



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA – IQB
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA – RENORBIO
LABORATÓRIO DE ELETROQUÍMICA E MICROSSISTEMAS DE ANÁLISES**

EMANUELLA GOMES DA SILVA

Estudo da interação de carreadores com compostos naturais bioativos, via espectroscopia e eletroquímica: avaliação e desenvolvimento de plataformas contendo sistemas de nanocarreadores híbridos, conjugados com pontos quânticos de CdSe/CdS

Maceió

2018

EMANUELLA GOMES DA SILVA

Estudo da interação de carreadores com compostos naturais bioativos, via espectroscopia e eletroquímica: avaliação e desenvolvimento de plataformas contendo sistemas de nanocarreadores híbridos, conjugados com pontos quânticos de CdSe/CdS

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia na Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do grau de Doutora em Biotecnologia em Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino

Maceió

2018

Catálogo na fonte
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale – CRB4 - 661

S586e Silva, Emanuella Gomes da.

Estudo da interação de carreadores com compostos naturais bioativos, via espectroscopia e eletroquímica: avaliação e desenvolvimento de plataformas contendo sistemas de nanocarreadores híbridos, conjugados com pontos quânticos de CdSe/CdS / Emanuella Gomes da Silva. – 2019.

178 f.: il.

Orientadora: Fabiane Caxico de Abreu Galdino.

Tese (Doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) - Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2018.

Inclui bibliografia.

Anexos: 169-178.

1. Ácido tânico. 2. Ácido úsnico. 3. Mangiferina. 4. β -lapachona. 5. Ciclodextrina. 6. Poliamidoamina. 7. Ponto quântico. I. Título.

CDU: 544.6

EMANUELLA GOMES DA SILVA

**Estudo da interação de carreadores com compostos naturais bioativos,
via espectroscopia e eletroquímica: avaliação e desenvolvimento de
plataformas contendo sistemas de nanocarreadores híbridos, conjugados
com pontos quânticos de CdSe/CdS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em: 12/11/2018.

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Fabiane Caxico Abreu Galdino
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Prof.^a Dr.^a Beate Saegesser Santos
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE



Prof. Dr. Josealdo Tonholo
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Prof. Dr. Phabyanno Rodrigues Lima
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Alagoas – IFAL
Campus Maceió

“E se não houver outra vida... essa você viveu?”.

(Autor desconhecido)

“Deus coloca as melhores coisas depois de um obstáculo; você conseguirá tudo na vida quando decidir que quer vencer o seu medo”.

(Will Smith)

“Kage Bunshin No Jutsu - 影分身の術”

(Naruto)

Dedico este trabalho ao meu falecido pai Manoel Gomes da Silva, te honrarei por toda minha vida, à minha família, amigos e orientadora, pelo apoio neste caminho árduo que é fazer ciência.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me renova a cada manhã, dando forças e coragem para me manter em perseverança rumo aos meus sonhos. Dificuldades todos nós enfrentamos, só nos resta um olhar de esperança para acreditarmos que tudo na vida passa, tanto os momentos felizes como os mais tristes também. Se algo aprendi nesta vida é de que “tudo é no tempo de Deus”. Tudo o que tenho, ou acho que tenho devo tudo à Deus. Deus em 1º lugar.

Aos meus pais, graças a educação rigorosa e voltada aos estudos pude ter inúmeras oportunidades de melhoria de vida. Graças a eles, em particular a minha mãe, desenvolvi resistência e persistência o que me ajuda a lidar com as tribulações da vida. Ela que é sinônimo de persistência, não desiste, resiste a tudo e todos, para no fim, após anos, mostrar que estava certa desde o início. É sem dúvidas a pessoa mais resiliente que conheço, uma guerreira de fé.

Pai, só lamento não estar presente neste momento tão importante para mim, e acredito que para o senhor também, meu super-homem, eu lhe prometi dar o meu máximo e aqui estou. Sua simplicidade, humildade e humanidade foram meu exemplo de vida. Vencerei através da minha formação pois sei o quanto abdicou por mim e por minhas irmãs, não deixarei que seus esforços tenham sido em vão.

As minhas irmãs, Marta Luana e Mirely, meninas guerreiras, juntas somos fortes. Acompanharam minha trajetória até aqui, sendo meu apoio e um exemplo em suas áreas. Faço o meu melhor, esperando o melhor de vocês.

À Thiago, sempre me ajudou, meu incentivador, não importa a ideia nem o quão difícil possa parecer, ele dizia: “Quer? Corra atrás, você consegue é a pessoa mais capaz que eu conheço!”. Espero honrar todas as expectativas em mim depositadas. Muito obrigada pelos anos que dedicou a mim, lhe desejo todo o sucesso e felicidade.

À minha orientadora, Fabiane Caxico, essa pessoa que tem uma mente que borbulha ideias 24h horas, obrigada pela confiança em mim depositada na realização desse e de tantos outros projetos, e por toda a compreensão de muitos momentos de

baixa produtividade. É de conhecimento que temos que ter alguns exemplos de pessoas a quem se espelhar e ela é um dos meus ícones desde 2006, quando ainda estava na iniciação científica, durante a graduação fez com que me apaixonasse pela pesquisa. Tive o privilégio de aprender a limpar eletrodo com ela!

Aos colegas do LEMAN (Laboratório de eletroquímica e microssistemas de análise) no IQB-UFAL que tornam o dia-a-dia da pesquisa mais leve. Além das construtivas discussões ao longo dos experimentos, onde a experiência de bancada auxilia muito na elucidação de pontos críticos. Além das importantes colaborações, entre projetos, para produção científica. À Sara, Elvis, Guima, Palmeira, Renata, Samaysa, Carol, Leilane e Anglades que me acompanharam mais de perto nessa reta final, obrigada pela paciência e motivação nos momentos de desânimo.

A todos que passaram por minha vida e marcaram de alguma forma, deixando um pouco da sua experiência. Tantos colegas da ciência, conviver com tantas pessoas esforçadas e dedicadas ao aprendizado me fez crescer, acima de tudo, como pessoa.

Sou muito grata a todos os meus mestres desde o fundamental até ... sempre, aos professores que me cobraram o máximo e aos que me exigiram além de mim, a esses toda a minha gratidão, hoje entendo. “Se espreme mais as laranjas que dão caldo!”. Cada qual em particular deixou uma lembrança e aqui não poderia deixar de mencionar o “tio Niva”, deixará saudades, com seu jeito singular de ser.

Aos 12 anos de ELETROQUÍMICA, e meu primeiro contato com a professora Fabiane em novembro de 2006, ironicamente defendendo minha tese em novembro de 2018, foi muito chão até aqui. Após a graduação, em 2011 me desliguei por 2 anos, mas voltei, porque eu amo isso! Posso não ser boa no que faço, mas o laboratório é minha casa e minha família! A todos os que passaram pela eletroquímica, obrigada pelas contribuições e meu respeito, por escolherem uma área tão complexa e tão vastamente rica. Fabrícia e Lara, exemplos de metodologia e organização, Profa. Marília pessoa devotada ao trabalho, obrigada pelo exemplo; Andresa, Jadri, Mônica, Natália, somos as sobreviventes daquela época; e aos demais colegas, professores de IFs, UFs, fico feliz pelas inúmeras histórias de sucesso.

À UFAL e aos órgãos de fomento, como CNPq, CAPES e FAPEAL que possibilitaram o desenvolvimento deste projeto, especialmente ao último que disponibilizou a bolsa de doutorado. Também ao centro de pesquisa CETENE em Recife-PE, onde foi desenvolvida parte do trabalho, por meio de auxílio FACEPE/CETENE. E aos professores Noélio e Anielle que forneceram os PQs.

Mais que uma tese aqui está parte da minha vida, dias e noites, obrigada a todos que contribuíram direta ou indiretamente, e foram “muitos”, pois sou plenamente ciente de que ninguém faz nada significativo sozinho.

RESUMO

Muitos agentes terapêuticos, como extratos, moléculas pequenas, genes e peptídeos apresentam excelente potencial terapêutico, porém são limitados por baixa solubilidade, alta toxicidade ou mesmo instabilidade, impedindo significativamente seu uso na clínica medicamentosa. Na busca dessas melhorias vem-se empregando o uso de nanomateriais como: ciclodextrinas, dendrímeros e pontos quânticos (PQ), este último apresenta dupla funcionalidade diagnóstica e terapêutica (teranóstica). O trabalho tem como objetivo a síntese, caracterização e aplicação de nanocarreadores como ciclodextrinas e dendrímeros à extrato de barbatimão, ácido tânico (TA), ácido úsnico (UA), mangiferina (MGF) e β -lapachona (β -LP), visando aumento da solubilidade, a potencialização de suas atividades biológicas, bem como, a diminuição da citotoxicidade dos mesmos. Alguns desses nanomateriais foram associados à PQs visando o monitoramento da terapêutica e/ou diagnóstico. Para elucidar as interações de complexação entre o composto ativo e o carreador foram utilizadas as técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica (VC), pulso diferencial (VPD) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), tanto para estudos em solução como com plataformas nanoestruturadas; espectroscopia no UV-vis e fluorescência; ATR-FTIR e RMN ^1H . Foi possível verificar forte interação do TA com HP- β -CD na razão 1:2 com constante de interação (K) de $6,8 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$. O estudo de viabilidade celular com linfócitos indica melhora na viabilidade pelo complexo. Foi possível determinar K via UV-vis, a maior interação foi verificada para MGF e PAMAMG3 ($5 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$); UA e PAMAMG3 ($2,58 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$) numa relação inversamente proporcional a temperatura; e β -LP com PAMAMG2 ($2,7 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$) à 25 °C. Via fluorescência, os PAMAMs se comportam como quenching da MGF, a K_a de $6,3 \times 10^{10}$ foi estimada para G2. Por eletroquímica, a imobilização dos carreadores no eletrodo foi caracterizada por EIE, já o processo de interação com PAMAM imobilizado não pode ser acompanhado via VC ou VPD por oxidação, enquanto que a interação entre o PQ CdSe/CdS e PAMAM, no ITO se mostrou promissora. Com a microbalança de cristal de quartzo foi possível estimas 3×10^{11} moléculas de UA que interagiram na SAM de MUA/PAMAM. Nos PQs modificados com CDSH, em solução, a fluorescência de MGF aumenta e AU se comporta como um quenching. Quanto a interação dos compostos com dsDNA, o UA reage com ssDNA e MGF com dsDNA imobilizado e em solução com K de $2,6 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$, estudo em triplicada por VPD. Parte dos complexos formados foram caracterizados por FTIR e RMNH 1 . Em suma, o composto TA apresenta mudanças no perfil óptico e eletroquímico em presença de HP- β -CD, formando um complexo de interação 1:2 com a parte externa da HP- β -CD. Os PQs mágicos demonstraram aumentar a sensibilidade dos sistemas testados e promissor na construção de sensores de ITO. O UA, β -LP e MGF interagem com PAMAM de diferentes gerações e Microbalança na determinação de moléculas envolvidas de UA e PAMAMG3. Os compostos UA e MGF interagem com DNA.

