGN aumenta com a diminuição da concentração de MGN. É por demais conhecida a baixa solubilidade da MGN em água [GÓMEZ-ZALETA *et al.*, 2006] e, de acordo com a literatura [BREWSTER & LOFTSSON, 2007], ciclodextrinas interagem com compostos pouco solúveis em água e com isso aumentam sua solubilidade e biodisponibilidade [TENG *et al.*, 2008]. Isto sugere que a solubilidade de MGN em água aumentou, na presença de β-CD na formação do complexo 1:1, de modo a favorecer sua interação com o radical DPPH[•]. ALVAREZ-PARRILLA *et al.* (2005) estudaram a capacidade antioxidante, de polifenóis da maçã complexados com β-CD, usando o ensaio do poder antioxidante pela redução do ferro (FRAP). Eles concluíram que a complexação de polifenóis por β-CD aumenta sua estabilidade, solubilidade e capacidade antioxidante.

STRAZISAR *et al.* (2008) investigaram o efeito de β-CD na atividade antioxidante dos ácidos *o*-, *m*- e *p*-cumárico (AC), usando o método do DPPH[•]. Eles mostraram que a atividade antioxidante dos complexos *o*- e *m*-AC:β-CD foi significativamente incrementada, enquanto a do complexo *p*-CA:β-CD permaneceu

inalterada. Esse aumento na atividade antioxidante dos isômeros *orto*- e *meta*- foi explicado pela formação de uma ligação-de-hidrogênio intramolecular entre os grupos –OH secundários da β -CD e o –OH no anel aromático. Enquanto isso, o grupo hidroxila na posição *para* está tão distante dos grupos hidroxilas secundários da β -CD, que não conseguem formar ligação-de-hidrogênio. Deste modo, entendeu-se que um aumento na estabilização do radical fenoxila ocorreu para os *o*- e *m*-AC: β -CD.

Nossos resultados mostraram que a capacidade antioxidante de MGN é influenciada pela β -CD. A capacidade antioxidante de MGN é aumentada para os complexos MGN: β -CD 1:1 nas concentrações 2,17 e 4,35 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Esse aumento pode ser explicado por uma possível interação entre β -CD e o grupo *D*-glicopiranosila da MGN. Segundo DAR *et al.* (2005), as hidroxilas nas posições 6 e 7 (Figura 22) da estrutura xantona são as principais responsáveis pela sua atividade antioxidante. Isso sugere, então, que β -CD não interage com as posições 6 e 7 da xantona, nessa razão molar, causando um notável aumento na atividade antioxidante de MGN. Uma vez a atividade antioxidante conservada, sugere que β -CD interaja com o grupo *D*-glicopiranosila de MGN (Figura 22).

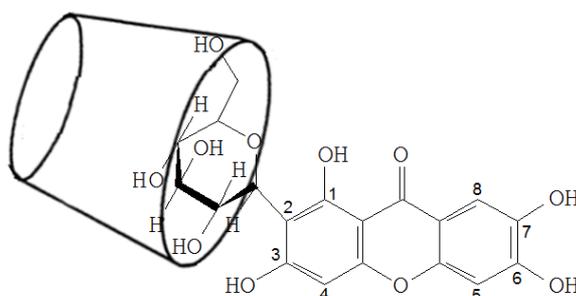


Figura 22. Possível interação entre MGN: β -CD para a razão molar 1:1.

Também, se observou que a atividade antioxidante de MGN diminui, quando o complexo MGN: β -CD (1:2) foi testado, nas concentrações 2,17 e 4,35 $\mu\text{g mL}^{-1}$, como se vê na Figura 21. É possível que β -CD quando em excesso, interaja com MGN nas posições 6 e 7, além do grupo glicopiranosila (Figura 23).

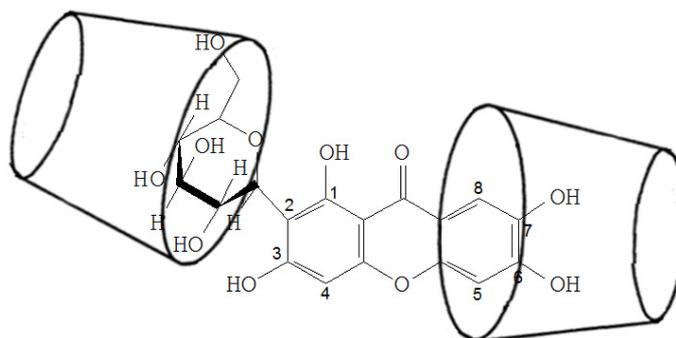


Figura 23. Possível interação entre MGN: β -CD para a razão molar 1:2.

Resultados similares de diminuição da atividade antioxidante foi observado por POLYAKOV *et al.* (2004), que investigou a reatividade do complexo de inclusão carotenóides-CDs, em relação ao radical peroxila gerado por meio da reação de Fenton: resulta em uma considerável diminuição na habilidade antioxidante do carotenóide. Até o momento, o mecanismo de complexação de MGN com β -CD em função da razão molar não está claro. Investigações adicionais encontram-se em andamento.

4.3. Estudo Eletroquímico

Os estudos eletroquímicos de MGN e Timol foram realizados utilizando como eletrodos de trabalho: carbono vítreo e ouro, por meio das técnicas de voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial.

O emprego das técnicas eletroquímicas com fins eletroanalíticos fundamenta-se nas relações diretas entre a concentração do analito e alguma propriedade elétrica como corrente, potencial, condutividade, resistência ou carga. Estudos de processos de oxidação e redução em vários meios, de adsorção em superfícies e de mecanismo de transferência de elétrons, inclusive com a utilização de eletrodos modificados, exemplificam algumas das numerosas aplicações atuais das chamadas técnicas eletroanalíticas [SOUZA *et al.*, 2003]. Uma das principais técnicas eletroanalíticas, a voltametria cíclica, permite adquirir informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos

adsortivos [BARD & FAULKNER, 1990], além de permitir o estudo comparativo de materiais de eletrodo e do estado da superfície do mesmo.

4.3.1. Estudo de Voltametria Cíclica (VC) de Mangiferina e Timol

Os estudos eletroquímicos da MGN foram realizados em tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹, pH 7,0 em um eletrodo de carbono vítreo (CV) estático. Os voltamogramas cíclicos apresentaram uma única onda anódica em $E_{p_a} +0,3$ V (Figura 24a), de natureza irreversível. Além da ausência de onda catódica referente à redução do produto da oxidação da MGN, o deslocamento do potencial de pico anódico para valores mais positivos em função da velocidade de varredura (v) corrobora a irreversibilidade do sistema (Figura 24a, Tabela 6).

Os gráficos de i_{p_a} versus v e i_{p_a} versus $v^{1/2}$ (Figura 24 b e c) mostram que o transporte de massa até a superfície eletródica é caracterizado por um processo misto, havendo competição de processo difusional e adsortivo. Essa afirmação baseia-se no fato de que, em baixas velocidades de varredura (até 300 mV) o sistema apresenta-se linear, o que é característico de processo difusional; enquanto isso, com o aumento da velocidade de varredura, observa-se a perda de linearidade nos gráficos (Figura 24 b e c), característico de processo adsortivo.

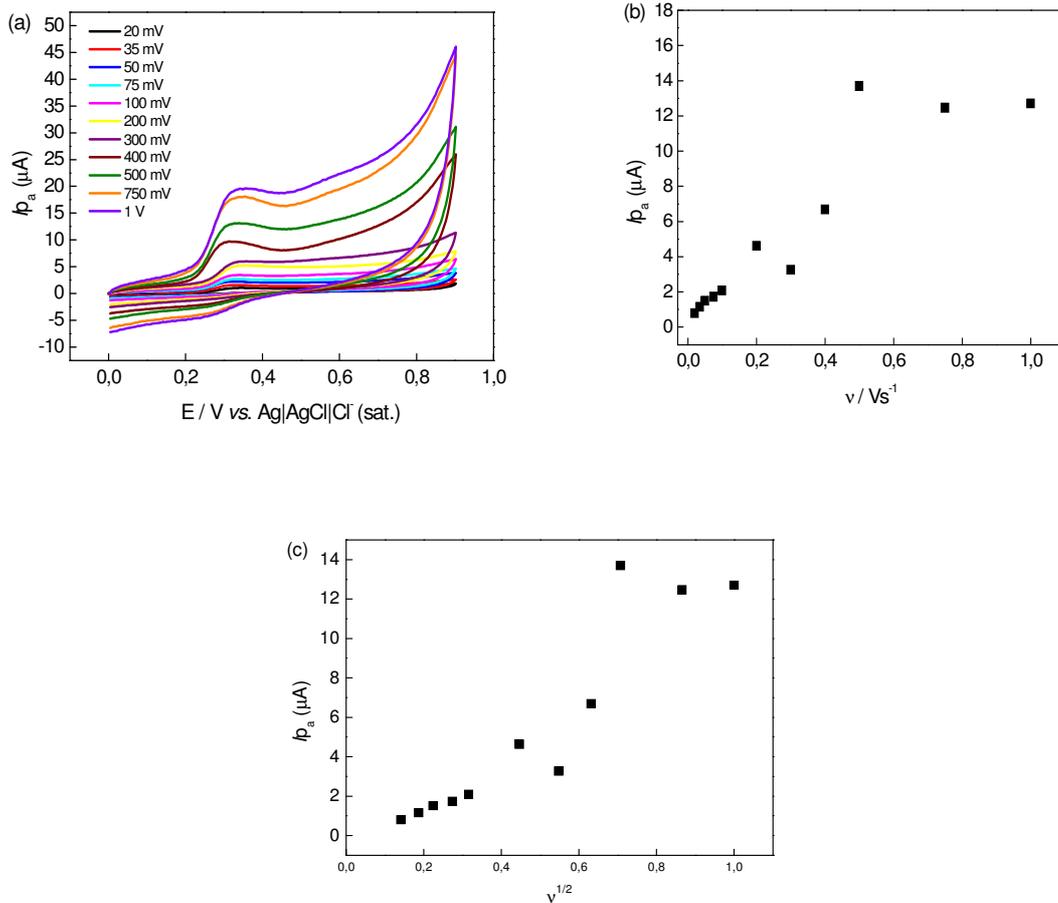


Figura 24. (a) Voltamogramas cíclicos da MGN em várias velocidades de varredura; (b) gráfico de I_{pa} vs. v ; (c) gráfico de I_{pa} vs. $v^{1/2}$; $[MGN] = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0; eletrodo de CV.

Tabela 7. Parâmetros eletroquímicos encontrados para MGN. Estudo em função da velocidade de varredura. E_{pa} vs. Ag|AgCl|Cl⁻ (sat.).

$v \text{ (V s}^{-1}\text{)}$	$v^{1/2} \text{ (V s}^{-1}\text{)}$	$\log v$	$+ E_{pa} \text{ (V)}$	$I_{pa} \text{ (}\mu\text{A)}$
0,020	0,141	-1,699	0,345	0,791
0,035	0,187	-1,456	0,327	1,151
0,050	0,224	-1,301	0,327	1,500
0,075	0,274	-1,125	0,336	1,726
0,100	0,316	-1,000	0,340	2,082
0,200	0,447	-0,699	0,354	4,623
0,300	0,548	-0,522	0,358	3,260
0,400	0,632	-0,398	0,314	6,678
0,500	0,707	-0,301	0,336	13,699
0,750	0,866	-0,125	0,354	12,466
1,000	1,000	0,000	0,358	12,705

O fenômeno de adsorção associado à oxidação eletroquímica da MGN pode ser observado também pelo decréscimo da corrente de pico em varreduras sucessivas de potencial anódico (Figura 25a). O Timol, assim como MGN apresenta uma única onda anódica e forte adsorção tanto em eletrodo de ouro quanto em eletrodo de carbono vítreo (Figura 25b).

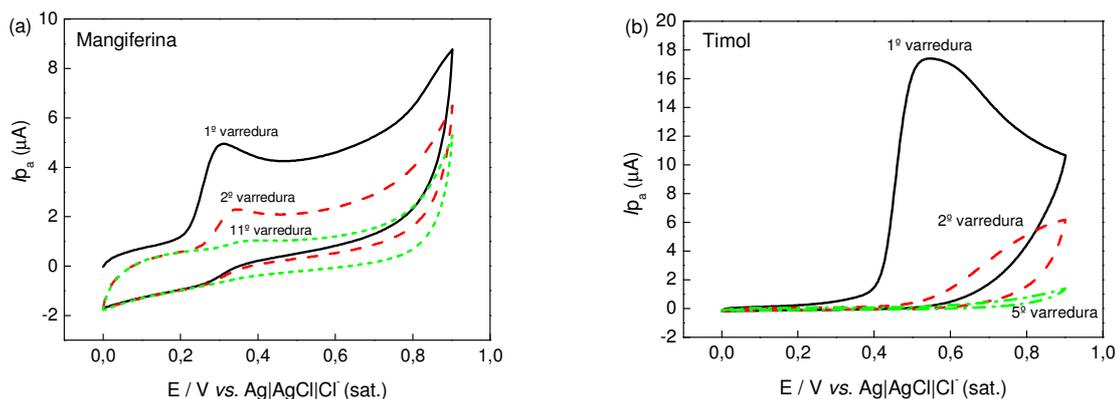


Figura 25. (a) Voltamogramas cíclicos do comportamento eletroquímico de MGN em varreduras sucessivas; $[MGN] = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0; eletrodo de CV; $v = 0,010 \text{ V s}^{-1}$; (b) Voltamogramas cíclicos do comportamento eletroquímico de Timol em varreduras sucessivas; $[Timol] = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0; eletrodo de CV; $v = 0,10 \text{ V s}^{-1}$.

4.3.2. Estudo da Variação do Potencial de Oxidação de Mangiferina e Timol com o pH

Objetivando-se determinar o pK_a da MGN e do Timol, estudos eletroquímicos da oxidação dos mesmos foram realizados em várias faixas de pH. Para tal, alíquotas de uma solução etanólica de MGN/Timol foram adicionadas a diferentes soluções-tampão, numa faixa de pH entre 0,6 e 11,91, mantendo-se a concentração de ambos constante ($c = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Para o estudo da variação do potencial de oxidação da MGN e Timol com o pH (Figuras 27 e 28) utilizou-se a técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD), com o uso de eletrodo de carbono vítreo, platina e $Ag|AgCl|Cl^-$ (sat.), como eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, respectivamente.

GÓMEZ-ZALETA *et al.* (2006), determinaram os valores de pK_a de MGN em solução aquosa através de estudo espectroscópico UV-VIS empregando o programa SQUAD como ferramenta computacional. Um estudo de RMN complementou os dados para os valores de pK_a . A estrutura molecular de MGN apresenta oito grupos hidroxila, sendo que quatro desses grupos encontram-se no sistema glicopiranosila, de menor caráter ácido em relação às outras quatro hidroxilas que estão diretamente incorporadas no esqueleto xantona. De fato, uma delas (hidroxila em C-1) poderia se relacionar à formação do íon fenolato. O estudo também mostrou que em meio alcalino as desprotonações ocorrem na ordem: 6-OH (pK_{a1} 6,52), 3-OH (pK_{a2} 7,97), 7-OH (pK_{a3} 9,44) e 1-OH (pK_{a4} 12,10) (Figura 26).

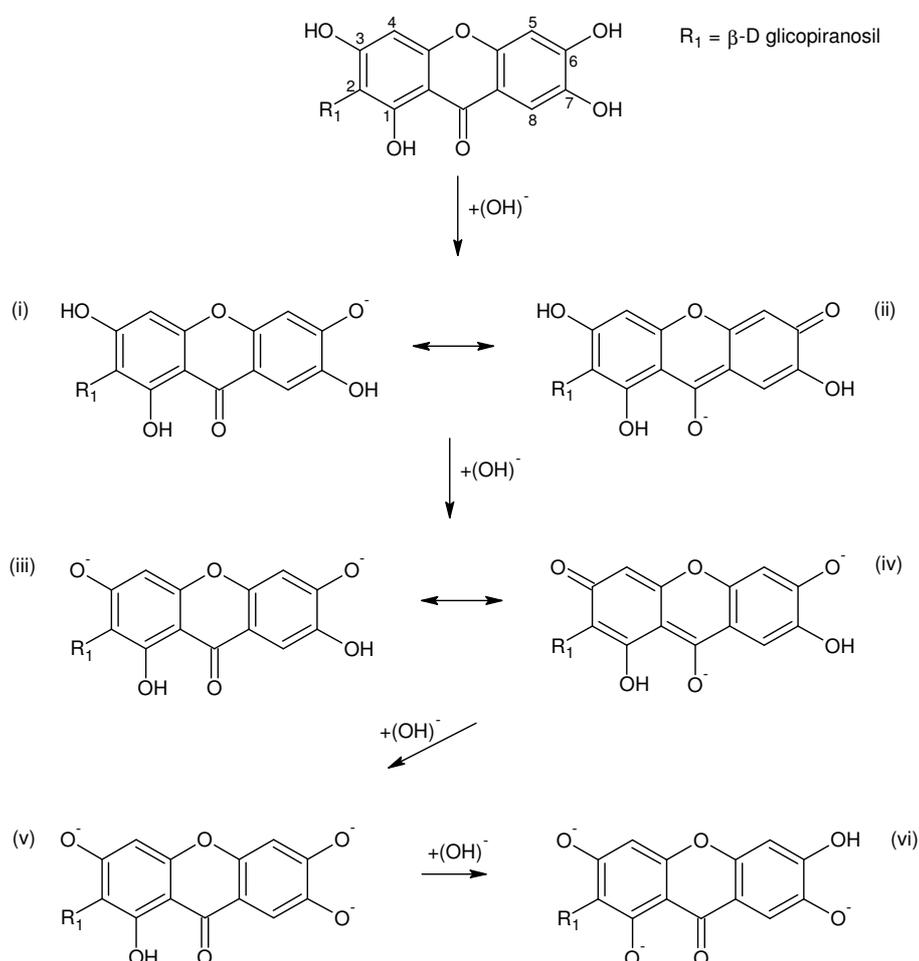


Figura 26. Possíveis mecanismos de desprotonação de MGN, útil para a determinação do pK_a [adaptado de GÓMEZ-ZALETA *et al.*, 2006].

O efeito na corrente e no potencial de pico em função do pH para MGN são mostrados na Figura 27a. A corrente de pico (i_p) mostrou-se maior em valores de pH correspondentes a meio ácido, apresentando um maior decréscimo dos valores de i_p em valores de pH superiores a 5,9 (Figura 27c). O aumento do pH da solução tampão promoveu um deslocamento linear do potencial de pico anódico para valores mais negativos (Figura 27b), com um decréscimo de 63 unidades de mV/pH, devido à diminuição na concentração de prótons com o aumento do pH. A partir do gráfico do estudo do pH de MGN (Figura 27b) foi possível verificar duas inclinações na reta, e assim, dois valores de pK_a puderam ser determinados (pK_{a1} : 6,82 e pK_{a2} : 10,91). No entanto, valores de pK_a para os demais prótons ácidos da MGN não puderam ser determinados, o que provavelmente se deve aos efeitos de adsorção da MGN em superfície eletródica.

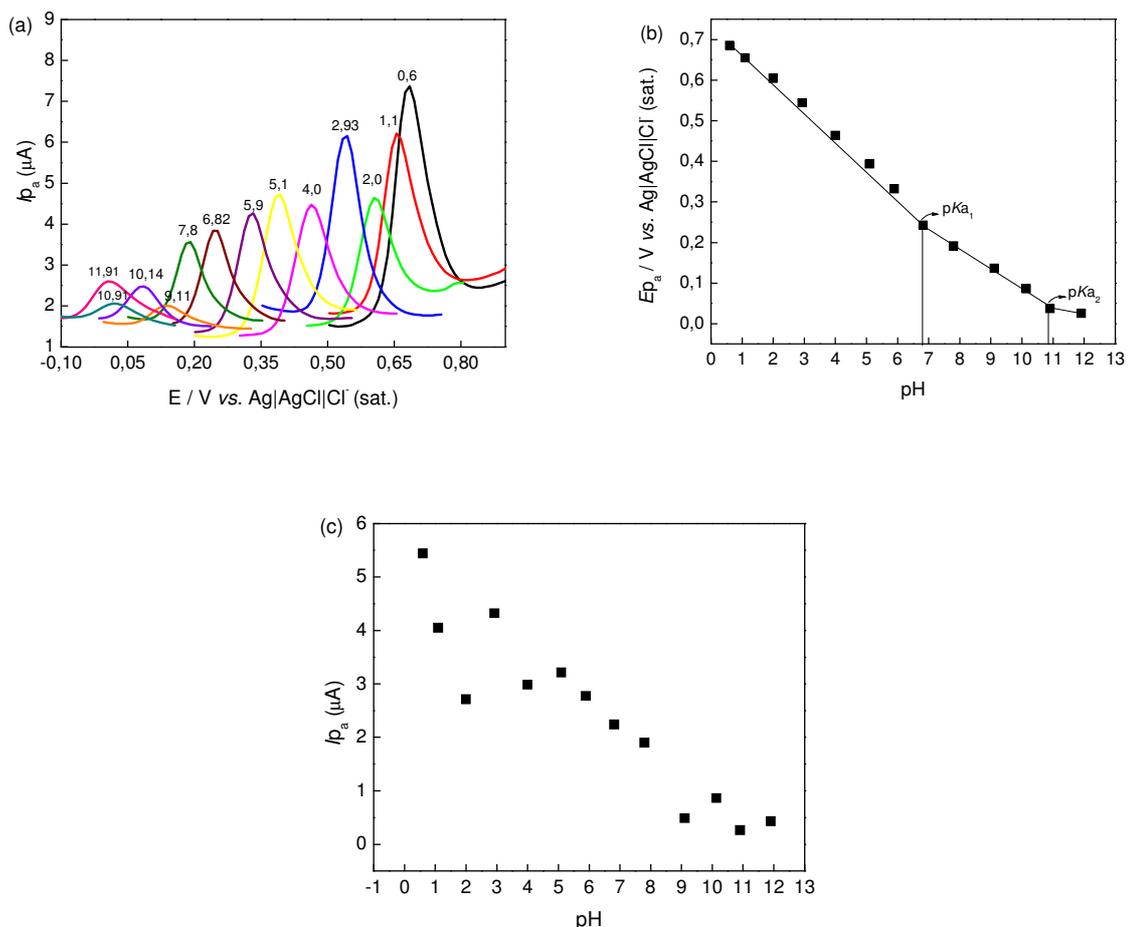


Figura 27. (a) Voltamogramas de pulso diferencial da dependência do potencial de oxidação da MGN em função do pH; (b) curva de E_{p_a} vs. pH da MGN; c) curva de i_{p_a} vs. pH da MGN.

A Figura 28a mostra o efeito na corrente e potencial de pico em função do pH para o Timol. A corrente de pico (i_{p_a}) mostrou-se maior em valores de pH correspondentes ao meio ácido (Figura 28c). O aumento do pH da solução tampão promoveu um deslocamento linear do potencial de pico anódico para valores mais negativos (Figura 28b), com um decréscimo de 54 unidades de mV/pH. A partir do gráfico do estudo do pH de Timol (Figura 28b) foi possível verificar uma inclinação na reta, sendo o valor do pK_a determinado como sendo 10,88.

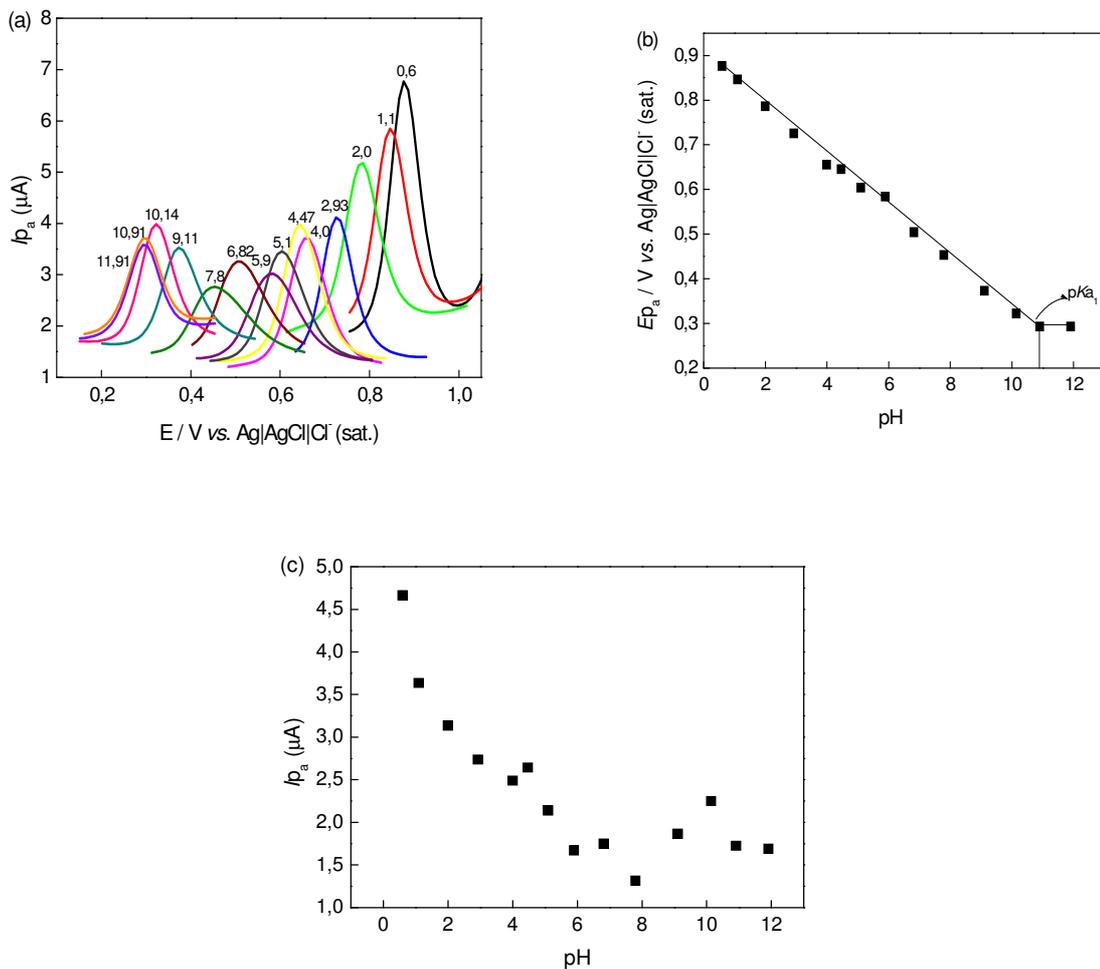


Figura 28. (a) Voltamogramas de pulso diferencial da dependência do potencial de oxidação do Timol em função do pH; (b) curva de E_{p_a} vs. pH do Timol; (c) curva de i_{p_a} vs. pH do Timol.

4.3.3. Estudo do Comportamento de Mangiferina e Timol na Presença de β -CD

A Figura 29 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para MGN em eletrodo de ouro, solução de Na_2SO_4 $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, na ausência e presença de β -CD sólida, ambos em solução. O comportamento eletroquímico (voltametria cíclica, VC) de MGN em eletrodo de ouro mostrou uma onda de oxidação em $+0,65 \text{ V vs. Ag|AgCl|Cl}^- (\text{sat.})$. Observa-se um aumento na corrente de pico quando se introduz β -CD em igual proporção a de MGN (1:1), como também um deslocamento de potencial de pico para valores menos positivos $+0,56 \text{ V vs. Ag|AgCl|Cl}^- (\text{sat.})$, sendo a diferença de potencial de $0,08 \text{ V}$; este comportamento está relacionado inicialmente, ao aumento da solubilidade da MGN no meio e portanto, o favorecimento do processo de oxidação. Quando se aumenta a concentração de β -CD para um valor 10 vezes maior que a concentração de MGN, observa-se uma diminuição na corrente de pico, ocasionado pelo encapsulamento de MGN na cavidade da β -CD e conseqüentemente, o desfavorecimento do processo de oxidação.