Palavras chave: ácido tânico, ácido úsnico, mangiferina, β -Lapachona, ciclodextrina, PAMAM e ponto quântico

ABSTRACT

Many therapeutic agents such as extracts, small molecules, genes and peptides have excellent therapeutic potential, but are limited by their low solubility, high toxicity or even instability, significantly impeding their use in the clinical practice. In the search for these improvements, nanomaterials such as cyclodextrins, dendrimers and quantum dots (PQ) are employed, with the latter possessing dual diagnostic and therapeutic functionality (teranostics). The aim of this work is to synthesize, characterize and apply nanocarriers such as cyclodextrins and dendrimers to barbatimão extract, tannic acid (TA), uncinic acid (UA), mangiferin (MGF) and β -lapachona β -LP, aiming to increase their solubility, the potentiation of their biological activities, as well as decrease their cytotoxicity. Some of these nanomaterials will be associated with PQs for monitoring of therapy and / or diagnosis. In order to elucidate the complexation interactions between the active compound and the carrier, the electrochemical techniques of cyclic voltammetry (CV), differential pulse voltammetry (DPV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) were used for both solution and nanostructured platforms; UV-vis spectroscopy and fluorescence; ATR-FTIR and ^1H NMR. It was possible to verify strong interaction of TA with HP- β -CD in the ratio 1: 2 with interaction constant (K) of $6.8 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$. The cell viability study with lymphocytes indicates an improvement in the viability of the complex. It was possible to determine K via UV-vis, the highest interaction was verified for MGF and PAMAMG3 ($5 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$); UA and PAMAMG3 ($2.58 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$) in a ratio inversely proportional to temperature; and β -LP with PAMAMG ($2.7 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$) at 25°C . Via fluorescence, the PAMAMs behave as quenching of FGM fluorescence, the K_a of 6.3×10^{10} was estimated for G2. By electrochemistry, the immobilization of the carriers in the electrode was characterized by EIS. The interaction process with immobilized PAMAM cannot be monitored via CV or DPV by oxidation, since the interaction between the QD CdSe / CdS and PAMAM in the ITO is promising. With the quartz crystal microbalance (MCQ) it was possible to estimate 3×10^{11} AU molecules that interacted in the SAM of MUA / PAMAM. QDs modified with CDSH in solution increase the fluorescence of MGF and UA behaves as a quenching agent. Regarding the interaction of the compounds with dsDNA, UA reacts with ssDNA and MGF with immobilized dsDNA and in solution with K of $2.6 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$, based on a study done in triplicate by VPD. Part of the complexes formed were characterized by FTIR and ^1H NMR. In short, the compound TA presents changes in the optical and electrochemical profile in the presence of HP- β -CD, forming a complex of 1:2 interaction with the external part of HP- β -CD. The magic QDs have shown to increase the sensitivity of the systems tested and promising in the construction of ITO sensors. The UA, β -LP and MGF interact with PAMAM of different generations and MCQ in the determination of involved molecules of UA and PAMAMG3. The UA and MGF compounds interact with DNA.

Keywords: tannic acid, cyclodextrin, uncinic acid, mangiferin, β -Lapachona, PAMAM and quantum dot.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Estrutura química de taninos condensados, lineares (com 4→8 ligações) ou ramificados (com 4→6 ligações). | 32 |
| Figura 2 - Estrutura molecular do A) ácido tânico e B) ácido gálico. | 33 |
| Figura 3 - Esquema de estrutura funcional da α , β e γ -CD e sua geometria dimensional. | 35 |
| Figura 4 - Ilustração esquemática da ciclodextrina livre (hospede) e substrato (hospedeiro) para formar o complexo substrato-CD. | 36 |
| Figura 5 - Esquema representativo da estrutura da HP- β -CD. | 36 |
| Figura 6 - Oxidação de monoânions de β -CD mediada por ferrocênio e modificação covalente da superfície de carbono, à esquerda. Ilustração do eletrodo modificado, à direita. | 37 |
| Figura 7 - À direita gráfico de n° de patentes por ano em todo o mundo segundo LENS; à esquerda, o n° de patentes de acordo com as plataformas de busca. | 38 |
| Figura 8 - Níveis de energia eletrônica e transições. | 39 |
| Figura 9 - Diagrama de Jablonski, diagrama parcial de níveis de energia para um sistema fotoluminescente. | 41 |
| Figura 10 - Representação esquemática do (a) Potencial aplicado ao eletrodo, tem como resposta um sistema (b) reversível e (c) irreversível, com destaque para os parâmetros mais importantes, em VC. | 43 |
| Figura 11 - Formas de aplicação de potencial para a VC: a) potencial com varredura linear e b) potencial do tipo escada (staircase). | 44 |

| | |
|--|----|
| Figura 12 - Voltamograma cíclico, descrito por Nicholson, detalhando as correntes de pico em relação à corrente zero. | 45 |
| Figura 13 - (a) Perfil corrente-potencial esquemático para VPD e (b) representação esquemática da aplicação do potencial em função do tempo em VPD para instrumentos digitais, amostragem da corrente em S1 e S2, sendo registrada a diferença entre essas correntes. | 46 |
| Figura 14 - Sistema com os três eletrodos para análises eletroquímicas. | 51 |
| Figura 15 - Representação esquemática da interação de ácido ferrocenocarboxílico em eletrodo de ouro: (I) eletrodo limpo; (II) modificado com monocamada de MUA; (III) modificado com monocamada mista de MUA/ β -CDSH..... | 53 |
| Figura 16 - Relação da absorção eletrônica do BBT na ausência e presença de diferentes razões de β -CD de 1:1 até 1:10 (m/m), A)espectro de absorção após 48h de agitação, B) Absorção em $\lambda=279$ nm, após 24 e 48h de agitação. | 55 |
| Figura 17 - Gráfico da razão de TA na mistura TA:HP- β -CD (R) versus a variação de absorção das diferentes razões da mistura em relação a TA ausente de HP- β -CD multiplicado pela razão correspondente ($\Delta A.R$). | 56 |
| Figura 18 - Estabilidade da interação do ácido tânico em presença de HP- β -CD 1:2, por 24 horas. | 57 |
| Figura 19 - Espectro de absorção de TA na ausência e presença de HP- β -CD a diferentes concentrações (3, 5, 7, 12, 15 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato pH 7,4. Tempo de contato de 2 h. Inset: regressão linear obtida pela equação citada no comprimento de onda de 274 nm..... | 58 |
| Figura 20 - A) Espectro de emissão de TA 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($\lambda_{\text{ext}} = 260$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 350$) na ausência e presença de 0,2- 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ HP- β -CD, em tampão fosfato pH 7,4..... | 59 |
| Figura 21 - Voltamograma de TA em eletrodo de carbono vítreo A) por VC 1° e 5° ciclo, processo adsortivo, B) por VPD em ausência e presença de HP- β -CD variando de 1 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ | 60 |

| | |
|--|----|
| Figura 22 - O mecanismo do processo de oxidação ácido gálico. | 61 |
| Figura 23 - A) Voltamogramas em tampão fosfato pH 7,4 em crescentes concentrações de TA (0,1 a 1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em eletrodo modificado com β -CDSH+MUA; B) curva analítica de [TA] vs I_{pa} , para determinar LD e LQ; C) Regressão linear dos valores de [TA]/ I_{pa} vs [TA] para determinar K..... | 63 |
| Figura 24 - Espectro de ATR-FTIR do TA, HP- β CD e seus complexos de interação na estequiometria de 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 e 1:5. | 64 |
| Figura 25 - Espectro de RMN ^1H da hidroxipropil- β -ciclodextrina e os complexos com ácido tânico a diferentes razões molares. | 66 |
| Figura 26 - A) estrutura do TA, B) estrutura HP- β -CD, C) Espectro de RMN 2D ROESY, F1 é o espectro da HP- β -CD e em F2 o espectro do TA..... | 67 |
| Figura 27 - Microplaca de células em presença das amostras em três diferentes concentrações (50 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$), para incubação. Ao lado guia de identificação de cada poço..... | 68 |
| Figura 28 - A) Línquen de <i>Usea Barbata</i> e B) estrutura química do UA..... | 79 |
| Figura 29 - Estrutura da β -lapachona..... | 80 |
| Figura 30 - Estrutura da mangiferina..... | 81 |
| Figura 31 - A) Uma ilustração esquemática com os três componentes de uma molécula de dendrímero e estruturas químicas de B) dendrímeros de poli (amidoamina) (PAMAM), C) poli (propilenimina) (PPI) e D) poli (L-lisina) (PLL). | 84 |
| Figura 32 - Esquema de sistema de entrega baseado em dendrímero funcionalizado com agente terapêutico, unidade bioreconhecível, agente de imagem, ácido nucleico e grupo modificador de superfície. | 85 |
| Figura 33 - Intervalo de energia de banda proibida de alguns pontos quânticos (II-VI) que variam de cristais manométricos para uma massa, com a sua respectiva região | |

| | |
|--|-----|
| espectral. Abaixo: espectros que exibem algumas propriedades ópticas de pontos quânticos (a e b) banda proibida (E_g), dependência do tamanho da partícula e (c) a sua capacidade de multi-espectral de emissão..... | 86 |
| Figura 34 - Esquema representativo da variação da energia do éxciton em função do tamanho para nanocristais com propriedades de confinamento quântico e de bulk, e abaixo sobre o processo de absorção (AO) e emissão (PL). | 90 |
| Figura 35 - O Diagrama de Nyquist..... | 92 |
| Figura 36 - A) Reação eletroquímica interfacial, com componentes de difusão e dupla camada; B) Circuito elétrico representativo correspondente..... | 93 |
| Figura 37 - Esquema do processo usado para preparar SAM no ouro. Etapa I: modificação da superfície do ouro com tiol para formar Au / SAM; Etapa II: funcionalização da Superfícies de ouro tiolada para produzir Au / SAM / PG _n , n= 1, 2, 3. | 98 |
| Figura 38 - Esquema de reação cruzada usando EDC e NHS, hidrólise após EDC e ligação amida seguida de EDC. | 99 |
| Figura 39 - Esquema representando o eletrodo de ouro modificado com SAM de AET/MUA/PQ's/ β -CDSH. | 100 |
| Figura 40 - UA 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 10% etanol, PBS pH 7,4 A) Voltamograma cíclico, 110 | |
| Figura 41 - Mecanismo de oxidação do ácido úsnico..... | 111 |
| Figura 42 - A) Voltamograma de VC para o eletrodo de ouro com SAM de CDSH e UA em solução de 1,0 - 6,0 mmol L^{-1} . B) Gráfico da variação do potencial em função da concentração. C) Regressão linear da razão entre a concentração de UA e a I_{pa} em função da concentração de UA. Tampão fosfato 7,0, 5% etanol, $v=50 \text{ mV}$ | 111 |
| Figura 43 - Voltamograma cíclico do UA em solução de 1,0 - 6,0 mmol L^{-1} em eletrodo de ouro com SAM de CDSH. Tampão fosfato 7,0, 5% etanol, $v=5 \text{ mV}$ | 113 |