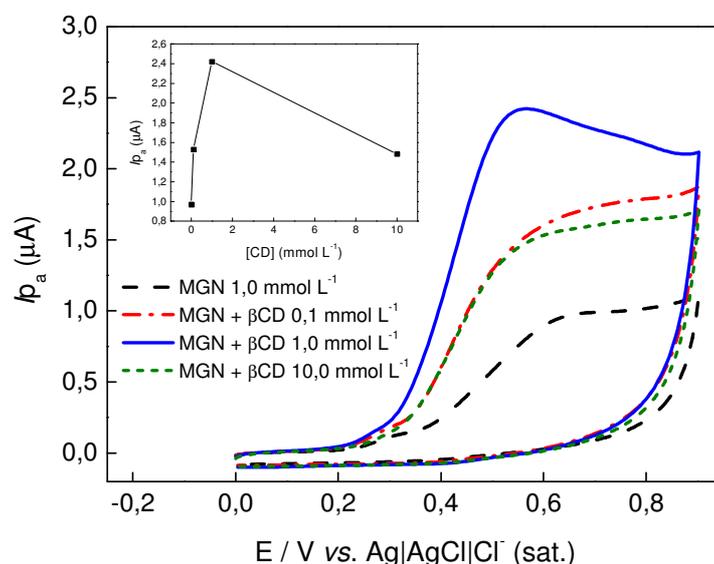


Figura 29. Voltamogramas cíclicos de MGN ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$) em eletrodo de ouro e adição de β -CD sólida nas concentrações de 0,1; 1,0 e $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Na_2SO_4 $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte e $v = 0,01 \text{ V s}^{-1}$. Inserção: i_{p_a} vs. $[\beta\text{-CD}]$.

O mesmo estudo em solução, na presença e na ausência de β -CD, também foi realizado para o timol (Figura 30). O timol apresentou uma onda de oxidação em +0,65 V vs. Ag|AgCl|Cl⁻ (sat.). Observa-se que quando se introduz β -CD em uma proporção 10 vezes menor que Timol, ocorre um aumento na corrente de pico devido ao aumento da solubilidade do substrato; no entanto, nas adições seguintes (1:1 e 1:10), a corrente de pico diminui, enquanto que para a proporção 1:10, se observa um deslocamento no potencial de pico para potenciais mais positivos, ocasionado pelo encapsulamento do substrato e o consequente desfavorecimento do processo de oxidação.

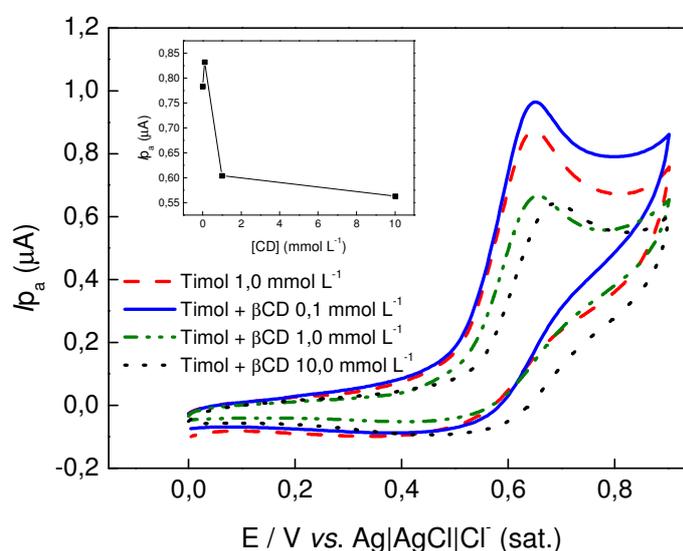


Figura 30. Voltamogramas cíclicos de Timol (1,0 mmol.L⁻¹) em eletrodo de ouro e adição de β -CD sólida nas concentrações de 0,1; 1,0 e 10,0 mmol L⁻¹. Na₂SO₄ 0,2 mol L⁻¹ como eletrólito suporte e $v = 0,01 \text{ V s}^{-1}$. Inserção: I_{p_a} vs. [β -CD].

4.3.4. Modificação do Eletrodo de Ouro com Camada Mista de β -CDSH + MUA e Sua Caracterização por Voltametria Cíclica

Monocamadas altamente organizadas de moléculas contendo enxofre em substratos de ouro fornecem um modo fácil e rápido para formar filmes monomoleculares homogêneos com propriedades de superfície bem definidas

[AULETTA *et al.*, 2002]. Recentemente, monocamadas de derivados de CD em superfícies sólidas foram estudadas por vários grupos de pesquisa [MAEDA *et al.*, 1997]. As CDSH são covalentemente ligadas à superfície de um eletrodo de ouro, via quimissorção dos grupos tiól ao ouro. As CDSH adsorvidas podem formar barreiras seletivas para inibir o transporte de espécies que seriam incapazes de se complexar com β -CD; no entanto, tem a característica de transporte seletivo com as interações hóspede-hospedeiro entre as β -CD (hospedeira) e várias espécies orgânicas (hóspedes). Para obter evidências experimentais para a seletividade da barreira CDSH, BOLLO *et al.* (2003) realizaram experimentos de voltametria cíclica usando duas sondas eletroativas como ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$) e ácido ferrocenocarboxílico (Fc-CO₂H).

A Figura 31 mostra o voltamograma cíclico de $K_3[Fe(CN)_6]$, Fc-CO₂H e MGN em eletrodo de ouro modificado com camada mista de β -CDSH + MUA em Na₂SO₄ 0,2 mol L⁻¹. A molécula de Fc-CO₂H, devido a seu tamanho, pode entrar na cavidade da β -CD e sofrer transferência de elétrons [BOLLO *et al.*, 2003]. Como mostrado na Figura 31, a camada mista não promove a supressão do processo redox do ácido ferrocenocarboxílico; por outro lado, não apresenta nenhum pico referente ao par redox para o ferricianeto de potássio. Esse comportamento é esperado para o ferricianeto, porque seu tamanho é maior do que a cavidade da β -CD e, assim, o acesso da sonda ao eletrodo de ouro é eficazmente bloqueado pela monocamada mista [BOLLO *et al.*, 2003; DAMOS *et al.*, 2007]. O sinal inclinado referente ao ferricianeto, contudo, mostra que ainda existem alguns espaços no eletrodo entre as moléculas de β -CDSH e MUA, em que a espécie redox pode penetrar até a superfície do eletrodo. Como discutido anteriormente, para a efetiva formação das SAMs, o eletrodo deve estar com a superfície totalmente livre de sujeira e arranhões que, apesar de todos os cuidados, no caso de eletrodos planos tornam-se difíceis de serem removidos. Após a formação eficiente da monocamada, um teste preliminar com MGN mostrou um pico irreversível em +0,6 V (Figura 31).

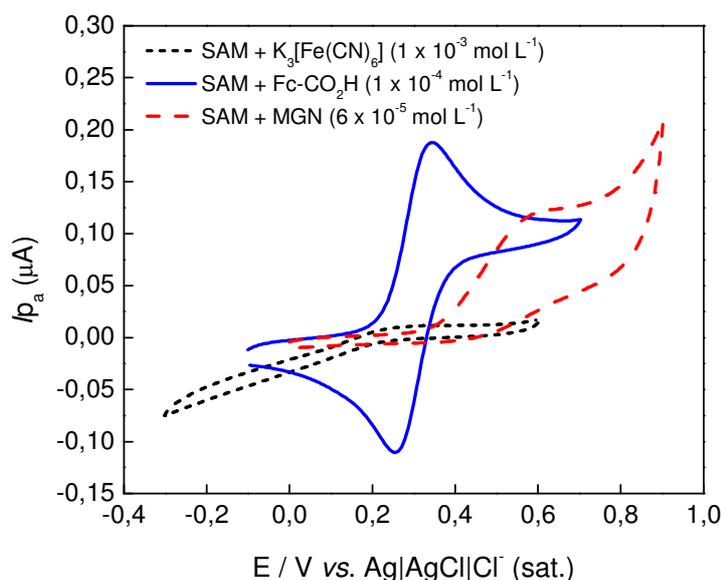


Figura 31. Voltamogramas cíclicos para $K_3[Fe(CN)_6]$, $Fc-CO_2H$ e MGN em eletrodo de ouro modificado com β -CDSH + MUA. Na_2SO_4 $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte e $v = 0,01 \text{ V s}^{-1}$.

4.3.5. Cálculo da Constante de Formação (K_F) de MGN e Timol em SAM de β -CDSH + MUA

Foi possível construir uma curva para o complexo MGN: β -CD em SAM de β -CDSH + MUA utilizando a técnica de voltametria cíclica (VC), para a faixa de concentração de $5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ a $60 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 32a). Com o aumento da concentração de MGN, observa-se um deslocamento do potencial de pico para valores mais positivos e em concentrações acima de $60 \text{ } \mu\text{M}$, observa-se uma diminuição da corrente de pico, tanto para MGN quanto para Timol, devido à saturação da monocamada. Tendo a corrente de pico saturada, foi possível determinar a constante de formação (K_F) de MGN na SAM, utilizando uma derivada da isoterma de Langmuir como mostrado na Equação 4;

$$\frac{[H\acute{o}spede]_0}{I} = \frac{1}{K_{H\acute{o}spede} I_{\max}} + \frac{[H\acute{o}spede]_0}{I_{\max}} \quad \text{Eq. 4}$$

onde $[H\acute{o}spe\text{de}]$ é a concentração da espécie eletroativa, I é a corrente de pico medida para cada concentração da molécula hóspede, I_{max} é a corrente de pico máxima, e $K_{H\acute{o}spe\text{de}}$ é a constante de formação da molécula hospedeira com CD confinada na superfície do eletrodo [MAEDA *et al.*, 1997; DAMOS *et al.*, 2007].

O gráfico de $[H\acute{o}spe\text{de}] / I_p$ vs. $[H\acute{o}spe\text{de}]$ para MGN obedece à derivada da isoterma de Langmuir como se pode ver na Figura 32b. Os valores das constantes de formação (K_F) para MGN foram calculados para três eletrodos de ouro que mostraram valores da mesma ordem de grandeza, apesar de um deles ter diâmetro maior. Os dados são apresentados na Tabela 7, e mostram que o eletrodo que apresentou o melhor resultado para a interação da MGN na cavidade de β -CD foi o denominado Eletrodo 2.

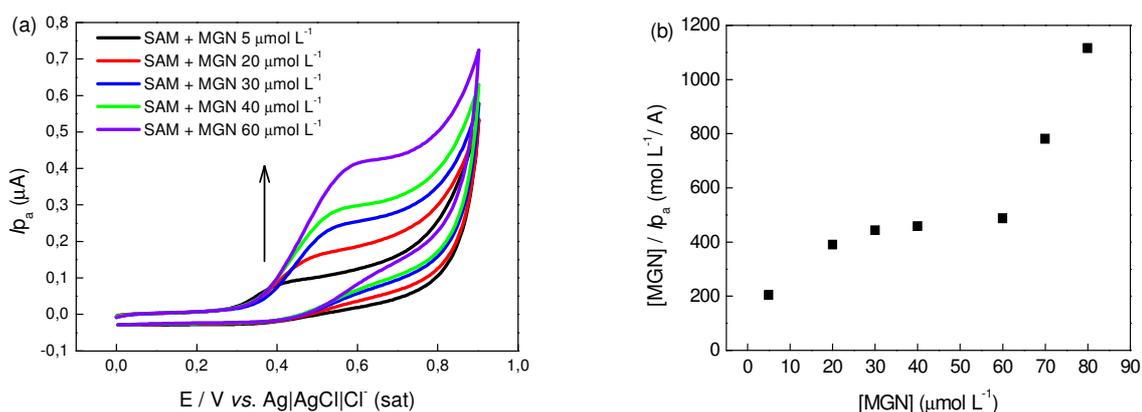


Figura 32. (a) Voltamogramas cíclicos do efeito da concentração da MGN em SAM de β -CDSH + MUA; (b) $[MGN] / I_p$ vs. $[MGN]$. Na_2SO_4 $0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $v = 0,01 \text{ V s}^{-1}$.

Tabela 8. Valores das constantes de formação (K_F) para MGN em três eletrodos de ouro.

Eletrodos	Diâmetro	$K_F / \text{L mol}^{-1}$
Eletrodo 1	1,6 mm	$4,31 \times 10^4$
Eletrodo 2	1,6 mm	$7,75 \times 10^4$
Eletrodo G	3,0 mm	$4,61 \times 10^4$

Com o intuito de comprovar a habilidade da SAM de incluir MGN em sua cavidade, promoveu-se o ensaio em competição, adicionando alíquotas crescentes de MGN a uma solução contendo Fc-CO₂H (Figura 33a). Para tanto, determinou-se previamente a constante de formação do Fc-CO₂H em SAM. A corrente de pico atingiu a saturação a altas concentrações de Fc-CO₂H (Figura 33b), e o gráfico exibe uma forma similar para a isoterma de adsorção de Langmuir; os dados foram tratados de acordo com a equação 4 (Figura 33c). Baseado nesta aproximação mecanística, o valor de K_F para o Fc-CO₂H foi estimado em 1,32 x 10³ L mol⁻¹.

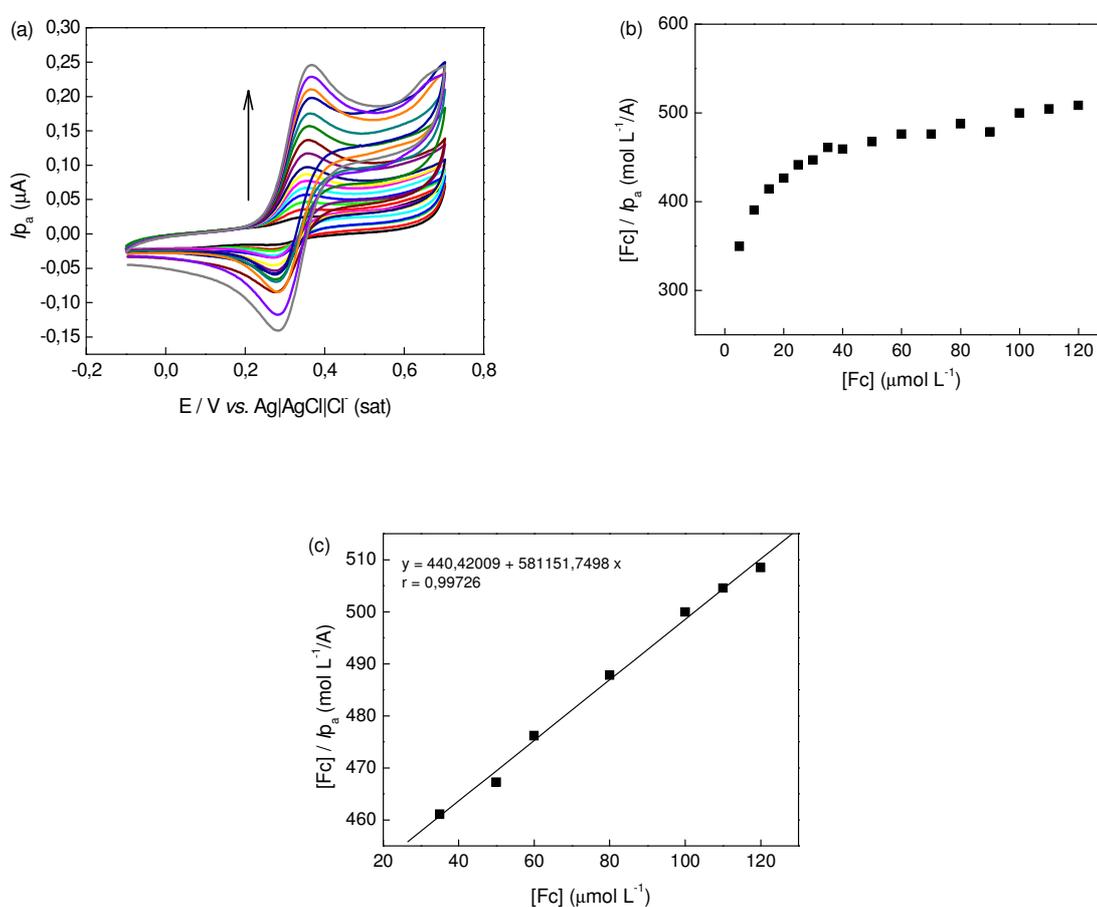


Figura 33. (a) Voltamogramas cíclicos de Fc-CO₂H na faixa de concentração de 5 a 120 μmol L⁻¹. (b) razão $[Fc-CO_2H] / i_{p_a}$ vs. $[Fc-CO_2H]$ mostrando a saturação da SAM mista de β-CDSH + MUA (c) razão $[Fc-CO_2H] / i_{p_a}$ vs. $[Fc-CO_2H]$ para o cálculo da constante de associação. Na₂SO₄ 0,2 mol L⁻¹; $v = 0,01$ V s⁻¹.

Os voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 34a mostram a diminuição na corrente de pico de Fc-CO₂H em função da adição de MGN. Como

pode ser observado na Figura 34b, a diferença entre as correntes de pico referentes à oxidação de Fc-CO₂H na ausência e a presença de MGN (ΔI_{pa}) aumentou com o aumento da concentração de MGN. Por outro lado, a presença das moléculas de MGN na solução contendo o Fc-CO₂H não influencia a corrente de pico do marcador eletroquímico. Os resultados de voltametria cíclica indicaram que tanto MGN, como também Fc-CO₂H formam complexos de inclusão com a β -CD imobilizada na superfície do eletrodo de ouro e que a reação redox das moléculas de Fc-CO₂H é competidamente inibida pelas moléculas de MGN que com elas concorrem.

Como esperado para a inibição em competição, a diferença entre as correntes de pico da reação redox de Fc-CO₂H, na ausência e presença de MGN, (ΔI_{pa}) aumenta com o aumento na concentração de MGN, de acordo com a Equação 5 (Figura 34c) [DAMOS *et al.*, 2007]

$$\frac{[Hóspede]_0}{\Delta I} = \left\{ \frac{(1 + K_{FcCO_2H} [FcCO_2H])}{c[CD]_0} \right\} \left\{ \frac{1 + K_{FcCO_2H} [FcCO_2H]}{K_{Hóspede}} + [Hóspede] \right\} \quad \text{Eq. 5}$$

onde $K_{Hóspede}$ representa a constante de formação das moléculas da MGN com as moléculas de β -CD na superfície do eletrodo, $[CD]_0$ é a concentração de moléculas de β -CD na superfície do eletrodo e c é a corrente por 1 mol de moléculas de Fc-CO₂H. Baseado nisto o valor de $[CD]_0$ foi estimado em $1,44 \times 10^{-7}$ mol e $K_{MGN} = 1,70 \times 10^4$ L mol⁻¹, coerente com os dados da determinação direta de MGN em SAM mista de β -CDSH + MUA.

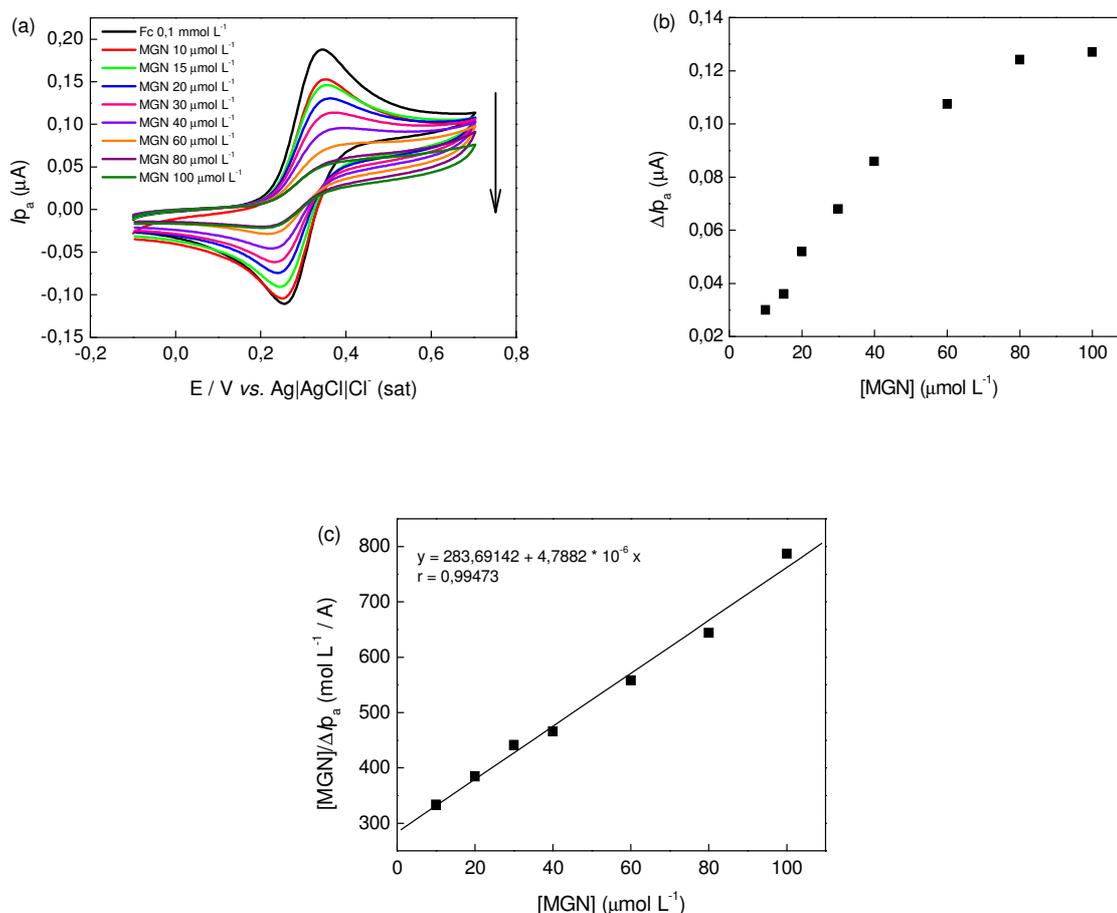


Figura 34. (a) Voltamogramas cíclicos do efeito inibitório de MGN em solução de Fc-CO₂H. (b) Δi_{p_a} (diferença entre a corrente de pico do processo redox de Fc-CO₂H na presença e ausência de MGN): dependência para diferentes concentrações de MGN. (c) Razão entre $[MGN]/\Delta i_{p_a}$ vs. $[MGN]$. Medidas realizadas em eletrodo modificado com β -CDSH/MUA, Na₂SO₄ 0,2 mol L⁻¹; $v = 0,01$ V s⁻¹.

Apesar de estudos mostrarem o encapsulamento de Timol na cavidade da β -CD, nenhum dado físico-químico foi revelado [MULINACCI *et al.*, 1996], contudo, no presente, mostramos a constante de dissociação e formação para o complexo. A Figura 35a mostra os voltamogramas do efeito da concentração de Timol em SAM por VC e VPD. O gráfico de $[H\acute{o}spe] / i_{p_a}$ vs. $[H\acute{o}spe]$ para Timol obedece à derivada da isoterma de Langmuir como pode ser visto na Figura 35b. A constante de formação (K_F) para Timol foi calculado como sendo $2,46 \times 10^4$ L mol⁻¹ para VC.

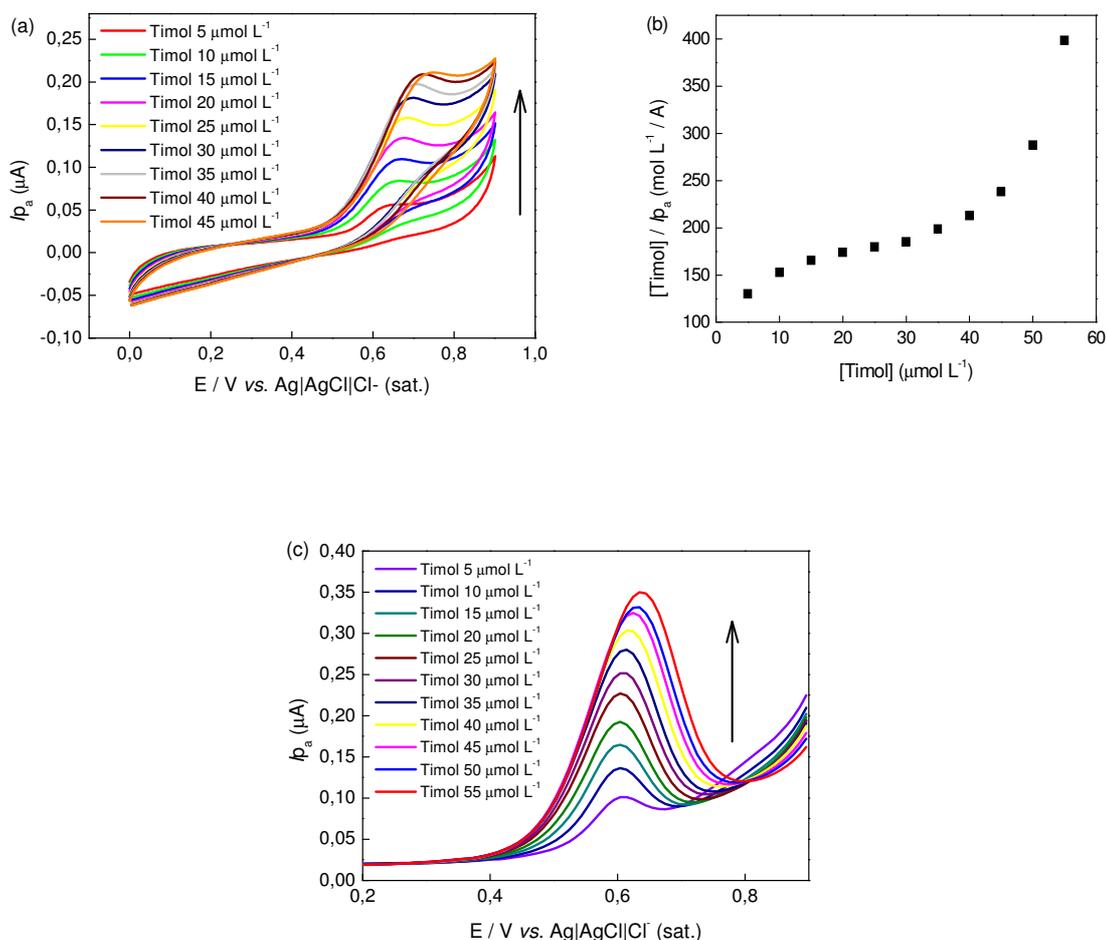


Figura 35. (a) Voltamogramas cíclicos do efeito da concentração do Timol em SAM de β -CDSH + MUA; (b) razão $[\text{Timol}] / i_{p_a}$ vs. $[\text{Timol}]$ em VC. Na_2SO_4 $0,2 \text{ mol L}^{-1}$; (c) Voltamogramas de pulso diferencial do efeito da concentração do Timol em SAM de β -CDSH + MUA; Na_2SO_4 $0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $a = 50 \text{ mV}$, tempo de pulso = 70 ms , $v = 0,01 \text{ mV s}^{-1}$.

Com a finalidade de comprovar a formação da monocamada auto-organizada sobre o eletrodo de ouro, registraram-se voltamogramas cíclicos para estimar a quantidade de tióis adsorvidos na superfície do ouro. A dessorção eletroquímica foi realizada em solução de KOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, variando o potencial de $0,1$ a $-1,2 \text{ V}$ com velocidade de $0,05 \text{ V s}^{-1}$. A dessorção redutiva da monocamada mostrou uma onda catódica irreversível $E_{p_c} = -0,95 \text{ V vs. Ag|AgCl|Cl}^- (\text{sat.})$ como mostrado na Figura 36.