| | |
|--|-----|
| Figura 44 - Espectro no UV-vis da β -LP ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$) em ausência e presença de PAMAM-G2 ($10 - 50 \mu\text{mol L}^{-1}$). Inserção: regressão linear $1/\Delta A$ vs $1/[\text{PAMAM}]$, no λ de 258, 266, 290, 342 nm. | 114 |
| Figura 45 - Regressão linear $1/\Delta A$ vs $1/[\text{PAMAM}]$, nas temperaturas de 25, 31 e 37 °C. | 116 |
| Figura 46 - Espectro no UV-vis do UA ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$) em ausência e presença de PAMAM-G3 ($10 - 100 \mu\text{mol L}^{-1}$) no λ de 290 nm, a 25 °C. | 118 |
| Figura 47 - Regressão linear $1/\Delta A$ vs $1/[\text{PAMAM}]$, para as gerações 1 e 3 nas temperaturas de 25, 31 e 37 °C. | 119 |
| Figura 48 - Espectros no UV-vis do MGF ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) em ausência e presença de 0,1 – $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ PAMAMG2 A) G3 B) no λ de 382 nm, a 25 °C. Regressão linear de $1/\Delta A$ vs $1/[\text{PAMAM}]$ C) Para geração 2 e D) para geração 3..... | 121 |
| Figura 49 - Modelo químico para as atribuições dos quatro pKa da MGF. | 122 |
| Figura 50 - Espectro de emissão de MGF, na ausência e presença de 0,1 a $1,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ de PAMAM. (A) G1, (B)G2, (C)G3. | 124 |
| Figura 51 - Regressão linear de F_0/F vs $[\text{PAMAM}]$ e regressão linear de $\text{Log}[(F_0-F)/F]$ vs $\text{Log}[\text{PAMAM}]$ ($\lambda_{em.} = 530 \text{ nm}$) para a geração 1 (A) e (B); geração 2 (C) e (D); geração 3 (E) e (F). | 125 |
| Figura 52 - Voltamograma de pulso diferencial do AU $0,1 \text{ mg/mL}$ em ausência e presença de PAMAM-G3 5 a $30 \mu\text{mol L}^{-1}$, PBS pH 7,4, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$ | 127 |
| Figura 53 - A) Voltamograma cíclico da MGF $0,1 \text{ mg/mL}$ em ausência e presença de PAMAM-G3 5 e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, PBS pH 7,4, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. B) Foto da solução de MGF na cela eletroquímica antes e após a adição de PAMAM-G3 a solução. | 128 |
| Figura 54 - A) Voltamogramas cíclicos do UA de $0,5$ a $6,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ com eletrodo de ouro modificado com MUA. B) curva da I_{pa} vs $[\text{UA}]$. Tampão fosfato 10 mmol L^{-1} , 5% de etanol, $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$ | 129 |

| | |
|---|-----|
| Figura 55 - Voltamogramas cíclicos da MGF de 0,5 a 6,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com eletrodo de ouro modificado com MUA. Tampão fosfato pH 7,0, 5% de etanol, $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$.. | 130 |
| Figura 56 - Voltamogramas cíclicos A) de eletrodo de ouro com SAM de MUA/PAMAG3 em tampão pH 7,0, 5% etanol; B) de SAM de MUA/PAMAG3 na ausência e presença de UA a 3 mmol L^{-1} | 131 |
| Figura 57 - Massograma da interação de SAM MUA/PAMAMG3 com UA. Cristal de quartzo com cobertura de ouro modificado com SAM MUA/PAMAMG3, em amarelo; UA em preto e ampliado em vermelho. | 133 |
| Figura 58 - Espectro de absorção de CdSe/CdS de 15 - 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato 7,4..... | 134 |
| Figura 59 - À esquerda, espectros de emissão do sistema PQs-CDHS em tampão fosfato p H7,0 com 5% etanol, na ausência e presença de mangiferina nas concentrações de 1 – 3 $\mu\text{mol L}^{-1}$. À direita, representação esquemática do PQ conjugado em solução. | 135 |
| Figura 60 - Espectros de emissão do sistema PQs-CDHS em tampão fosfato p H7,0 com 5% de etanol, na ausência e presença de UA nas concentrações de 1 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ | 135 |
| Figura 61 - Espectro de absorção no UV-vis doPQ com PAMAM-G3 em solução.. | 136 |
| Figura 62 - Espectro de emissão de CdSe/CdS ($\lambda_{\text{ex.}} = 355 \text{ nm}$) na ausência e presença de 5 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PAMAM-G3, água destilada. | 137 |
| Figura 63 - Diagrama de Nyquist obtido para as diferentes modificações no eletrodo de ouro. Inset: circuito equivalente..... | 139 |
| Figura 64 - A) Diagrama de Nyquist (Zim vs. Zre) de EIS e B) voltamogramas de VC, para eletrodo de ouro modificado com MUA, e PAMAM-G2, no potencial de +0,22 V vs. Ag AgCl Cl ⁻ e amplitude de 5 mV em 10 mmol L^{-1} PBS pH 7,4 contendo 2,5 mmol L^{-1} [Fe (CN) 6] ^{3/4-} | 141 |

| | |
|--|-----|
| Figura 65 - Perfil voltamétrico da permeoseletividade e dependência do pH das sondas eletroquímicas catiônica e aniônica, para o compósito PAMAM aminado. | 142 |
| Figura 66 - Cronoamperograma da eletrodeposição de nanocristais de ouro no ITO no potencial de redução de -0,3 V e foto do ITO sem e com a deposição dos nanocristais. | 144 |
| Figura 67 - Espectro no UV-vis do ITO limpo, após deposição de nano Au e as imobilizações consecutivas com AET/MUA/CdSe-CdS/MUA/PAMAMG3/UA. À direita, um esquema da heteroestrutura montada no ITO..... | 145 |
| Figura 68 - Voltamograma cíclico do ITO em sistema $[Fe(III)(CN)_6^{3-}/Fe(II)(CN)_6^{4-}]$ sem e com as imobilizações nanoAu-AET-MUA-CdSe/CdS-MUA-PAMAMG3-UA. | 146 |
| Figura 69 - Espectro de ATR-FTIR do AU e seus complexos com PAMAM-G2 e G3 na estequiometria de 1:16, 1:32. A) faixa de 4000 a 400 cm^{-1} e B) faixa de 1800 a 400 cm^{-1} | 148 |
| Figura 70 - Espectro de ATR-FTIR da MGF e seu complexo com PAMAM-G3 na razão 1:32. A) faixa de 4000 a 400 cm^{-1} e B) faixa de 1800 a 400 cm^{-1} | 150 |
| Figura 71 - Espectros no UV-vis dos complexos AU-PAMAMG3 e MGF-PAMAMG3 em metanol na razão 1:20 e 1:40..... | 152 |
| Figura 72 - Espectro no UV-vis de MGF em metanol de 15 a 50 $\mu mol L^{-1}$. Inset: curva analítica da concentração de MGF vs absorvência para a banda em 365 nm. | 152 |
| Figura 73 - Espectro no UV-vis de UA em metanol de 10 a 80 $\mu mol L^{-1}$. Inset: curva analítica da concentração de UA vs absorvência para a banda em 287 nm..... | 153 |
| Figura 74 - Esquema das etapas do biossensor eletroquímico de dsDNA. | 155 |
| Figura 75 - Voltamogramas na VPD para biofilme de dsDNA em eletrodo de CV em ausência e presença A) de 1, 10 e 15 $\mu mol L^{-1}$ de UA e 15 $\mu mol L^{-1}$ de UA em eletrodo limpo. B) de 1, 10 e 15 $\mu mol L^{-1}$ de MGF e 15 $\mu mol L^{-1}$ de MGF em tampão acetato pH 4,5, 20% etanol, $v=10mV s^{-1}$ | 156 |

| | |
|---|-----|
| Figura 76 - Voltamogramas na VPD do ssDNA em solução na ausência e presença A) de 1, 5, 10 e 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de UA e 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de UA em tampão sem ssDNA, B) de 1, 5, 10 e 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MGF e 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MGF em tampão sem ssDNA. Tampão acetato pH 4,5, 20% etanol, $v=10\text{mV s}^{-1}$ | 157 |
| Figura 77 - A) Voltamograma de pulso diferencial da MGF a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na ausência e presença de dsDNA de 3 - 12 $\mu\text{mol L}^{-1}$. B) Curva analítica para determinar a K entre MGF e DNA. Tampão 4,5, 10% etanol..... | 158 |
| Figura 78 - Espectro de RMN- ^1H da HP- β -CD. | 175 |
| Figura 79 - Espectro de RMN ^1H do ácido tânico..... | 175 |
| Figura 80 - Espectros de PAMAM G1 | 176 |
| Figura 81 - Espectros de PAMAM G2 | 176 |
| Figura 82 - Voltamogramas de UA em eletrodos modificados com NTCs. A) NTC com grupocarboxila; B) sem tratamento ácido e C) após tratamento com ácido nítrico; D); E) e F) as respectivas curvas..... | 177 |
| Figura 83 - Espectros de RMN ^1H para PAMAMG2 e MGF. | 178 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1 - Propriedades das ciclodextrinas..... | 35 |
| Tabela 2 - Lista de reagentes utilizados..... | 49 |
| Tabela 3 - Protocolo do método Job's Plot de variação contínua para determinar a estequiometria do complexo TA:HP-β-CD..... | 50 |
| Tabela 4 - Variation of chemical shift of HP-β-CD in different molar ratios with tannic acid..... | 66 |
| Tabela 5 - Resultados do ensaio quantitativo para a identificação da viabilidade em linfócitos do sangue periférico tratados com TA, HP-β-CD sozinhos e HP-β-CD:TA in vitro por 24 horas. | 68 |
| Tabela 6 - Lista de reagentes com o laboratório de aquisição. | 97 |
| Tabela 7 - Dados metodológicos para obtenção do complexo entre o composto e nanocarreador..... | 106 |
| Fonte: Autora, 2018. Tabela 8 - Dados de constante de ligação, coeficiente de correlação e parâmetros termodinâmicos da relação entre PAMAM (10 a 100 μmol L ⁻¹) de várias gerações e β-LP (25 μmol L ⁻¹) por estudo no UV-vis..... | 116 |
| Tabela 9 - Dados de constante de ligação, coeficiente de correlação e parâmetros termodinâmicos da relação entre PAMAMG1 e G3 (10 a 100 μmol L ⁻¹) e ácido úsnico (25 μmol L ⁻¹) (λ = 290 nm) por estudo no UV-vis. | 119 |
| Tabela 10 - Valores de pKa da Mangiferina e formas de equilíbrio correspondente. | 123 |
| Tabela 11 - As constantes de extinção de Stern Volmer (K _{sv}), constante de ligação (K _a), estequiometria de ligação (n) e o coeficiente de correlação envolvido, para a ligação entre MGF e PAMAMs..... | 126 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 12 - Valores de ΔE_p e área dos voltamogramas correspondentes em cada etapas de modificação do ITO em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ | 147 |
| Tabela 13 - Número de moléculas incorporadas pelo PAMAMG3. | 154 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------|---|
| ν | Velocidade de varredura de potencial |
| δ | deslocamento químico |
| ΔI | Diferença entre a corrente da linha base e da de pico no voltamograma |
| β -CD | β -ciclodextrina |
| β -LP | β -lapachona |
| μ A | Microampère |
| a | Valor da amplitude do pulso |
| A | Ampère |
| AA | Ácido aracdônico |
| ADP | Adenosina difosfato |
| ADR | Adrenalina |
| AET | Aminoetanotiol |
| ATR | Reflectância total atenuada |
| CD | ciclodextrina |
| CDSH | Ciclodextrina tiolada |
| COL | Colágeno |
| CT-DNA | Ácido desoxirribonucleico de timo de bezerro, do inglês Calf Thymus-DNA |
| CV | Carbono vítreo |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido Desoxirribonucléico |
| dsDNA | Ácido Desoxirribonucléico em fita dupla (ou dupla hélice) |
| E | Potencial |