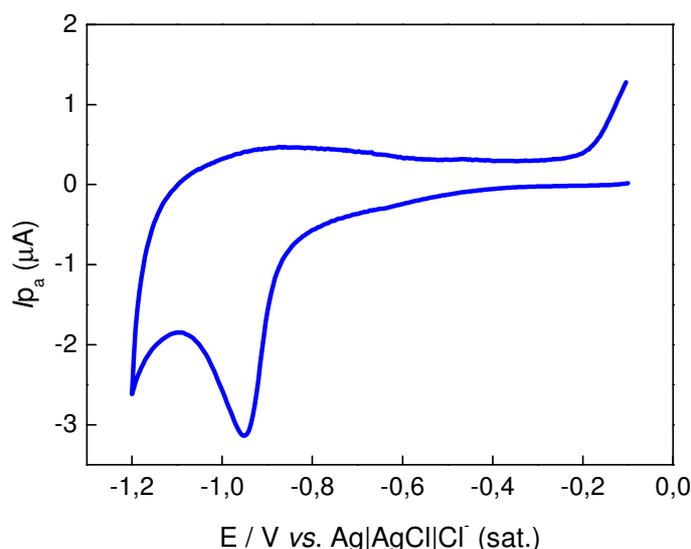


Figura 36. Voltamograma cíclico da dessorção redutiva em eletrodo de ouro dos grupos tióis de monocamada mista de β -CDSH + MUA; KOH 0,5 mol L⁻¹; $v = 0,05$ V s⁻¹.

O pico de redução observado na Figura 36 relaciona-se à redução do tiol adsorvido, segundo a equação 6 [ROJAS *et al.*, 1995; BOLLO *et al.*, 2003],



esse comportamento constitui uma forte evidência do rompimento da ligação RS-Au, e pode ser utilizado para o cálculo do excesso superficial da camada mista de β -CDSH + MUA na superfície do ouro utilizando a equação 7 [CANCINO, 2008],

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA} \quad \text{Eq. 7}$$

sendo, Γ o excesso superficial (mol cm⁻²), Q representa a carga (obtida pela integração da área do pico de dessorção, multiplicado pelo inverso da velocidade de varredura), n o número de elétrons, F a constante de Faraday e A é a área eletroativa do eletrodo de ouro (cm²). Os valores de Γ obtidos para a dessorção da monocamada nos três eletrodos utilizados está representada na Tabela 8 em

comparação com dados da literatura para vários tipos de monocamadas utilizando CDSH.

Tabela 9. Valores dos excessos superficiais (Γ), obtidos a partir da primeira varredura redutiva, dos eletrodos de ouro modificados com SAM mista de β -CDSH + MUA e em comparação com dados da literatura.

Eletrodos	Diâmetro	Γ_{\max} (mol cm ⁻²) [§]	Γ_{\max} (mol cm ⁻²) [*]	Autores [*]
Eletrodo 1	1,6 mm	$8,16 \times 10^{-9}$	$7,50 \times 10^{-11}$	Rojas <i>et al.</i> , 1995
Eletrodo 2	1,6 mm	$8,46 \times 10^{-9}$	$1,90 \times 10^{-10}$	Choi <i>et al.</i> , 2005
Eletrodo G	3,0 mm	$3,52 \times 10^{-9}$	$8,20 \times 10^{-11}$	Endo <i>et al.</i> , 2005

[§]Dados experimentais.

^{*}Dados da literatura

De acordo com os dados experimentais, pode-se observar que a SAM mista de β -CDSH + MUA desenvolvida no presente trabalho, apresenta um valor de recobrimento de eletrodo melhor que os da literatura.

4.3.6. Sensor NTC e NTC + β -CD para MGN e Timol

Nanotubos de carbono (NTC) constituem um tipo dentre os mais importantes materiais ativamente estudados, por suas propriedades físicas extraordinárias, desde sua descoberta por lijima, em 1991 [JIANG *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2008]. A elevada massa molecular relativa (M_r) e as fortes forças entre os tubos fazem com que os NTC existam como pacotes em seu estado nativo, tornando-os insolúveis na maioria dos solventes e limitando dessa forma, manipulação, processamento, caracterização, e aplicação prática dos mesmos [LIU *et al.*, 2008].

As estratégias de modificação química de superfície convencionais usam ácido sulfúrico concentrado, ácido nítrico, ou outros agentes fortemente oxidantes, que tendem a alcançar a solubilização dos NTC. No entanto, essas técnicas conduziram a introdução de um número significativo de defeitos, deteriorando as propriedades eletrônicas e mecânicas intrínsecas, e, assim, eliminando algumas vantagens potenciais dos NTC. Além disso, o tratamento ácido tradicional dos NTC

causa problemas de corrosão e poluição ambiental. Dessa forma, a combinação da atividade eletrocatalítica de NTC com as vantagens conhecidas de outras substâncias como ciclodextrinas parece ser uma alternativa importante para novos desafios eletroanalíticos. Desde que a molécula de β -CD tem dois diferentes tipos de grupos hidroxila, um tipo em cada extremidade da cavidade, por exemplo, grupos hidroxila primários (cauda) e secundários (cabeça), é possível que um dos dois tipos de hidroxila interaja com NTC (Figura 37) [LIU *et al.*, 2008].

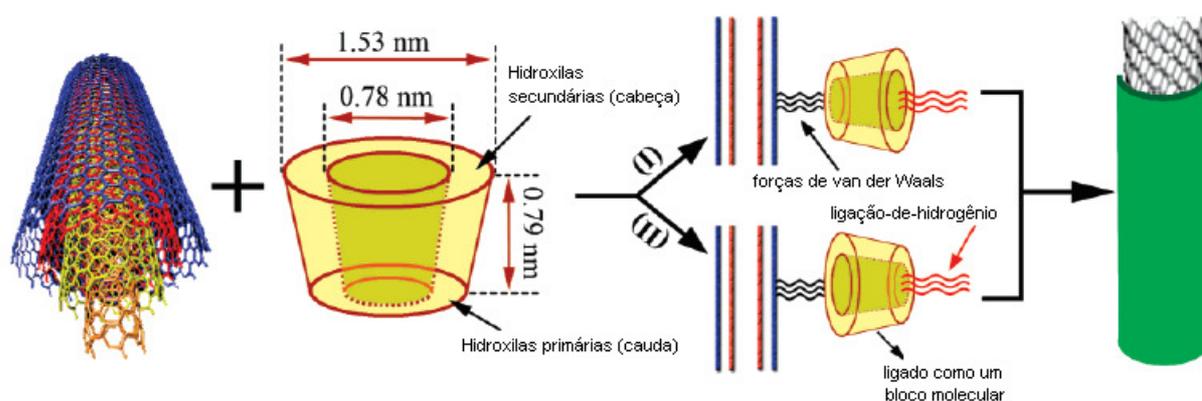


Figura 37. Representação esquemática do mecanismo de formação do composto NTC + β -CD, [adaptado de LIU *et al.*, 2008]

No campo eletroquímico, NTC é usado para preparar eletrodos quimicamente modificados (EQM-NTC). Os NTC podem modificar a eficiência do eletrodo, devido a suas propriedades químicas e físicas, tais como área superficial, muitos grupos funcionais aderidos à superfície e assim por diante. E desta forma, EQM-NTC podem mostrar boa resposta de corrente e sensibilidade. A literatura descreve cinco metodologias de preparo de EQM-NTC, dentre elas a dispersão de NTC em vários solventes [JIANG *et al.*, 2008].

Levando em conta as propriedades eletroquímicas de NTC, como também as propriedades de CD, é possível sugerir a modificação de um eletrodo de carbono vítreo com uma matriz de NTC + β -CD para o estudo de MGN e Timol. O reconhecimento químico de ambos analitos por β -CD incorpora a vantagem da transferência de elétrons mais rápida em razão da presença de NTC na interface do eletrodo [ALARCÓN-ANGELES *et al.*, 2008]. No presente trabalho a oxidação de

MGN e de Timol na superfície do eletrodo são aumentados por sua difusão pelas cavidades de β -CD e pelo contato fácil com o NTC disperso, o que facilita a transferência eletrônica (Figura 38).

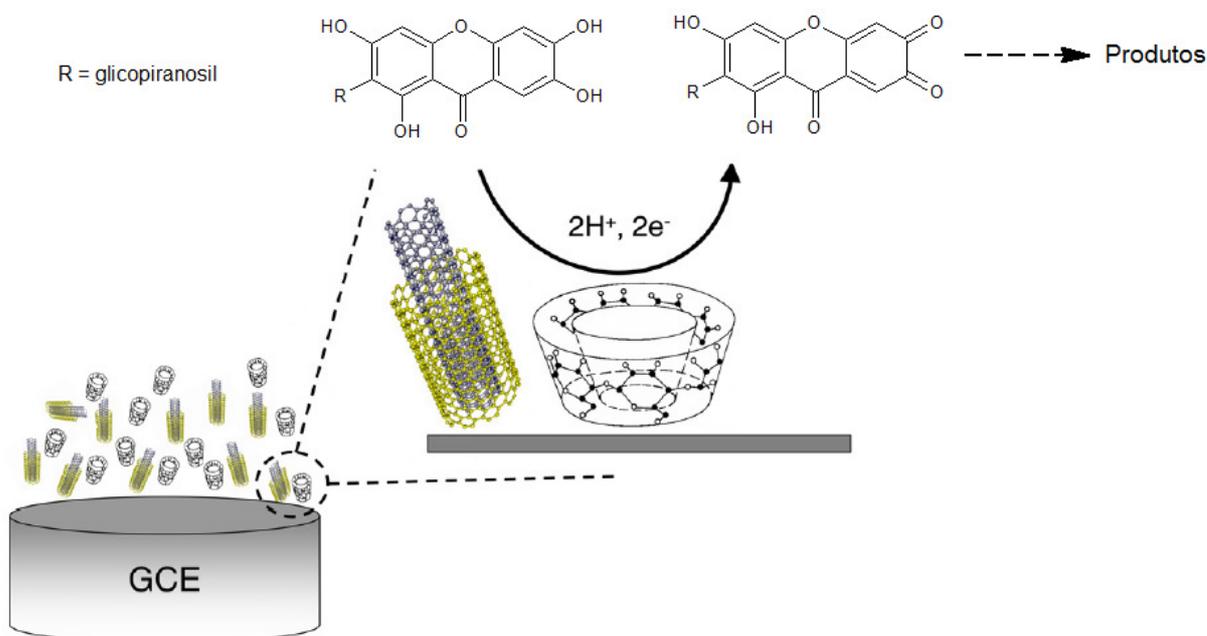


Figura 38. Representação esquemática do sensor eletroquímico para MGN modificado com matriz de NTC + β -CD [adaptado de ALARCÓN-ANGELES *et al.*, 2008].

Foi possível construir uma curva de calibração para MGN e Timol em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0, utilizando o sensor de NTC; como também foi possível calcular os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) desses substratos.

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Para a determinação do limite de detecção utilizou-se o desvio padrão da média aritmética das correntes obtidas dos dez voltamogramas de brancos, no mesmo potencial do pico voltamétrico da oxidação de MGN e Timol, e a relação

$$LD = \frac{3S_B}{b} \quad \text{Eq. 8}$$

onde S_B é o desvio padrão da média aritmética das correntes dos brancos e o b o valor do coeficiente angular da curva analítica.

O limite de quantificação por sua vez, é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Para o cálculo do limite de quantificação utilizou-se a relação abaixo

$$LD = \frac{10S_B}{b} \quad \text{Eq. 9}$$

Na Figura 39, estão representados os voltamogramas de pulso diferencial para MGN utilizando o sensor NTC-1 disperso em DMF (Figura 39a) e sensor NTC tratado com ácido e solubilizado em ciclodextrina (Figura 39c). Sabendo que a quantidade de NTC não é igual nos dois sensores, não se podem comparar valores de potencial ou corrente de pico nas curvas; podem-se, no entanto, comparar os valores de limites de detecção e quantificação representados na Tabela 9. Nota-se que LD e LQ para o sensor NTC ácido com β -CD são melhores do que para o sensor de NTC dispersos apenas em DMF.

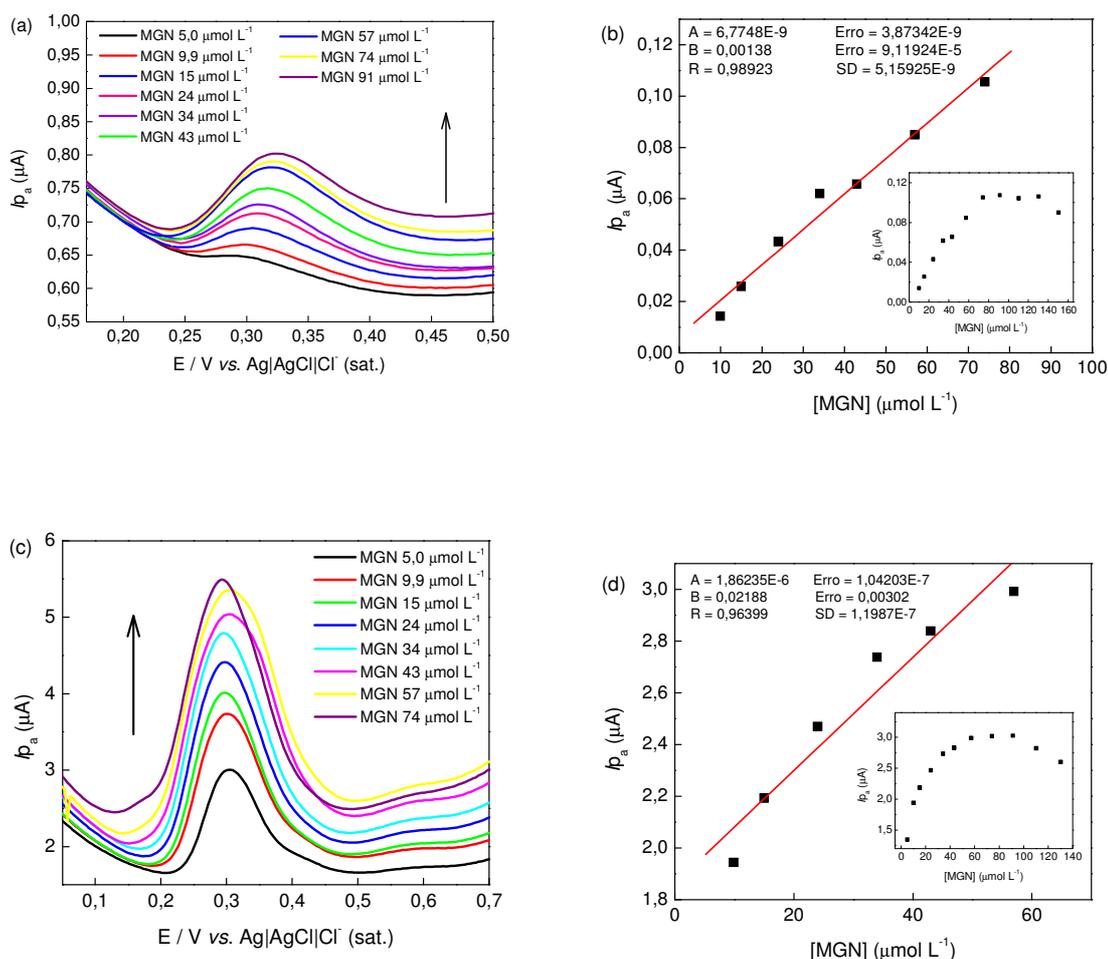


Figura 39. (a) Voltamogramas de pulso diferencial da MGN em sensor de NTC-1; (b) curva de [MGN] vs. i_{p_a} em sensor de NTC-1; Inserção: saturação de MGN no sensor NTC-1; (c) Voltamogramas de pulso diferencial da MGN em sensor NTC + β -CD com tratamento ácido; (d) curva de [MGN] vs. i_{p_a} em sensor de NTC + β -CD com tratamento ácido; Inserção: saturação de MGN no sensor NTC + β -CD com tratamento ácido. Tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0; $a = 50 \text{ mV}$, tempo de pulso = 70 mV s^{-1} , $v = 0,02 \text{ mV s}^{-1}$.