| | |
|-----------------|---|
| EDC | Hidrocloreto de <i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N</i> -etil-carbodiimida |
| E_p | Potencial de pico |
| EQM | Eletrodo quimicamente modificado |
| FT-IR | Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared spectroscopy) |
| HP- β -CD | (2-Hydroxipropil)- β -ciclodextrina |
| Hz | Hertz |
| i_{pa} | Corrente de pico anódica |
| i_{pc} | Corrente de pico catódico |
| ITO | Óxido de Índio dopado com Estanho |
| K_D | Constante de dissociação |
| K_F | Constante de formação |
| MGF | Mangiferina |
| MUA | Ácido 11-mercaptoundecanóico |
| $mV s^{-1}$ | Milivolt por segundo |
| NHS | N-hidroxisuccinamida |
| PAMAM | Poliamidoamina |
| PQ's | Pontos quânticos |
| MSPQs-CS | Pontos Quânticos de Tamanhos Mágicos de Estrutura tipo Núcleo e Casca |
| RMN 1H | ressonância magnética nuclear de hidrogênio |
| SAM | "Self Assembled Monolayers" (Monocamadas auto-organizadas) |
| ssDNA DNA | Ácido Desoxirribonucléico em fita simples, do inglês single strand of DNA |
| TA | Ácido tânico |
| UA | Ácido úsnico |

| | |
|--------|----------------------------------|
| USPQs | Pontos Quânticos Ultrapequenos |
| UV-vis | Ultravioleta-visível |
| VC | Voltametria Cíclica |
| VPD | Voltametria de Pulso Diferencial |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| INTRODUÇÃO GERAL | 28 |
| Estudo da interação do Ácido Tânico com hidroxipropil- β -ciclodextrina..... | 29 |
| 1 INTRODUÇÃO | 30 |
| 1.1 Revisão bibliográfica..... | 31 |
| 1.1.1 Barbatimão | 31 |
| 1.1.2 Ácido tânico | 33 |
| 1.1.3 Ciclodextrinas | 35 |
| 1.2 Espectroscopia no UV-vis..... | 38 |
| 1.3 Espectroscopia de Fluorescência..... | 40 |
| 1.4 Eletroquímica..... | 42 |
| 1.4.1 Voltametria cíclica..... | 42 |
| 1.4.2 Voltametria de pulso diferencial..... | 46 |
| 2 OBJETIVO | 48 |
| 2.1 Objetivo geral | 48 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 48 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 49 |
| 3.1 Produtos químicos e solventes..... | 49 |
| 3.2 Estudos de espectrofotometria no UV-vis..... | 49 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.2.1 | Estequiometria de interação entre TA:HP- β -CD por espectrofotometria no UV-vis | 50 |
| 3.3 | Estudos eletroquímicos | 50 |
| 3.3.1 | Condições das medidas eletroquímicas | 50 |
| 3.3.2 | Avaliação da interação entre TA e HP- β -CD em solução | 52 |
| 3.3.3 | Eletrodo de Ouro Modificado com SAM de β -CDSH + MUA | 52 |
| 3.4 | Extrato de barbatimão | 53 |
| 3.5 | Preparo dos complexos de TA | 53 |
| 3.6 | Condições para estudo em células de linfócitos humanos | 54 |
| 4 | Resultados e discussão | 55 |
| 4.1 | Estudos de espectroscopia no UV-vis | 55 |
| 4.1.1 | Determinação da estequiometria do complexo de interação TA: HP- β -CD | 56 |
| 4.1.2 | Estudo da constante de formação aparente do complexo de interação TA:HP- β -CD | 57 |
| 4.2 | Medidas de Fluorescência..... | 58 |
| 4.3 | Estudos eletroquímicos | 59 |
| 4.3.1 | Interação do TA com HP- β -CD em solução..... | 59 |
| 4.3.2 | Estudo da interação entre TA e SAM- β -CDSH por VC | 61 |
| 4.4 | Caracterização da interação entre HP- β -CD e TA | 63 |
| 4.4.1 | Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier obtidos por ATR | 64 |

| | | | |
|--|---|----|----|
| 4.5 | Resultados de RMN H ¹ | 65 | |
| 4.6 | Avaliação da viabilidade e citotoxicidade..... | 67 | |
| 5 | CONCLUSÃO..... | 69 | |
| 6 | REFERÊNCIAS..... | 70 | |
| Sistemas carreadores nanohíbridos de PAMAMs, Ciclodextrinas e Pontos quânticos de CdSe/CdS, encapsulamento e associação, uma alternativa para compostos de baixa solubilidade..... | | | 77 |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 78 | |
| 1.1 | Revisão bibliográfica..... | 79 | |
| 1.1.1 | Ácido úsnico..... | 79 | |
| 1.1.2 | β-Lapachona..... | 80 | |
| 1.1.3 | Mangiferina..... | 81 | |
| 1.1.4 | Carreadores..... | 82 | |
| 1.1.4.1 | Dendrímeros..... | 83 | |
| 1.1.5 | Pontos quânticos..... | 85 | |
| 1.1.5.1 | Teoria envolvida..... | 87 | |
| 1.1.6 | Espectroscopia de Impedância Eletroquímica..... | 91 | |
| 1.1.7 | Interação com DNA..... | 93 | |
| 1.1.7.1 | Técnicas de investigação..... | 95 | |
| 2 | OBJETIVO..... | 96 | |
| 2.1 | Objetivo geral..... | 96 | |

| | | |
|---------|---|-----|
| 2.2 | Objetivos específicos..... | 96 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 97 |
| 3.1 | Produtos químicos e solventes..... | 97 |
| 3.2 | Estudos eletroquímicos | 98 |
| 3.2.1 | Eletrodo de Ouro Modificado com SAM de MUA + PAMAM | 98 |
| 3.2.2 | Eletrodo de Ouro Modificado com PQ's CdSe/CdS e β -CDSH | 99 |
| 3.2.3 | Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo (MECQ)..... | 100 |
| 3.2.4 | Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) | 101 |
| 3.2.5 | Dessorção redutiva de tóis | 101 |
| 3.3 | Estudos de espectrofotometria no UV-vis..... | 102 |
| 3.3.1 | Medidas da constante de interação com PAMAM | 102 |
| 3.3.2 | Determinação da concentração de pontos quânticos CdSe/CdS | 103 |
| 3.3.3 | Caracterização dos eletrodos de ITO modificados com PQ's e PAMAM..... | 105 |
| 3.3.3.1 | Eletrodeposição de nanocristais de Au..... | 105 |
| 3.4 | Medidas de fluorescência | 105 |
| 3.5 | Preparo dos complexos | 106 |
| 3.6 | Estudos com CT-DNA | 107 |
| 3.6.1 | Preparo e aplicação do biossensor de dsDNA | 107 |
| 3.6.2 | Emprego de dsDNA em solução | 108 |
| 3.6.3 | Preparo e aplicação do ssDNA..... | 109 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 110 |
| 4.1 | Estudo da interação de compostos bioativos com plataformas contendo ciclodextrinas..... | 110 |
| 4.1.1 | EQM de ouro com MUA/CDSH | 110 |
| 4.1.2 | EQM de ouro com AET/MUA/PQ/CDSH | 112 |
| 4.2 | Estudo da interação de compostos naturais com PAMAMs no UV-vis..... | 113 |
| 4.3 | Estudo da interação de MGF com PAMAMs na fluorescência | 123 |
| 4.4 | Interação do PAMAM-G3 via eletroquímica..... | 127 |
| 4.4.1 | Estudo em solução | 127 |
| 4.4.2 | EQM de ouro com MUA..... | 129 |
| 4.4.3 | Microbalança Eletroquímica de cristal modificado com MUA/PAMAM | 131 |
| 4.5 | Avaliação espectroscópica da interação com Pontos Quânticos..... | 133 |
| 4.5.1 | PQs associados à β -CDSH em solução | 134 |
| 4.5.2 | PQs associados à PAMAMG3 em solução..... | 136 |
| 4.6 | Caracterização dos eletrodos quimicamente modificados..... | 137 |
| 4.6.1 | Espectrometria de Impedância Eletroquímica (EIE) | 137 |
| 4.6.2 | Análise espectroscópica por ITO | 143 |
| 4.7 | Caracterização dos complexos com PAMAM..... | 147 |
| 4.7.1 | Análise dos espectros obtidos por ATR-FTIR..... | 147 |
| 4.7.2 | Estimativa da estequiometria de conjugação dos complexos com PAMAM no UV-vis | 151 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.8 | Interação com DNA eletroquímico em eletrodo de carbono vítreo | 154 |
| 4.8.1 | Biossensor eletroquímico de dsDNA | 155 |
| 4.8.2 | Estudo do ssDNA em solução | 156 |
| 4.8.3 | Constante de interação com dsDNA em solução | 157 |
| 5 | CONCLUSÃO | 159 |
| 6 | REFERÊNCIAS | 161 |
| 7 | PERSPECTIVAS | 168 |
| 8 | ANEXO I | 169 |
| 8.1 | Artigos publicados: | 169 |
| 8.2 | Capítulo de Livro: | 169 |
| 9 | ANEXO II | 175 |
| 9.1 | Espectros e voltamogramas complementares | 175 |

INTRODUÇÃO GERAL

O presente trabalho avalia a interação de compostos de origem natural com carreadores como ciclodextrinas e dendrímeros. Entretanto, os estudos com o tanino ácido tânico e ciclodextrina estão na primeira seção, sendo separados dos demais, por se tratar de um estudo de interação com a mesma, e mudanças observadas no ácido tânico em presença de ciclodextrina, porém sem formação de complexo de inclusão, pois se trata de um composto hidrossolúvel. Já os compostos: ácido úsnico, mangiferina e β -lapachona que apresentam baixa solubilidade, formam complexo com os carreadores, e estão descritos na segunda seção deste trabalho, bem como os estudos com pontos quânticos e plataformas heteroestruturadas.

**Estudo da interação do Ácido Tânico com hidroxipropil- β -
ciclodextrina**

1 INTRODUÇÃO

A busca por compostos naturais de interesse farmacológico que atendam aos requisitos farmacotécnicos para uma boa formulação terapêutica é crescente. No entanto, parte desses compostos obtidos de extratos apresenta sensibilidade à luz, ao calor, problemas de solubilidade e estabilidade. O uso de ciclodextrina apresenta-se como uma opção interessante na tentativa de solucionar ou minimizar estes problemas, por meio da formação de complexo de inclusão e/ou entre interações externas com este carreador.

O presente capítulo parte de estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa LEMAN que apontam o extrato etanólico de *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & Grimes, popularmente conhecido como barbatimão, como um potencial agente antitrombótico, quando em presença de β -ciclodextrina. Tendo em vista a baixa solubilidade do extrato de Barbatimão (BBT) em água o presente capítulo traz estudos em solução via UV-vis com diferentes concentrações de β -ciclodextrina (β -CD).

Dado o alto teor de taninos no extrato de BBT e estes se apresentarem como polímeros condensados, não sendo possível determinar o número de unidades de proantocianidinas e qual destas isoladamente apresenta-se como ativo as inúmeras funções clínicas deste extrato, este capítulo elege como molécula modelo o ácido tânico, diante da vasta variedade de taninos presentes no extrato de BBT. Assim, sua interação com hidroxipropil- β -ciclodextrina foi estudada, não como agente encapsulante, mas como coadjuvante, bem como as vantagens promovidas pelas interações supramoleculares envolvidas no processo. Para tanto diversas técnicas foram empregadas desde espectroscópicas como UV-vis e fluorescência, FTIR-ATR, RMN H^1 e eletroquímica em solução e com plataforma de β CDSH.