Tabela 10. Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para sensores de NTC e NTC ácido com β -CD.

	Sensor NTC-1	Sensor NTC ácido + β -CD
LD	$3,28 \times 10^{-6}$	$8,64 \times 10^{-7}$
LQ	$1,09 \times 10^{-5}$	$2,88 \times 10^{-6}$

Na Figura 40, representam-se os voltamogramas de pulso diferencial para MGN em sensor NTC-2 e NTC-2 + β -CD. Nenhuma diferença significativa foi observada para o valor de corrente dos dois sensores; observa-se, no entanto, que o sensor que apresentou a melhor resposta voltamétrica foi NTC-2 sem a presença de β -CD, pois a partir de $45 \mu\text{mol L}^{-1}$ a superfície do eletrodo de NTC-2 + β -CD começou a ser bloqueada. Os limites de detecção e quantificação desses sensores também foram calculados (Tabela 10).

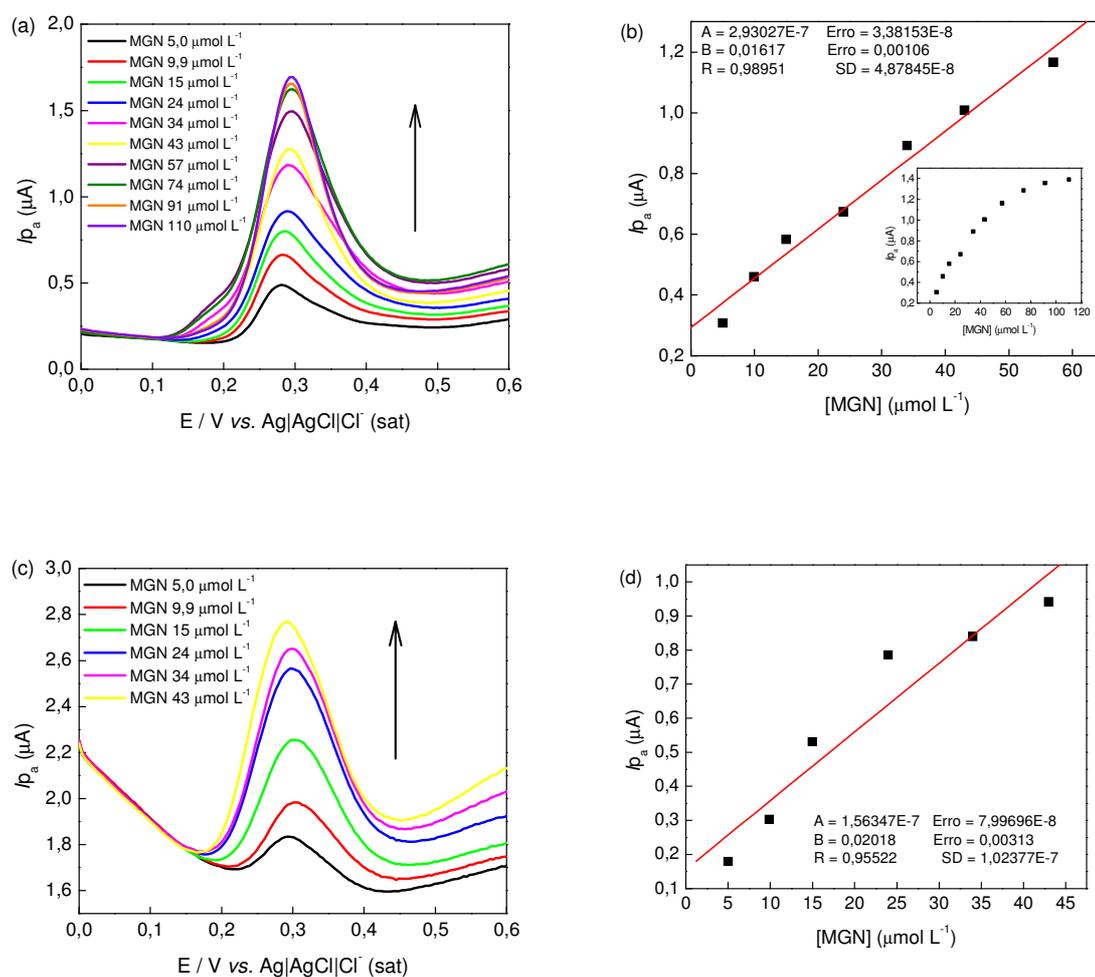


Figura 40. (a) Voltamogramas de pulso diferencial de MGN em sensor de NTC-2; (b) curva de $[\text{MGN}]$ vs. i_{p_a} em sensor de NTC-2; Inserção: saturação de MGN no sensor NTC-2; (c) Voltamogramas de pulso diferencial da MGN em sensor de NTC-2 + β -CD; (d) curva de $[\text{MGN}]$ vs. i_{p_a} em sensor de NTC-2 + β -CD. Tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0; $a = 50 \text{ mV}$, tempo de pulso = 70 ms , $v = 0,02 \text{ mV s}^{-1}$.

Tabela 11. Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para sensores de NTC-2 e NTC-2 + β -CD.

	Sensor NTC-2	Sensor NTC-2 + β -CD
LD	$3,52 \times 10^{-7}$	$4,22 \times 10^{-7}$
LQ	$1,17 \times 10^{-6}$	$1,41 \times 10^{-6}$

Também foi possível construir uma curva de calibração para Timol em sensor NTC-2 e NTC-2 + β -CD. Na Figura 41, representam-se os voltamogramas de pulso diferencial para Timol e os gráficos de [Timol] vs. i_{pa} em sensor de NTC-2 e NTC-2 + β -CD, respectivamente. Observa-se que para o sensor de NTC-2, o potencial de pico encontra-se deslocado para potenciais menos positivos quando do aumento da concentração de Timol (Figura 41a). Um leve deslocamento de potencial de pico para valores menos positivos é observado para Timol no sensor NTC + β -CD (Figura 41c); no entanto, uma ligeira saturação do sensor é observada, visto que Timol adsorve fortemente no eletrodo. Na Tabela 11, representam-se os limites de detecção e quantificação para Timol. Observa-se que o sensor NTC-2 + β -CD apresentou melhores valores de LD e LQ que o sensor NTC-2.

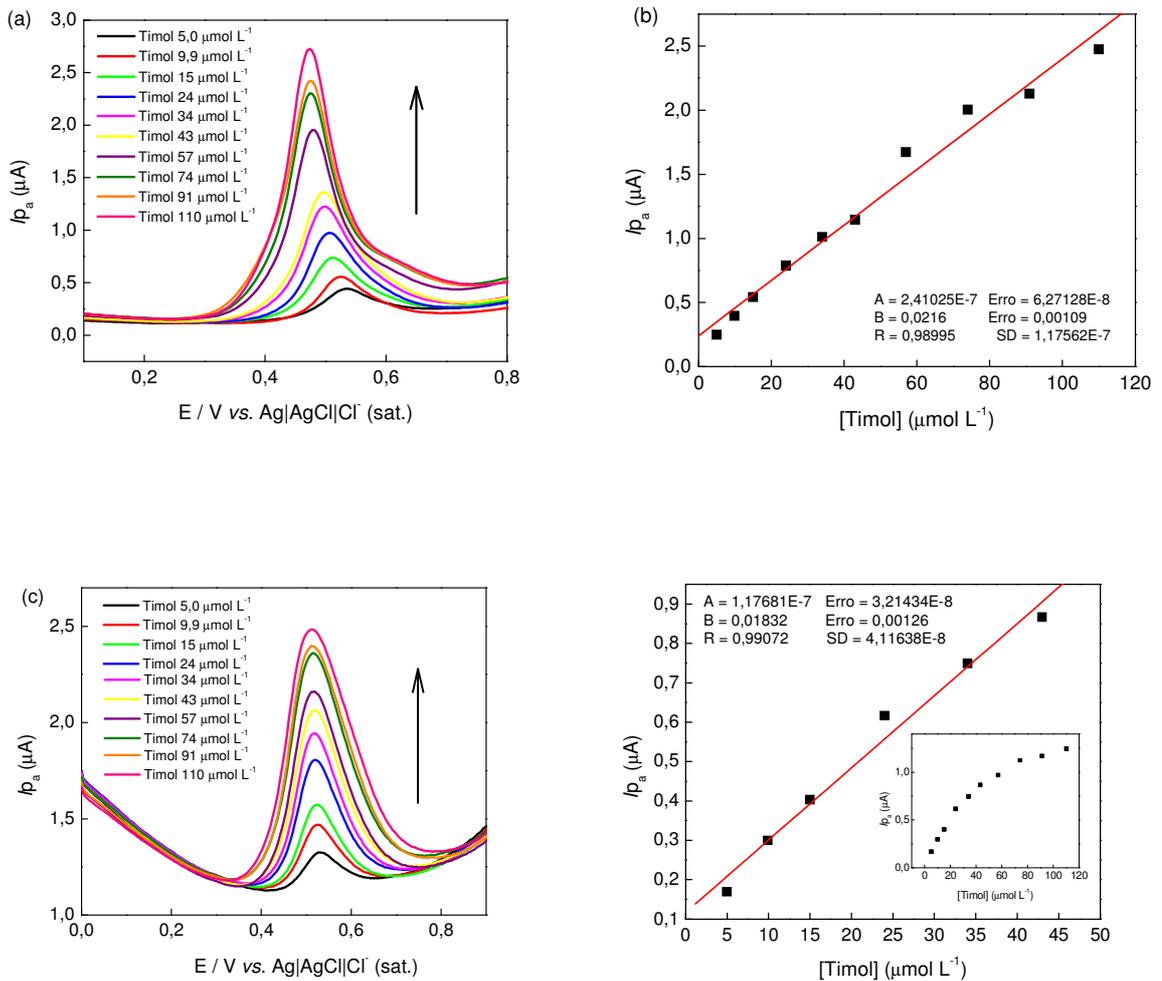


Figura 41. (a) Voltamogramas de pulso diferencial de Timol em sensor de NTC-2; (b) curva de [Timol] vs. i_{p_a} em sensor de NTC-2; (c) Voltamogramas de pulso diferencial de Timol em sensor de NTC-2 + β -CD; (d) curva de [Timol] vs. i_{p_a} em sensor de NTC-2 + β -CD; Inserção: saturação de Timol no sensor NTC-2 + β -CD. Tampão fosfato 0,2 mol L^{-1} ; pH 7,0; $a = 50$ mV, tempo de pulso = 70 mV s^{-1} ; $v = 0,02$ mV s^{-1} .

Tabela 12. Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para sensores de NTC-2 e NTC-2: β -CD.

	Sensor NTC-2	Sensor NTC-2 + β -CD
LD	$1,47 \times 10^{-6}$	$2,52 \times 10^{-6}$
LQ	$4,90 \times 10^{-6}$	$8,38 \times 10^{-6}$

4.3.7. Interação MGN:solvente e MGN: β -CD

O espectro NOESY da MGN em DMSO- d_6 apresentado na Figura 42 mostra que as únicas correlações existentes apresentam-se na região referente ao grupo glicopiranosila das moléculas de MGN.

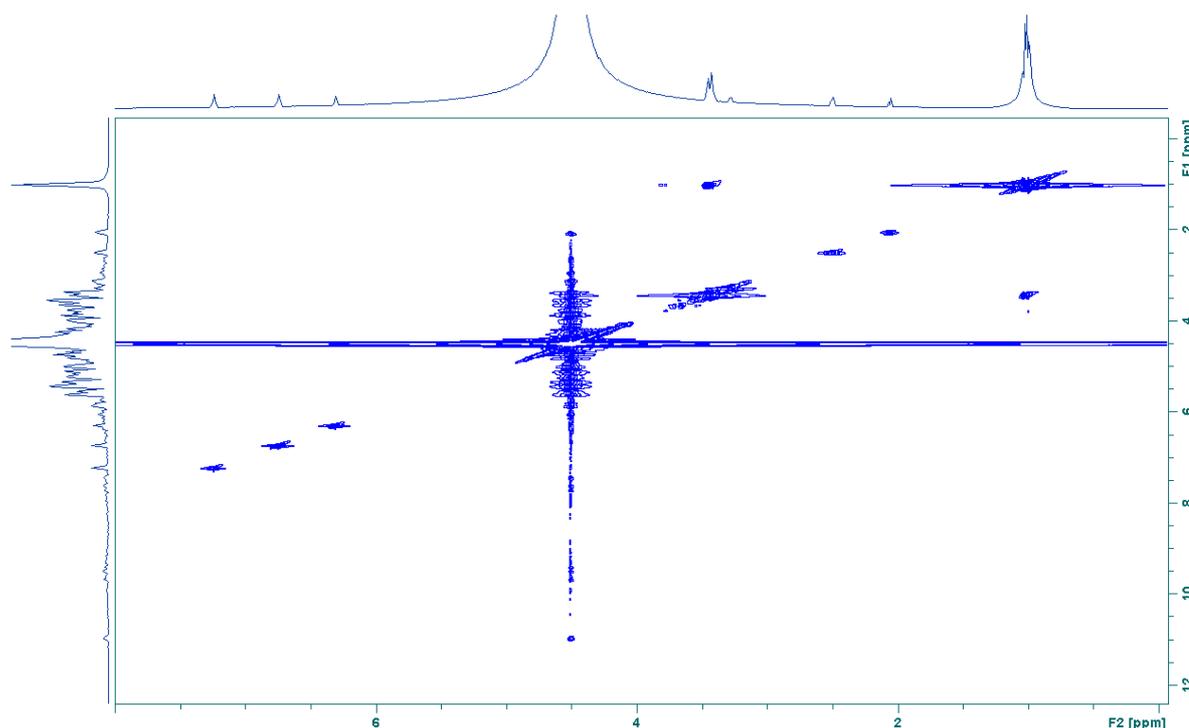


Figura 42. Espectro NOESY da MGN em DMSO- d_6 .

Com o intuito de verificar a interação de MGN com β -CD, realizou-se o experimento NOESY para o complexo MGN: β -CD com razão molar 1:1. O espectro está representado na Figura 43. Nota-se que nenhuma alteração nos deslocamentos químicos ocorre nas dimensões F1 e F2 da região aromática; observam-se porém, algumas alterações na região alifática.

Sabe-se que DMSO- d_6 forma complexo de inclusão com β -CD [AREE & CHAICHIT, 2002]; dessa forma, os sinais adicionais encontrados no espectro da Figura 43 e que não aparecem no espectro da Figura 42 para MGN na ausência de β -CD, sugere que a ciclodextrina pode estar envolvida em complexação de inclusão,

tanto com o grupo glicopiranosila quanto com o solvente; no espectro abaixo contudo, observam-se interações referentes a correlações entre os grupos hidroxila 2 e 3 da β -CD (m em $\delta = 5,7$) e o sinal em (m em $\delta = 3,4$) característico tanto da parte alifática da MGN quanto da β -CD.

Apesar de todos os esforços de eliminar a influência do solvente, MGN tem baixa solubilidade em D_2O e dessa forma foi difícil obter um espectro com qualquer taxa de participação do solvente, visto que a MGN precipitava na mistura, mesmo na presença de β -CD, além da necessidade de uma concentração não muito baixa de MGN para fazer a aquisição do espectro.

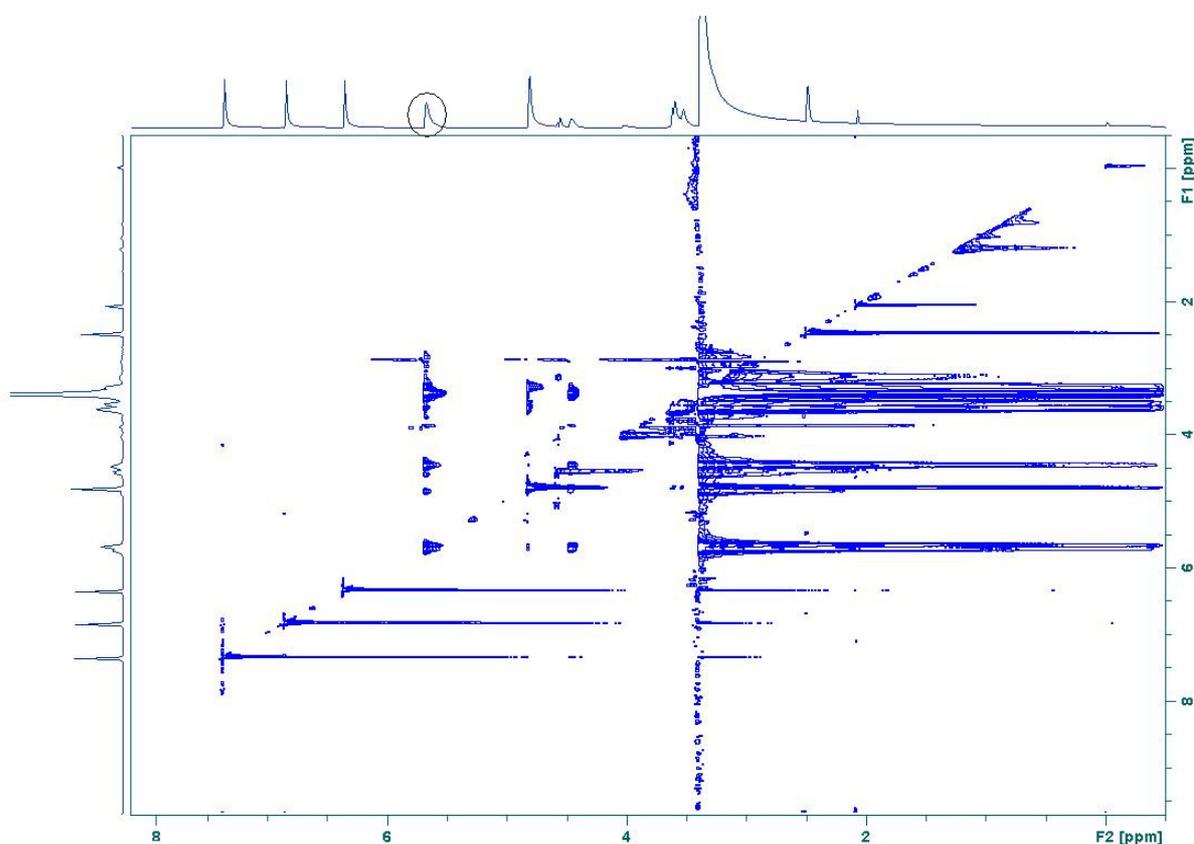


Figura 43. Espectro NOESY do complexo MGN: β -CD, razão molar 1:1 em $DMSO-d_6$.

5. CONCLUSÕES

No presente trabalho foram estudadas a interação de Mangiferina e Timol, dois compostos fenólicos com várias propriedades farmacológicas, com β -ciclodextrina em solução e em SAM.

O estudo da capacidade antioxidante de MGN mostrou que, quando o complexo MGN: β -CD está na razão molar 1:1, a capacidade seqüestradora do radical DPPH é aumentada; no entanto, quando o complexo MGN: β -CD está na razão molar 1:2, a capacidade antioxidante diminui, sugerindo que no complexo 1:2 a β -CD interaja com a MGN, tanto com o grupo glicosila quanto com as hidroxilas 6 e 7 da estrutura xantona.

Com o uso de SAM mista de β -CD + MUA foi possível determinar a K_F para MGN e Timol

As constantes de formação de MGN pelos métodos espectroscópico (1h de contato) e eletroquímico (calculado direta e indiretamente) apresentaram valores próximos, situando-se na mesma ordem de grandeza.

Calculou-se ainda a constante de associação de Timol pelos métodos espectroscópico e eletroquímico, assim como com MGN. Pelos dois métodos estudados, a constante apresentou-se na mesma ordem de grandeza.

A modificação da superfície eletródica com monocamada mista de β -CDSH e MUA proporcionou um excelente recobrimento da superfície de ouro, observado nos estudos de dessorção redutiva.

Pode-se construir curvas analíticas com MGN e Timol, usando eletrodo de NTC possibilitando o uso como sensor, visto a obtenção de bons valores de limite de detecção e quantificação;

Estudos prévios do método bi-dimensional apontam para o encapsulamento de MGN pelo lado glicosila.

6. PERSPECTIVAS

- ✓ Concluir o estudo do complexo de inclusão MGN: β -CD pelo método espectroscópico ^1H -RMN na razão molar 1:1 e 1:2, para avaliar as possíveis interações, tendo como ponto de partida a formação do complexo, via liofilização;
- ✓ Testar novos compostos com atividade farmacológica em SAM mista de β -CDSH + MUA;
- ✓ Realizar diferentes modificações na estrutura da β -CD para testar novas formas de modificação da superfície do eletrodo de ouro e de outros tipos de eletrodos, com a finalidade de buscar sensores mais seletivos e estáveis;
- ✓ Utilizar o complexo MGN: β CD, tendo em vista sua solubilidade e biodisponibilidade, em formulações clínicas, principalmente com efeito gastroprotetor.
- ✓ Dar continuidade ao estudo da toxicidade de Timol frente ao sensor de DNA, visto que foram realizados testes preliminares.
- ✓ Avaliar se a toxicidade de timol diminui após a complexação com β -CD.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, F.C.; FERREIRA, D.C.M.; GOULART, M.O.F; BURIEZ, O.; AMATORE, C. Electrochemical activation of β -lapachone in β -cyclodextrin inclusion complexes and reactivity of its reduced form towards oxygen in aqueous solutions. *J. Electroanal. Chem.*, **2007**, v. 608, pp. 125-132.
- ALARCÓN-ANGELES, G.; PÉREZ-LÓPEZ, B.; PALOMAR-PARDAVE, M.; RAMÍREZ-SILVA, M.T.; ALEGRET, S.; MERKOÇI, A. Enhanced host-guest electrochemical recognition of dopamine using cyclodextrin in the presence of carbon nanotubos. *Carbon*, **2008**, v.46, pp. 898-906.
- ALVAREZ-PARRILLA, E.; DE LA ROSA, L.A.; TORRES-RIVAS, F.; RODRIGO-GARCIA, J. and GONZÁLEZ-AGUILAR, G. Complexation of Apple Antioxidants: Chlorogenic Acid, Quercetin and Rutin by β -Cyclodextrin (β -CD). *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.*, **2005**, v. 53, pp. 121-129.
- AMAZZAL, L.; LAPÔTRE, A.; QUIGNON, F.; BAGREL, D. Mangiferin protects against 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity mediated by oxidative stress in N2A cells. *Neurosci. Lett.*, **2007**, v. 418, pp. 159-164.
- AREE, T.; CHAICHIT, N. Crystal structure of β -cyclodextrin–dimethylsulfoxide inclusion complex. *Carbohydr. Res.*, **2002**, v. 337, pp. 2487-2494.
- AULETTA, T.; van VEGGEL, F.C.J.M. and REINHOUDT, D.N. Self-Assembled Monolayers on Gold of Ferrocene-Terminated Thiols and Hydroxyalkanethiols. *Langmuir*, **2002**, v. 18, pp. 1288-1293.
- BARD, A.J.; FAULKNER, L.R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, Wiley, New York, 1990.

- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova*, **2006**, v. 29, nº 1, pp. 113-123.
- BARRETO, J.C.; TREVISAN, M.T.S.; HULL, W.E.; ERBEN, G.; BRITO, E.S.; PFUNDSTEIN, B.; WÜRTELE, G.; SPIEGELHALDER, B. and OWEN, R.W. Characterization and Quantitation of Polyphenolic Compounds in Bark, Kernel, Leaves, and Peel of Mango (*Mangifera indica* L.). *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, v. 56, pp. 5599-5610.
- BEER, A.-M.; LUKANOV, J.; SAGORCHEV, P. Effect of Thymol on the spontaneous contractile activity of the smooth muscles. *Phytomedicine*, **2007**, v. 14, pp. 65-69.
- BEULEN, M.W.J.; BÜGLER, J.; LAMMERINK, B.; GEURTS, F.A.J.; BIEMOND, E.M.E.F.; van LEERDAM, K.G.C.; van VEGGEL, F.C.J.M.; ENGBERSEN, J.F.J. and REINHOUDT, D.N. Self-Assembled Monolayers of Heptapodant β -Cyclodextrins on Gold. *Langmuir*, **1998**, v. 14, pp. 6424-6429.
- BOLLO, S.; YÁÑEZ, C.; STURM, J.; NÚÑEZ-VERGARA, L. and SQUELLA J.A. Cyclic Voltammetric and Scanning Electrochemical Microscopic Study of Thiolated α -Cyclodextrin Adsorbed on a Gold Electrode. *Langmuir*, **2003**, v. 19, pp. 3365-3370.
- BOUZITOUN, M.; DRIDI, C.; MLIKA, R.; CHAABANE, R.B.; OUADA, H.B.; JABBALLAH, N.; GAM, H.; MAJDOUB, M. Electrical and sensing properties of partially benzylated β -cyclodextrin: Effect of benzyl chain length. *Sens. Actuators, B*, **2007**, v. 126, pp. 91-96.
- BRAGA, P.C.; CULICI, M.; ALFIERI, M., DAL SASSO, M. Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2008**, v. 31, p. 472-477.

BRAGA, P.C.; DAL SASSO, M.; CULICI, M.; ALFIERI, M. Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of *Candida albicans*. *Fitoterapia*, **2007**, v. 78, pp. 396-400.

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

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

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

CHOI, S.-W.; JANG, J.-H.; KANG, Y.-G.; LEE, C.-J.; KIM, J.-H. Characterization of self assembled thiolated β -cyclodextrin and tolane thioacetate mixed monolayer. *Colloids Surf., A*, **2005**, v. 257-258, pp. 31-36.

CIRRI, M.; MAESTRELLI, F.; ORLANDINI, S.; FURLANETTO, S.; PINZAUTI, S. MURA, P. Determination of stability constant values of flurbiprofen–cyclodextrin complexes using different techniques. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2005**, v. 37, pp. 995-1002.

CRUZ Jr., J.W.; MORAES, L.R.; SANTOS, M.H.; SILVA, G.A.; BRIGAGÃO, M.R. P.L.; ELLENA, J. and DORIGUETTO, A.C. Crystalline Structure of Mangiferin, a C-Glycosyl-Substituted 9H-Xanthen-9-one Isolated from the Stem Bark of *Mangifera indica*. *Helv. Chim. Acta*, **2008**, v. 91, pp. 144-154.

DAMOS, F.S.; LUZ, R.C.S.; KUBOTA, L.T. Electrochemical properties of self-assembled monolayer based on mono-(6-deoxy-6-mercapto)- β -cyclodextrin toward controlled molecular recognition. *Electrochim. Acta*, **2007**, v. 53, pp. 1945-1953.