1.1 Revisão bibliográfica

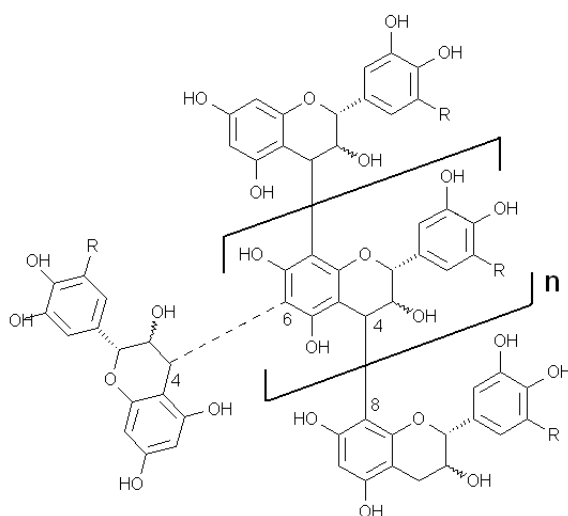
1.1.1 Barbatimão

O barbatimão é o nome popular para *Abarema cochliacarpus* (B. A. Gomes) Barneby & J. W. Grimes (Mimosaceae) e/ou *Stryphnodendron barbatiman*, *S. coriaceum* Benth., *S. diacolor* Benth., *S. pulcherrimum* (Willd) Hoch., *S. adstringens* (Mart.) Coville, *S. obovatum* Benth, *S. polyphyllum* M. e *Pithecellobium avaremotemo* Mart. (CAETANO et al., 2012), algumas delas existentes na mata Atlântica de Alagoas e do Nordeste do Brasil (GOULART, 2010). Apesar de serem pertencentes a espécies de diferentes gêneros apresentam propriedades medicinais semelhantes.

A avaliação fitoquímica do extrato da casca do caule de *Abarema cochliacarpus* demonstrou a presença de saponinas, catequinas, taninos, fenóis e antraquinonas (SILVA et al., 2009). A casca do caule do barbatimão é usada na medicina popular como analgésico, antibacteriano, anti-inflamatório, antisséptico, adstringente e cicatrizante. E essa gama de atividades farmacológicas está diretamente relacionada à quantidade de taninos na casca do caule, que agem por diferentes mecanismos celulares. Algumas espécies como *S. adstringens* (Mart.) Coville, apresentam cerca de 20 % de taninos em sua casca (COSTA et al., 2010; MEIRA, 2012; LOPES et al., 2005).

Os taninos são divididos de acordo com a estrutura química em dois grandes grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. O barbatimão é rico em taninos condensados (Figura 1), são polímeros de flavan-3-ol (lineares) e/ou flavan-3,4-diol (ramificados) produtos do metabolismo do fenilpropanol (MONTEIRO et al., 2005). As moléculas têm grande variação estrutural, resultante de padrões de substituições entre unidades flavônicas, diversidade de posições das ligações e a estereoquímica (MELLO & SANTOS, 2001). A análise de taninos nos extratos torna-se difícil pela, já mencionada, variedade de estruturas existentes e a necessidade de técnicas analíticas sofisticadas que permitam a sua separação, identificação e quantificação. Apesar de os polímeros constituírem a maioria dos polifenóis das plantas, a análise química se limita, normalmente, a monômeros, dímeros e alguns trímeros (CHEYNIER, 2005).

Figura 1 - Estrutura química de taninos condensados, lineares (com 4→8 ligações) ou ramificados (com 4→6 ligações).



Fonte: Autora, 2018.

Recentemente, pesquisadores da Universidade Federal de Alagoas, patentearam uma pomada a base de barbatimão, capaz de causar a regressão de verrugas genitais causadas pelo vírus do papiloma humano (HPV) e ainda diminui a quantidade do vírus no organismo sem causar efeitos colaterais significativos (CAETANO et al., 2012).

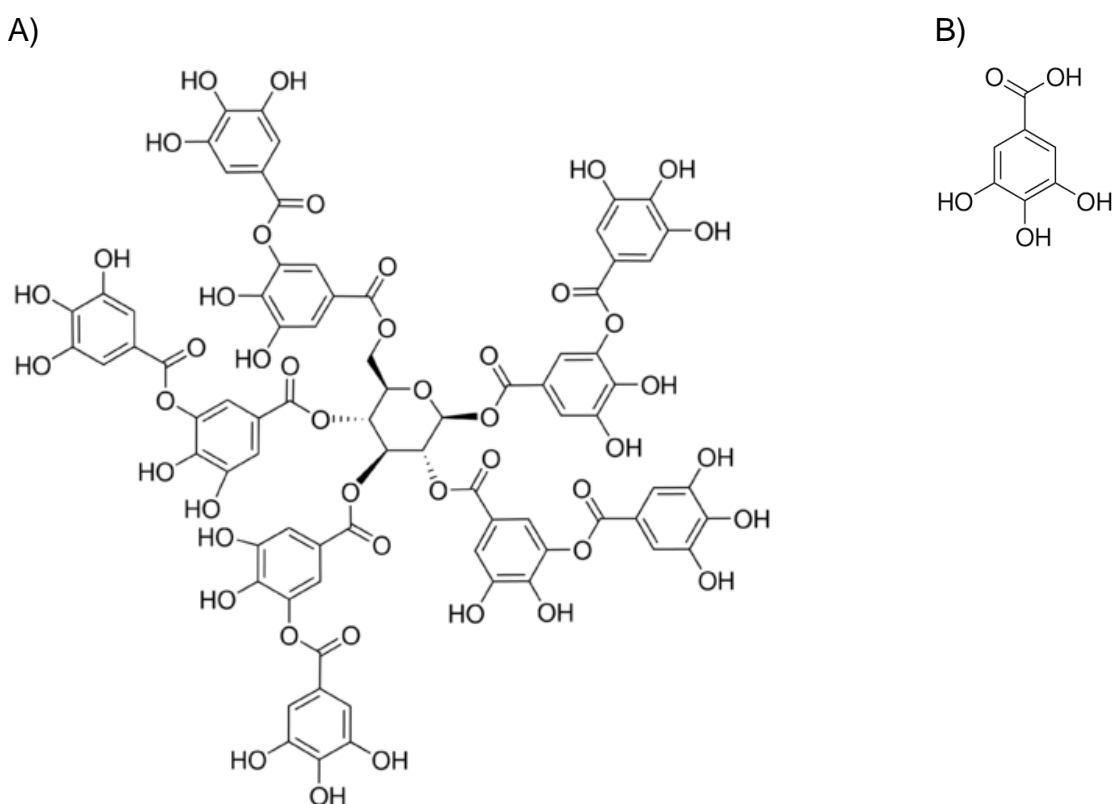
Estudos anteriores do grupo demonstraram que em testes de agregação plaquetária o extrato da casca do BBT e BBT encapsulado não atuam na primeira fase da formação do trombo, assim, não interferindo nos processos de adesão e agregação plaquetária através das principais vias dos agonistas Adenosina difosfato, Adrenalina e Ácido araquidônico. Já os testes coagulométricos da segunda fase da formação do trombo, tempo de protrombina, se mostraram relevantes, onde o extrato da casca do barbatimão encapsulado com CD potencializou os efeitos de inibição da coagulação, aumentando o tempo de formação do coágulo de fibrina, diferente dos resultados para o mesmo extrato não encapsulado (NASCIMENTO et al., 2015).

Mediante os resultados obtidos o extrato de barbatimão com β -CD se mostra um promissor agente anticoagulante e potencial antitrombótico, por promover aumento no tempo de formação do coágulo quando comparado com o controle normal, não apresentando caráter antiplaquetário em testes com agonistas clássico.

1.1.2 Ácido tânico

O ácido tânico (TA), mostrado na Figura 2A, é um polifenol, composto por uma molécula de glicose central, ligada a cinco cadeias compostas por duas moléculas de ácido gálico (ácido 3,4,5-triidroxibenzóico), Figura 2B unidas por esterificação, sendo um tanino hidrolisável. Também conhecido como glicosídeo pentadigaloil, possui fórmula empírica como $C_{76}H_{52}O_{56}$ e peso molecular de $1701,2 \text{ g mol}^{-1}$, é solúvel em água e escurece gradualmente quando exposto ao ar e à luz.

Figura 2 - Estrutura molecular do A) ácido tânico e B) ácido gálico.



Fonte: Autora, 2018.

O TA é produzido pelo metabolismo secundário das plantas e pertence à grande categoria dos ácidos fenólicos. É um tanino hidrolisável encontrado em diversos alimentos tais como, uvas, lentilhas, chocolate, vinho tinto, cerveja, café, chá preto e chá verde (SIMÕES et al., 2004). Dentre os efeitos descritos na literatura estão as atividades antioxidantes *in vivo* e *in vitro*, anticarcinogênicas, antimicrobianas e antimutagênicas do TA em ratos. (ANDRADE et al, 2005).

Ele apresenta hepatotoxicidade experimentalmente conhecida, cujos efeitos crônicos podem conduzir a cirrose e carcinoma em ratos, principalmente quando administrado parenteralmente. Apesar do mecanismo de injúria não estar elucidado, há evidências de que o TA interfere seletivamente com a transcrição a nível do eixo DNA-RNA o que justifica categorizar como uma hepatotoxicidade indireta. A toxicidade em humanos foi relatada por severa necrose hepática após tratamento para queimaduras, o que levou a seu desuso. Porém, não há evidências de hepatotoxicidade pela ingestão de vinhos ou chás que são ricos em TA (ZIMMERMAN, 1999). Segundo a agência Internacional para pesquisas no câncer (IARC) o ácido tânico está classificado no grupo 3, como agente não carcinogênico a humanos.

Dentre os aspectos versáteis do TA natural, é utilizado na construção de biossensores na redução verde de Pt^{4+} e óxido de grafeno (AKKAYA; Ç AKIROĞ LU; OZACAR, 2018). Além, deste se complexar com íons ferroso formando TA_2Fe e $TAFe^+$, complexos com ferro férrico consistem em grandes moléculas altamente coloridas que se comportam como coloides (HEM, 1962); e com cobre formando complexos lábeis e solúveis de grande importância ecotoxicológica (KRAAL et al., 2006).

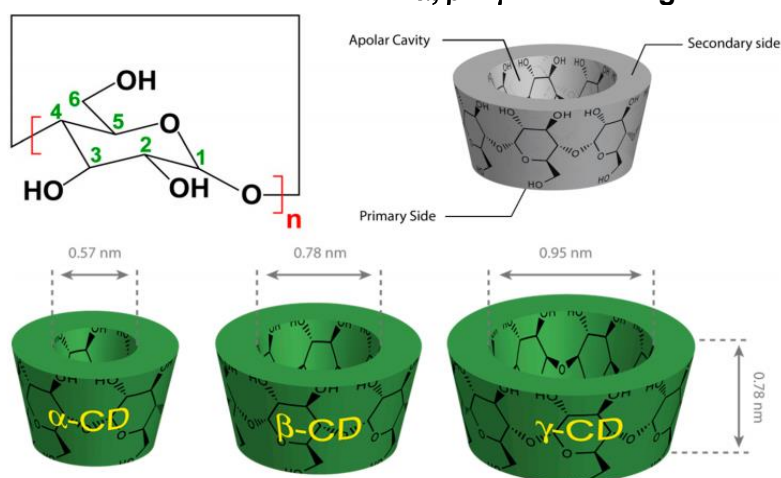
O ácido tânico é utilizado também para uso tópico devido as suas propriedades adstringente e antimicrobiana, sendo inserido em formulações magistrais indicadas para infecções causadas por herpes labial ou formulações para uso ginecológico. Entretanto, as formulações possuem como coadjuvante o alúmen de potássio, substância incompatível com os taninos, pois ocorre precipitação (FABRÍCIO et al., 2008).

De posse do exposto o presente estudo procura investigar a interação do ácido tânico com hidroxipropil- β -ciclodextrina, como agente coadjuvante, através de análises eletroquímicas, espectroscópicas no UV-vis e fluorescência, e estudos de RMN H^1 . Para tanto, faz-se necessário para o entendimento do trabalho, uma breve introdução sobre ciclodextrinas.

1.1.3 Ciclodextrinas

As Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos de origem natural, cuja principal característica é a habilidade de hospedar em sua cavidade diferentes tipos de moléculas hidrofóbicas, conferindo a estas, um aumento na solubilidade em água. ciclodextrinas ainda promovem aumento na estabilidade e biodisponibilidade de compostos biologicamente ativos (CEBORSKA et al., 2016).

Figura 3 - Esquema de estrutura funcional da α , β e γ -CD e sua geometria dimensional.



Autor: (CRINI, 2014).

É constituída de unidades de glicose (α -D-glucopiranoose) unidas por ligação α -1,4 (Figura 3). As mais importantes CDs que apresentam ocorrência natural são as α -, β - e γ -CDs. A Tabela 1 apresenta as principais características físico-químicas das CDs.

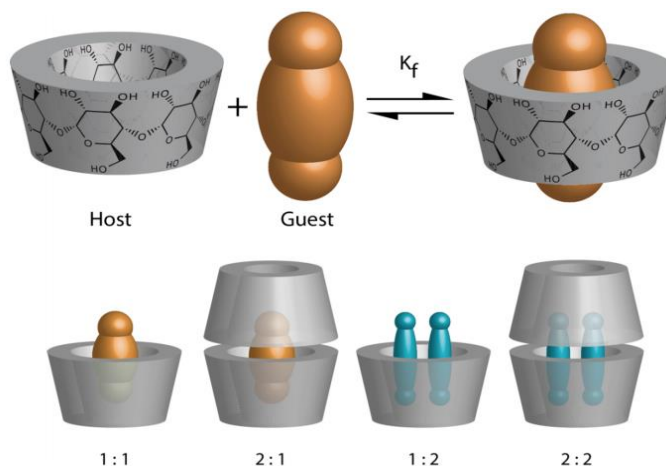
Tabela 1 - Propriedades das ciclodextrinas.

| Propriedades | α -Ciclodextrina | β -Ciclodextrina | γ -Ciclodextrina |
|-------------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| Unidades de glucopiranoose | 6 | 7 | 8 |
| Massa molar g/mol | 972 | 1135 | 1297 |
| Solubilidade em água 25°C (%) | 14,5 | 1,85 | 23,2 |
| Diâmetro exterior (Å) | 14,6 | 15,4 | 17,5 |
| Diâmetro da cavidade (Å) | 4,7 – 5,3 | 6,0 – 6,5 | 7,5 – 8,3 |
| Volume da cavidade (Å) | 174 | 262 | 427 |

Fonte: (SZEJTLI, 1998).

Além da complexação de um único composto, extratos brutos de plantas que contém múltiplos componentes também estão sendo complexados com ciclodextrinas (HSUA et al., 2013; BUDRYN et al., 2014). A Figura 4, mostra as razões de formação de complexo com CDs, as possibilidades de interação hóspede-hospedeiro.

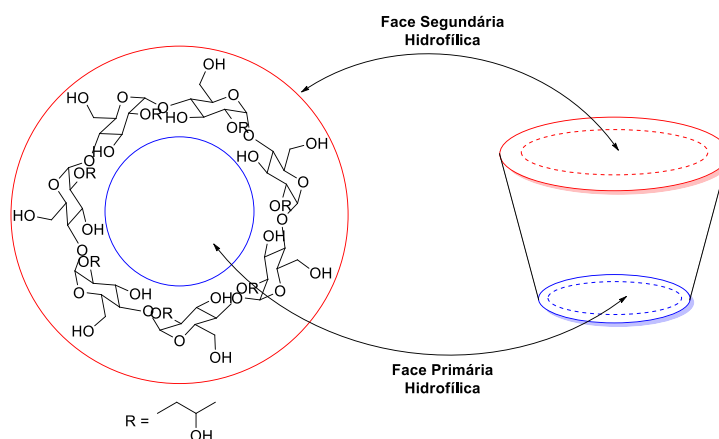
Figura 4 - Ilustração esquemática da ciclodextrina livre (hospede) e substrato (hospedeiro) para formar o complexo substrato-CD.



Autor: (CRINI, 2014).

Neste capítulo será avaliado o emprego da β -CD, mas no capítulo seguinte os estudos foram realizados com a 2-Hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) (Figura 5), uma ciclodextrina modificada com grupamento hidroxipropil, por apresentar propriedades menos tóxicas e maior solubilidade que a β -ciclodextrina (GRILLO et al., 2008).

Figura 5 - Esquema representativo da estrutura da HP- β -CD.

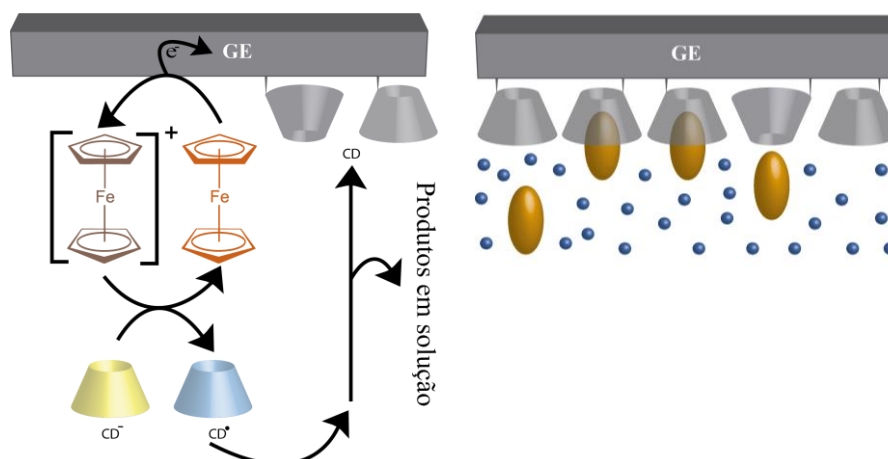


Fonte: Adaptado de (DEVI; MANDAL, 2013).

Sensores eletroquímicos modificados baseados em ciclodextrina são empregados para determinar uma variedade de analitos de interesse químico e bioquímico, dentre eles estão os flavonóides (catequina e rutina) (EL-HADY, 2007; HE et al., 2006), neurotransmissores (norepinefrina e dopamina) (SHANG et al., 2009; WANG et al., 2004), explosivos (2,4-DNT, TNT) (JU et al., 2007), drogas (cinchonina e nitrendipina) (YÁÑEZ, 2006; YANG et al., 2005), nucleobases (adenina, guanina e timina) (UMASANKAR; THIAGARAJAN; CHEN, 2007) e aminoácidos (tirosina, L-histidina) (STEFAN-VAN STADEN; NEJEM; VAN STADEN, 2013).

Quanto à sua utilização como sensores temos: (i) a base de monocamadas auto-montadas (SAMs) de ciclodextrinas tanto em ouro maciço como em nanopartículas de ouro são preparadas principalmente, pelo processo de funcionalização envolvendo grupos tiolados que ligam-se à superfície; (ii) preparados por imobilização eletrostática de ciclodextrinas em monocamadas automontadas; (iii) imobilização covalente em eletrodo de carbono, com alta estabilidade da camada anexada (Figura 6); (iv) eletrodos modificados com nanotubos de carbono-ciclodextrina; (v) eletrodos de pasta de carbono à base de ciclodextrina e (vi) ciclodextrina incorporado em eletrodos modificados com filmes poliméricos. O capítulo 2, deste trabalho apresenta uma variedade de plataformas modificadas tanto com CD como outro carreador, as quais forneceram informações valiosas quanto aos mecanismos de interação (encapsulação) envolvidos entre o composto bioativo e seu carreado (HERNÁNDEZ-MUÑOZ; FRONTANA; GONZÁLEZ, 2014).

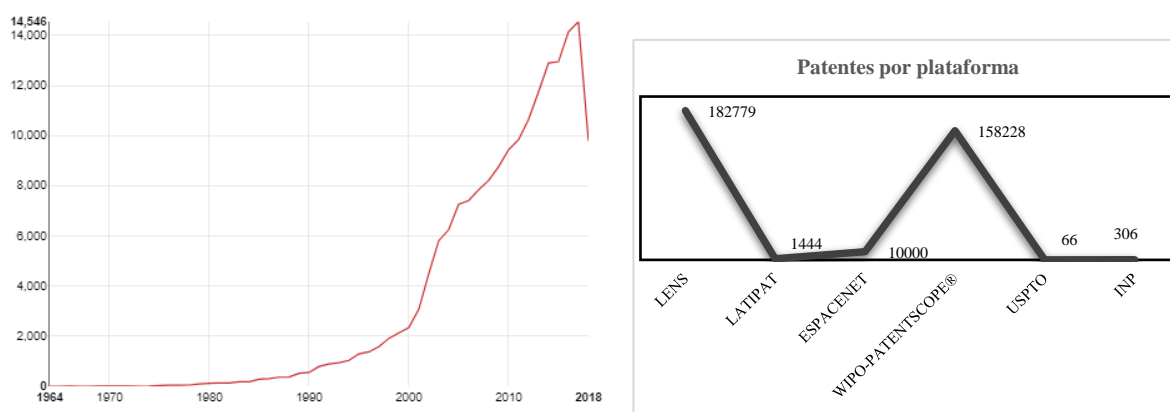
Figura 6 - Oxidação de monoânions de β -CD mediada por ferrocenio e modificação covalente da superfície de carbono, à esquerda. Ilustração do eletrodo modificado, à direita.



Fonte: Adaptado de (HERNÁNDEZ-MUÑOZ; FRONTANA; GONZÁLEZ, 2014).

Diante das diversas vantagens no emprego de ciclodextrinas para o desenvolvimento de novas tecnologias farmacêuticas, vê-se de acordo com a Figura 7 (à esquerda) um crescente número de patentes anuais no período de 1990 à 2017, segundo a plataforma de busca LENS, com maior n° de patentes registradas em comparação as demais plataformas, Figura 7 (à direita). O maior n° de depósitos de patentes está a cargo dos Estados Unidos da América com 87.545 patentes, reflexo histórico-cultural de um incentivo a inovação.

Figura 7 - À direita gráfico de n° de patentes por ano em todo o mundo segundo LENS; à esquerda, o n° de patentes de acordo com as plataformas de busca.



Fonte: (LENS ORGANIZATION, 2018) e autora, 2018.

Com base no exposto, as ciclodextrinas apresentam grande potencial na geração de novos produtos, bem como publicações de inovações tecnológicas farmacêuticas e de cunho analítico. Assim, na sequência, o princípio de algumas técnicas utilizadas, será explicado sucintamente para melhor entendimento dos processos observados e discutidos nos resultados.