- DAMOS, F.S.; LUZ, R.C.S.; SABINO, A.A.; EBERLIN, M.N.; PILLI, R.A.; KUBOTA, L.T. Adsorption kinetic and properties of self-assembled monolayer based on mono(6-deoxy-6-mercapto)- β -cyclodextrin molecules. *J. Electroanal. Chem.*, **2007**, v. 601, pp. 181-193.
- DAR, A.; FAIZI, S.; NAQVI, S.; ROOME, T.; ZIKR-UR-REHMAN, S.; ALI, M.; FIRDOUS, S. and MOIN, S.T. Analgesic and Antioxidant Activity of Mangiferin and Its Derivatives: the Structure Activity Relationship. *Biol. Pharm. Bull.*, **2005**, v. 28, n. 4, pp. 596-600.
- DEL NOBILE, M.A; CONTE, A.; INCORONATO, A.L.; PANZA, O. Antimicrobial efficacy and release kinetics of thymol from zein films. *J. Food Eng.*, **2008**, v. 89, pp. 57-63.
- EL-GENGAIHI, S.E.; AMER, S.A.A. AND MOHAMED, S.M. Biological activity of Thyme oil and Thymol against *Tetranychus urticae* Koch. *J. Pest Sci.*, **1996**, v. 69, nº 7, pp. 157-159.
- ENDO, H., NAKAJI-HIBARAYASHI, T.; MOROKOSHI, S.; GEMMEI-IDE, M. and KITANO, H. Orientational Effect of Surface-Confined Cyclodextrin on the Inclusion of Bisphenol. *Langmuir*, **2005**, v. 21, pp. 1314-1321.
- FREIRE, R.S.; PESSOA, C.A. e KUBOTA, L.T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. *Quím. Nova*, **2003**, v. 26, nº 3, pp. 381-389.
- GARRIDO, G.; GONZÁLEZ, D.; LEMUS, Y.; GARCÍA, D.; LODEIRO, L.; QUINTERO, G.; DELPORTE, C.; NÚÑEZ-SELLÉS, A.J.; DELGADO, R. In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG®). *Pharmacol. Res.*, **2004**, v. 50, pp. 143-149.
- GIORDANO, F.; NOVAK, C.; MOYANO, J.R. Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. *Thermochim. Acta*, **2001**, v. 380, pp. 123-151.

GÓMEZ-ZALETA, B.; RAMÍREZ-SILVA, M.T.; GUTIÉRREZ, A.; GONZÁLEZ-VERGARA, E.; GÜIZADO-RODRÍGUEZ, M.; ROJAS-HERNÁNDEZ, A. UV/vis, ¹H, and ¹³C NMR spectroscopic studies to determine mangiferin pK_a values. *Spectrochim. Acta, Part A*, **2006**, v. 64, pp. 1002-1009.

GRILLO, R.; MELO, N.F.S.; FRACETO, L.F.; BRITO, C.L. TROSSINI, G.H.G.; MENEZES, C.M.S.; FERREIRA, E.I.; MORAES, C.M. Caracterização físico-química de complexo de inclusão entre Hidroximetilnitrofurazona e Hidroxipropil-β-Ciclodextrina. *Quim. Nova*, **2008**, v. 31, n^o. 2, pp. 290-295.

HERNÁNDEZ-BENITO, J.; GONZÁLEZ-MANCEBO, S.; CALLE, E.; GARCÍA-SANTOS M.P. AND CASADO, J. A Practical Integrated Approach to Supramolecular Chemistry. I. Equilibria in Inclusion Phenomena. *J. Chem. Educ.*, **1999**, v. 76, n^o 3, pp. 419-421.

JAGETIA, G. C.; BALIGA, M. S. Radioprotection by mangiferin in DBAxC57BL mice: a preliminary study. *Phytomedicine*, **2005**, v. 12, pp. 209–215.

JAGETIA, G.C.; VENKATESHA, V.A. Mangiferin protects human peripheral blood lymphocytes against γ-radiation–induced DNA strand breaks: a fluorescence analysis of DNA unwinding assay. *Nutr. Res.*, **2006**, v. 26, pp. 303-311.

JIANG, Q.; SONG, L.J.; YANG, H.; HE, Z.W.; ZHAO, Y. Preparation and characterization on the carbon nanotube chemically modified electrode grown in situ. *Electrochem. Commun.*, **2008**, v. 10, pp. 424-427.

JUKIC, M. and MILOS, M. Catalytic Oxidation and Antioxidant Properties of Thyme Essential Oils (*Thymus vulgarae* L.). *Croat. Chem. Acta*, **2005**, v. 78, n^o 1, pp. 105-110.

KARATHANOS, V.T.; MOURTZINOS, I.; YANNAKOPOULOU, K.; ANDRIKOPOULOS, N.K. Study of the solubility, antioxidant activity and structure

of inclusion complex of vanillin with β -cyclodextrin. *Food Chem.*, **2007**, v. 101, pp. 652-658.

LEAL, L.K.A.M.; OLIVEIRA, V.M.; ARARUNA, S.M.; MIRANDA, M.C.C.; OLIVEIRA, F.M.A. Análise de timol por CLAE na tintura de *Lippia sidoides* Cham. (alecrim-pimenta) produzida em diferentes estágios de desenvolvimento da planta. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **2003**, v. 13, supl., pp. 09-11.

LEE, J.-Y. and PARK, S.-M. Electrochemistry of Guest Molecules in Thiolated Cyclodextrin Self-Assembled Monolayers: An Implication for Size-Selective Sensors. *J. Phys. Chem. B*, **1998**, v. 102, pp. 9940-9945.

LEIRO, J. M.; ÁLVAREZ, E.; ARRANZ, J. A.; SISO, I. G.; ORALLO, F. In vitro effects of mangiferin on superoxide concentrations and expression of the inducible nitric oxide synthase, tumour necrosis factor- α and transforming growth factor- β genes. *Biochem. Pharmacol.*, **2003**, v. 65, pp. 1361-1371.

LIU, K.; FU, H.; XIE, Y.; ZHANG, L.; PAN, K.; ZHOU, W. Assembly of α -Cyclodextrins Acting as Molecular Bricks onto Multiwall Carbon Nanotubes. *J. Phys. Chem. C*, **2008**, v. 112, pp. 951-957.

LOFTSSON, T. and MASSON, M. Review. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *Int. J. Pharm.*, **2001**, v. 225, p. 15-30.

LÓPEZ-NICOLÁS, J.M.; GARCÍA-CARMONA, F. Rapid, simple and sensitive determination of the apparent formation constants of trans-resveratrol complexes with natural cyclodextrins in aqueous medium using HPLC. *Food Chem.*, **2008**, v. 109, pp. 868-875.

MAEDA, Y.; FUKUDA, T.; YAMAMOTO, H. and KITANO, H. Regio- and Stereoselective Complexation by a Self-Assembled Monolayer of Thiolated Cyclodextrin on a Gold Electrode. *Langmuir*, **1997**, v. 13, nº 16, pp.4187-4189.

MIURA, T.; ICHIKI, H.; HASHIMOTO, I.; IWAMOTO, N.; KATO, M.; KUBO, M.; ISHIHARA, E.; KOMATSU, Y.; OKADA, M.; ISHIDA, T. and TANIGAWA, K. Antidiabetic activity of a xanthone compound, mangiferin. *Phytomedicine*, **2001**, v. 8, n° 2, pp. 85-87.

MIURA, T.; IWAMOTO, N.; KATO, M.; ICHIKI, H.; KUBO, M.; KOMATSU, Y.; ISHIDA, T. OKADA, M. and TANIGAWA, K. The Suppressive Effect of Mangiferin with Exercise on Blood Lipids in Type 2 Diabetes. *Biol. Pharm. Bull.*, **2001**, v. 24, n° 9, p. 1091-1092.

MONTEIRO, M.V.B.; LEITE, A.K.R.M.; BERTINI, L.M.; MORAIS, S.M.; NUNES-PINHEIRO, D.C.S. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. Leaves. *J. Ethnopharmacol.*, **2007**, v. 111, pp. 378-382.

MORAES, C.M.; ABRAMI, P.; GONÇALVES, M.M.; FILHO, N.A.; FERNANDES, S.A.; PAULA, E.; FRACETO, L.F. Preparação e caracterização físico-química de complexos de inclusão entre anestésicos locais e hidroxipropil- β -ciclodextrina. *Quim. Nova*, **2007**, v. 30, n° 4, pp. 777-784.

MULINACCI, N.; MELANI, F.; VINCIERI, F.F.; MAZZI, G.; ROMANI, A. ¹H-NMR NOE and molecular modelling to characterize thymol and carvacrol β -cyclodextrin complexes. *Int. J. Pharm*, **1996**, v. 128, pp. 81-88.

NOVELINO, A.M.S.; DAEMON E.; SOARES, G.L.G. Avaliação da atividade repelente do timol, mentol, salicilato de metila e ácido salicílico sobre larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, **2007**, v. 59, n. 3, pp. 700-704.

ÖZGÜVEN, M.; TANSI, S. Drug Yield and Essential Oil of *Thymus vulgaris* L. as in Influenced by Ecological and Ontogenetical Variation. *Tr. J. of Agriculture and Forestry*, **1998**, v. 22, pp. 537-542.

- PARDO ANDREU, G.; DELGADO, R.; VELHO, J.A.; CURTI, C.; VERCESI, A.E. Iron complexing activity of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone, inhibits mitochondrial lipid peroxidation induced by Fe²⁺-citrate. *Eur. J. Pharmacol.*, **2005**, v. 513, pp. 47-55.
- PARDO-ANDREU, G. L.; DELGADO, R.; NÚÑEZ-SELLÉS, A. J.; VERCESI, A. E. Dual mechanism of mangiferin protection against iron-induced damage to 2-deoxyribose and ascorbate oxidation. *Pharmacol. Res.*, **2006**, v. 53, pp. 253-260.
- PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Quím. Nova*, **2002**, v. 25, nº 6, pp. 1012-1021.
- POLYAKOV, N.E.; LESHINA, T.V.; KONOVALOVA, T.A.; HAND, E.O.; KISPERT, L.D. Inclusion complexes of carotenoids with cyclodextrins: 1H NMR, EPR, and optical studies. *Free Radical Biol. & Med.*, **2004**, v. 36, nº 7, pp. 872-880.
- PRABHU, S. N.; Devi C.S.S. Efficacy of mangiferin on serum and heart tissue lipids in rats subjected to isoproterenol induced cardiotoxicity. *Toxicology*, **2006**, v. 228, pp. 135-139.
- PRABHU, S.; JAINU, M.; SABITHA, K.E.; DEVI, C.S.S. Role of mangiferin on biochemical alterations and antioxidant status in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *J. Ethnopharmacol.*, **2006**, v. 107, pp. 126-133.
- RAJ, C.R.; RAMARAJ, R. Electrochemistry and photoelectrochemistry of phenothiazine dye- β -cyclodextrin inclusion complexes. *J. Electroanal. Chem.*, **1996**, v. 405, pp. 141-147.
- RAO, T.V.S.; HUFF, J.B.; BIENIARZ, C. Supramolecular Control of Photophysical Properties of Cyanine Dyes. *Tetrahedron*, **1998**, v. 54, pp. 10627-10634.

- ROJAS, M.T.; KÖNIGER, R.; STODDART, J.F. and KAIFER, A.E. Supported Monolayers Containing Preformed Binding Sites. Synthesis and Interfacial Binding Properties of a Thiolated β -Cyclodextrin Derivative. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, v. 117, pp. 336-343.
- SÁNCHEZ-MORENO, C.; LAURRARI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food Res. Int.*, **1999**, v. 32, pp. 407-412.
- SANTOS, A.B. *Atividade Antioxidante de Extratos Vegetais da Flora Brasileira: Estudo com Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) e Teoria do Funcional da Densidade*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 2006.
- SOMEYA, H.; HIGO, Y.; OHNO, M.; TSUTSUI, T.W.; TSUTSUI, T. Clastogenic activity of seven endodontic medications used in dental practice in human dental pulp cells. *Mutat. Res.*, **2008**, v. 650, pp. 39-47.
- SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-Jr, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S. e CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim. Nova*, **2007**, v. 30, nº 2, pp. 351-355.
- SOUZA, D.; MACHADO, S.A.S.; AVACA, L.A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. *Quim. Nova*, **2003**, v. 26, nº 1, pp. 81-89.
- STRAZISAR, M.; ANDRENESEK, S.; SMIDOVNIK, A. Effect of β -cyclodextrin on antioxidant activity of coumaric acids. *Food Chem.*, 2008, v. 110, pp. 636-642.
- SVIRCEV, A.M.; SMITH, R.J.; ZHOU, T.; HERNADEZ, M.; LIU, W.; CHU, C.L. Effects of thymol fumigation on survival and ultrastructure of *Monilinia fructicola*. *Postharvest Biol. Technol.*, **2007**, v. 45, pp. 228-233.

- SZEJTLI, J. and SZENTE, L. Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2005**, v. 61, pp. 115-125.
- SZENTE, L. and SZEJTLI, J. Cyclodextrins as food ingredients. *Trends Food Sci. Technol.*, **2004**, v. 15, pp. 137-142.
- TENG, H.; YU, C.; ZHAI, D.; LI, Z.; LIU, J. Hainan Shengtian in Artificial Pharm, **2008** (CN1977855-A).
- VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim. Nova*, **2007**, v. 30, nº 5, pp. 1323-1338.
- VENTURINI, C. G.; NICOLINI, J.; MACHADO, C. e MACHADO, V. G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. *Quím. Nova*, **2008**, v. 31, nº 2, pp. 360-368.
- YAN, C.; XIU, Z.; LI, X.; HAO, C. Molecular modeling study of β -cyclodextrin complexes with (+)-catechin and (-)-epicatechin. *J. Mol. Graphics Modell.*, **2007**, v. 26, pp. 420-428.
- YANG, J.; LIN, H.-J.; HUANG, H-Y. Characterization of cyclodextrin-modified infrared chemical sensors. Part I. Modeling the mechanisms of interaction. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, v. 527, pp. 27-36.