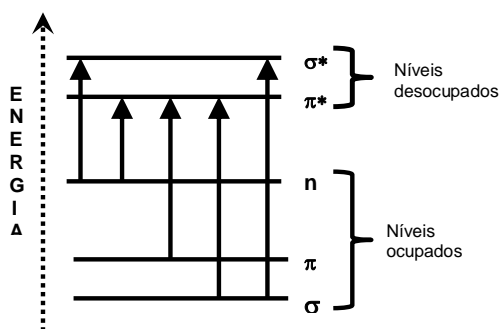
1.2 Espectroscopia no UV-vis

A espectrofotometria vem sendo empregada como técnica clássica no estudo de interações entre moléculas biologicamente ativas e macromolécula e polímero. Os métodos acompanham mudanças no perfil do espectro, como: aumento ou diminuição da absorção eletrônica e deslocamento seja para maiores comprimentos de onda (batocrômico), ou menores comprimentos de onda (hispocrômico). Dessa forma, vale a pena descrever o princípio da técnica.

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

Quando uma molécula absorve energia, um elétron é promovido de um orbital ocupado para um orbital desocupado de maior energia potencial. Na maioria das moléculas, os orbitais ocupados de menor energia são os σ (ligações sigma); os orbitais π ficam em níveis de energia um pouco mais altos, e os pares isolados, ou orbitais não ligantes (n), ficam em energia ainda mais altas. Os orbitais desocupados ou antiligantes (π^* e σ^*), são os de maior energia, Figura 8 (PAVIA et al., 2010).

Figura 8 - Níveis de energia eletrônica e transições.



Fonte: Adaptado de Pavia et al, 2010.

A transição mais provável é do orbital ocupado de maior energia (HOMO) para o orbital desocupado de menor energia (LUMO). A relação entre a energia absorvida em uma transição eletrônica e a frequência (ν), o comprimento de onda (λ) e o número de onda ($\bar{\nu}$) é:

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

Onde h é a constante de Planck, c é a velocidade da luz e ΔE é a energia absorvida pela molécula na transição eletrônica entre um estado de menor energia (estado fundamental) e um de maior energia (estado excitado). A energia absorvida depende da diferença entre os dois estados, quanto menor, maior será o comprimento de onda de absorção (SILVERSTEIN et al., 1994).

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

1.3 Espectroscopia de Fluorescência

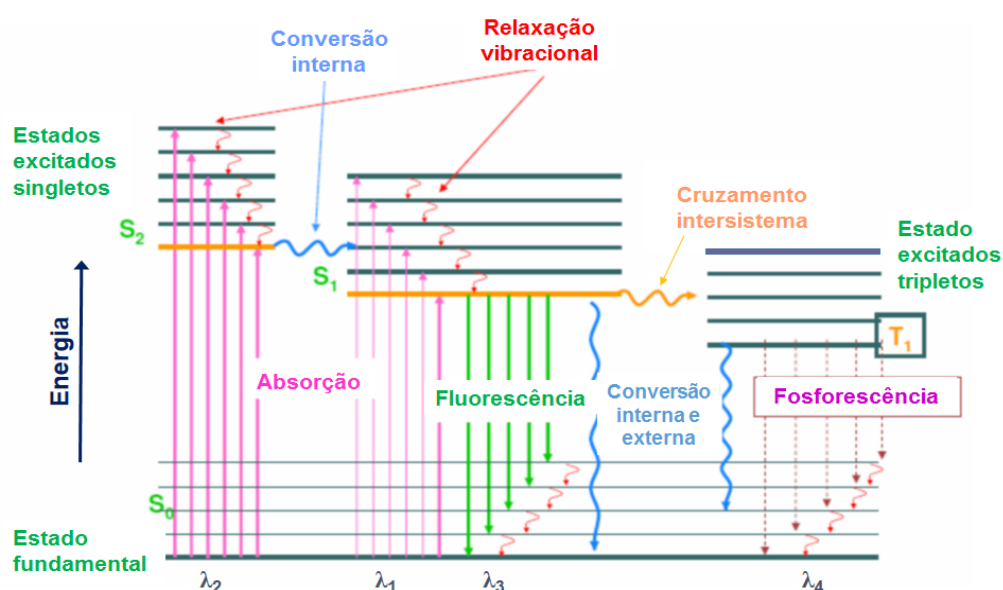
O fenômeno de fluorescência é um tipo de luminescência, caracterizado pela absorção de radiação em um determinado comprimento de onda ou grupo de comprimentos de onda e a re-emissão em um diferente comprimento de onda. O comprimento de onda de excitação é, geralmente, menor do que o comprimento de onda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

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

O diagrama de Jablonski (Figura 9) é conveniente para visualizar, de um modo simples, os possíveis processos: absorção de fótons, conversão interna, fluorescência, cruzamento intersistema, fosforescência, fluorescência com retardo e transições tripleto-tripletos. Os estados eletrônicos singletos são representados por S0 (estado eletrônico fundamental), S1, S2, e estados tripletos, T1, T2, ... Níveis vibracionais são associados com cada estado eletrônico.

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

Figura 9 - Diagrama de Jablonski, diagrama parcial de níveis de energia para um sistema fotoluminescente.



Fonte: Adaptado de SKOOG et al., 2009.

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

1.4 Eletroquímica

Os estudos que envolvem a transferência de elétrons são importantes para a compreensão de diversos processos que ocorrem no meio biológico. Muitos processos em células vivas, desde seu metabolismo até sua defesa, envolvem processos de oxidação e redução. As enzimas que catalisam estes processos são onipresentes nos organismos vivos e requerem um ambiente redox que permita realizar eficientemente esta função. Esse ambiente redox é mantido por um complexo grupo de proteínas, peptídeos e genes, com base em uma série de transformações redox e não-redox, catalisadas enzimaticamente ou não, e envolvem transferência de elétrons e de átomos. Qualquer desequilíbrio nesse sistema pode causar alteração na homeostase celular ou em outros ambientes (MOURA, 2008).

A eletroquímica se refere a fenômenos químicos associados à transferência de elétrons, que podem ocorrer homoganeamente em solução, ou heterogeneamente na superfície do eletrodo (BRETT e BRETT, 1996). O processo eletroquímico baseia-se na aplicação de um potencial capaz de oxidar ou reduzir analitos de interesse, sendo o método padrão para o estudo das reações redox.

Os métodos eletroquímicos oferecem certas vantagens sobre métodos convencionais, como: baixo consumo de reagentes; custo relativamente baixo de instrumentação; possibilidade de miniaturização e portabilidade; fornecimento de informações sobre a atividade da espécie química; além de fácil controle de variáveis, que, podem ser combinadas de diferentes formas, dentre a diversidade de técnicas (MOURA, 2008; SKOOG, 2009).

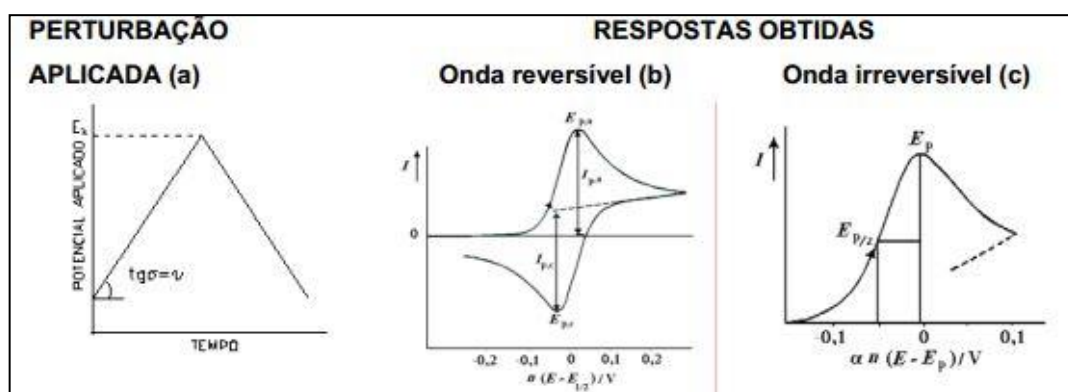
1.4.1 Voltametria cíclica

Dentre as diversas técnicas eletroquímicas existentes, a técnica mais utilizada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos é a voltametria cíclica (VC). A eficiência desta técnica está na sua habilidade em fornecer, rapidamente, informações sobre as reações de transferência de elétrons, sobre a termodinâmica de processos redox, sobre a cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons, a possibilidade de investigar a reatividade química das espécies eletrogeradas e reações químicas acopladas a processos adsorptivos, além

de auxiliar na elucidação do mecanismo eletródico analisado (BRETT e BRETT 1996; BARD e FAULKNER, 2001).

A VC é uma técnica de varredura reversa de potencial (E), onde o E aplicado ao eletrodo é submetido à variação, numa velocidade conhecida e constante, e ao atingir o E final desejado, a varredura é revertida ao valor inicial. Obtém-se como resposta a essa perturbação (Figura 10a), numa transferência eletrônica reversível, um par de picos, catódico e anódico (Figura 10b), quando é irreversível há apenas um pico (Figura 10c) (GREEF et al., 1985).

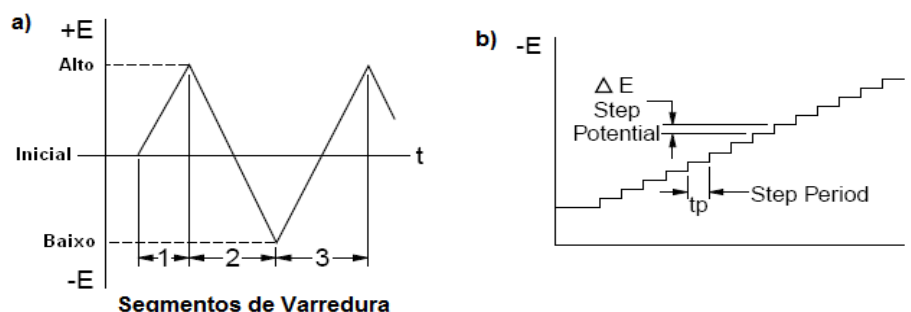
Figura 10 - Representação esquemática do (a) Potencial aplicado ao eletrodo, tem como resposta um sistema (b) reversível e (c) irreversível, com destaque para os parâmetros mais importantes, em VC.



Fonte: GREEF et al., 1985.

A forma de aplicação do E , em VC, está representada na Figura 11a, onde o ΔE é linear ao tempo, no eletrodo de trabalho estacionário numa solução. A técnica de VC "staircase" é utilizada como contraponto a VC linear, no sentido de minimizar a contribuição da corrente capacitiva na corrente total. Porém, o E é aplicado na forma de escada (staircase, Figura 11b), com degraus de E (10 mV) e tempo de duração de 50 ms, e a corrente é medida apenas no final deste intervalo (BARD e FAULKNER, 2001; BRETT e BRETT, 1996).

Figura 11 - Formas de aplicação de potencial para a VC: a) potencial com varredura linear e b) potencial do tipo escada (staircase).



Fonte: BOLT, 1997.

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

Para uma reação reversível, ou seja, uma reação que ocorre com velocidade suficientemente alta para estabelecer um equilíbrio dinâmico na interface, apenas a etapa de transferência de massa influenciará no processo. A corrente do pico (em amperes) neste caso é dada pela equação 1:

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

Sendo que n é o número mols de elétrons envolvidos no processo, A é a área do eletrodo (cm^2), D_0 é o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) e C_0 é a concentração da espécie em solução (mol cm^{-3}), v é a velocidade de varredura (V s^{-1})

Para uma reação reversível, a corrente de pico varia linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, a razão entre a corrente de pico anódico e catódico será igual a 1 e independente do valor de v , o potencial de pico não apresenta

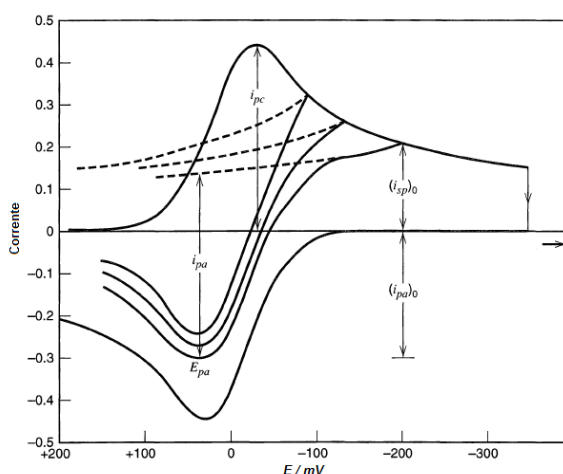
variação com a velocidade de varredura de potencial e a razão $i_p/v^{1/2}$ é constante e independe de v (BARD e FAULKNER, 2001; BRETT e BRETT, 1996).

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

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

em que devem ser consideradas as intensidades das correntes $(i_{pa})_0$, $(i_{pc})_0$ e $(i_{sp})_0$ desde a corrente zero, sendo desta forma, descritas na Figura 12

Figura 12 - Voltamograma cíclico, descrito por Nicholson, detalhando as correntes de pico em relação à corrente zero.



Fonte: Adaptado de Bard e Faulkner, 2001.

Quando a velocidade de transferência de carga é lenta comparada com a velocidade de varredura, as concentrações das espécies oxidadas (O_x) e reduzidas (R_{ed}) não serão mais função apenas do potencial, não seguindo a Lei de Nernst. Nestas circunstâncias, a equação que descreve a corrente de pico (i_{pc}) é dada segundo a equação 3

$$i_{pc} = (2,99 \times 10^5) n(\alpha n)^{1/2} A C_0 D_0^{1/2} v^{1/2} \quad \text{Equação 3}$$

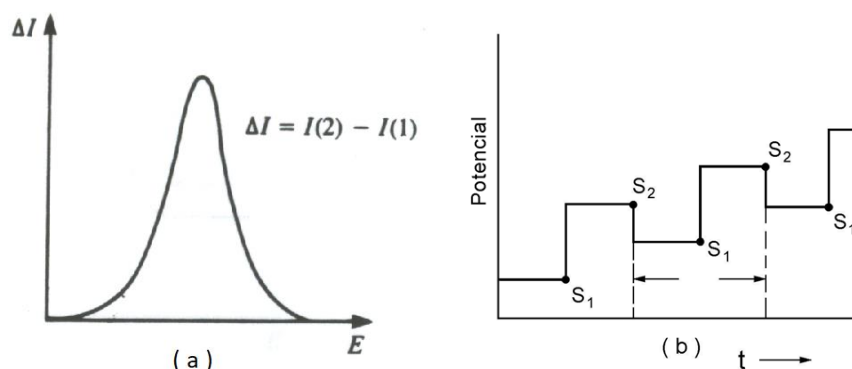
Onde α é o coeficiente de transferência de elétrons e, nestes casos, em reações irreversíveis, o voltamograma costuma apresentar apenas pico anódico, podendo se deslocar com o aumento da velocidade de varredura. Já para uma reação

eletródica quase-reversível, a corrente é controlada tanto pela etapa de transferência de massa como pela etapa de transferência de carga e a equação de Nernst seria apenas aproximadamente satisfeita (BARD e FAULKNER, 2001; BRETT e BRETT, 1996).

1.4.2 Voltametria de pulso diferencial

A voltametria de pulso diferencial (VPD) é uma técnica muito usada em medidas analíticas com baixo limite de detecção de espécies orgânicas e inorgânicas, em que, o degrau de potencial é a base deste tipo de voltametria (WANG, 2000). Na VPD, pulsos de amplitude fixos sobrepostos a uma rampa de E crescente são aplicados ao eletrodo de trabalho, a forma e os sinais de excitação captados em equipamentos digitais está representada na Figura 13b, há uma combinação de um pulso de saída com um sinal em degrau.

Figura 13 - (a) Perfil corrente-potencial esquemático para VPD e (b) representação esquemática da aplicação do potencial em função do tempo em VPD para instrumentos digitais, amostragem da corrente em S1 e S2, sendo registrada a diferença entre essas correntes.



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

Em VPD, a corrente é medida duas vezes, para correção da corrente capacitiva, sendo uma antes da aplicação do pulso (S_1) e outra ao final do pulso (S_2), onde a primeira corrente é instrumentalmente subtraída da segunda. Em seguida, a diferença das correntes é plotada em função do E aplicado, e o voltamograma resultante consiste de picos de corrente de forma gaussiana, cujas áreas são diretamente proporcionais à concentração do analito (Figura 13a). Esta correção de

correntes possibilitada pelo modo de pulso diferencial permite obter limites de detecção da ordem de $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ (BRETT e BRETT, 1996).

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Emprego de ciclodextrina em extrato de barbatimão, visando maior biodisponibilidade de compostos ativos e avaliação espectroscópica e eletroquímica da interação entre o ácido tânico e HP- β -CD.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a interação entre β -ciclodextrina e os compostos presentes no extrato etanólico da casca do barbatimão (*Abarema cochliacarpus*) via UV-vis.

Avaliar interação do TA com HP- β -CD, por eletroquímica em solução e através de eletrodo modificado, espectroscopia no UV-vis e fluorescência;

Determinar constantes de interação pelas técnicas utilizadas, quando possível;

Realizar análises de RMN H^1 para confirmar interação e estequiometria.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Produtos químicos e solventes

Todos os reagentes químicos utilizados nas análises e listados na Tabela 2, foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas em água grau Milli-Q (18 MΩ cm).

Tabela 2 - Lista de reagentes utilizados.

| Reagentes | Aquisição |
|---|----------------------|
| Ácido tânico | |
| β-cyclodextrina | Sigma Aldrich |
| HP-β-ciclodextrina | |
| Ferricianeto de potássio (K ₃ [Fe(CN) ₆]) | Êxodo [®] |
| Ferrocianeto de potássio (K ₄ [Fe(CN) ₆]) | |
| Ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) | Merck (Germany) |
| Etanol P.A. | |
| Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄) | Panreac [®] |
| Acetato de sódio (NaOAc) | Vetec Química Fina |
| Ácido gálico | Ltda |
| Fosfato de sódio diidratado (Na ₂ HPO ₄) | |
| Fosfato de sódio monoidratado (NaH ₂ PO ₄) | (Rio de Janeiro, BR) |
| Hidróxido de potássio (KOH) | |
| Sulfato de sódio (Na ₂ SO ₄) | |

Fonte: Autora, 2018.

3.2 Estudos de espectrofotometria no UV-vis

Os espectros no UV-vis foram registrados em um espectrofotômetro NanoDrop de arranjo de diodos Hewlett-Packard 8453A, utilizando uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm.

3.2.1 Estequiometria de interação entre TA:HP- β -CD por espectrofotometria no UV-vis

O método de Job's plot foi adotado para determinar a estequiometria do complexo TA:HP- β -CD (MELO et al., 2007). Misturas de TA:HP- β -CD foram preparadas variando a fração molar de cada substância de 0,1 a 0,9, mantendo a concentração total da solução $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ (Tabela 3) em água deionizada, protegidas da luz em todo o processo.

Tabela 3 - Protocolo do método Job's Plot de variação contínua para determinar a estequiometria do complexo TA:HP- β -CD.

| HP- β -CD | TA | R | Estequiometria |
|--------------------|--------------------|-----|----------------|
| 9×10^{-5} | 1×10^{-5} | 0,1 | 1:9 |
| 8×10^{-5} | 2×10^{-5} | 0,2 | 1:4 |
| 7×10^{-5} | 3×10^{-5} | 0,3 | 2:2,33 |
| 6×10^{-5} | 4×10^{-5} | 0,4 | 1:1,5 |
| 5×10^{-5} | 5×10^{-5} | 0,5 | 1:1 |
| 4×10^{-5} | 6×10^{-5} | 0,6 | 1,5:1 |
| 3×10^{-5} | 7×10^{-5} | 0,7 | 2,33:1 |
| 2×10^{-5} | 8×10^{-5} | 0,8 | 4:1 |
| 1×10^{-5} | 9×10^{-5} | 0,9 | 9:1 |

Fonte: Autora, 2018.

As soluções foram analisadas em espectrofotômetro UV-Vis, no comprimento de onda 274 nm após 24h de agitação no Shaker à 200 rpm e 25 °C. A diferença de intensidade de absorção (ΔA) entre as soluções contendo apenas TA e as misturas de TA com HP- β -CD multiplicada pela razão molar (R) de TA versus a razão molar de TA foi plotada em um gráfico, onde o ponto de mudança na inclinação da curva corresponde à razão estequiométrica do complexo.

3.3 Estudos eletroquímicos

3.3.1 Condições das medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas através do equipamento potenciostato/galvanostato, PGSTAT12 (serial n° AUT73222) da Autolab® e o NOVA

1.1 e GPES como interfaces. A verificação do pH das soluções tampão foi realizado em pHmetro da Quimis.

Para os estudos eletroquímicos utilizou-se um sistema de três eletrodos (Figura 14): eletrodo de ouro/carbono vítreo (BAS, diâmetro 1,6 mm e Methrom, diâmetro 3,0 mm) como eletrodo de trabalho; eletrodo de fio de platina, como auxiliar; e $\text{Ag}^+|\text{AgCl}|\text{Cl}^-$ ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$), como eletrodo de referência.

Os gráficos processados foram tratados utilizando o programa Microlab Origin 8,0.

Figura 14 - Sistema com os três eletrodos para análises eletroquímicas.



Fonte: Autora, 2018.

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

Um eletrodo de superfície limpa é indispensável para a formação de monocamadas auto-organizadas. Sendo assim, o eletrodo de ouro foi submetido a um tratamento eletroquímico em solução de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, na faixa de potencial de $-0,4 \text{ V}$ a $1,5 \text{ V}$ e velocidade de varredura de $0,1 \text{ V s}^{-1}$ por 10 ciclos. Por vezes, foi utilizado o eletrodo de fio de ouro e este por não possuir uma área plana não se submete a limpeza mecânica apenas as ciclagens com H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e uma

limpeza química, onde o eletrodo é exposto à chama azul de maçarico até o rubor, após uns segundos sob vapor de clorofórmio é imerso em clorofórmio, para evitar processo de oxidação do ouro.

Após o procedimento de limpeza, foi realizado o teste em Voltametria Cíclica com a sonda ferri/ferrocianeto de potássio (1:1) $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ nos potenciais de 0,6 à -0,3 V, para verificar a área eletroativa do eletrodo e a eficiência do polimento. Em seguida, após lavagem com água grau Milli-Q os eletrodos foram utilizados no estudo eletroquímico das SAMs.

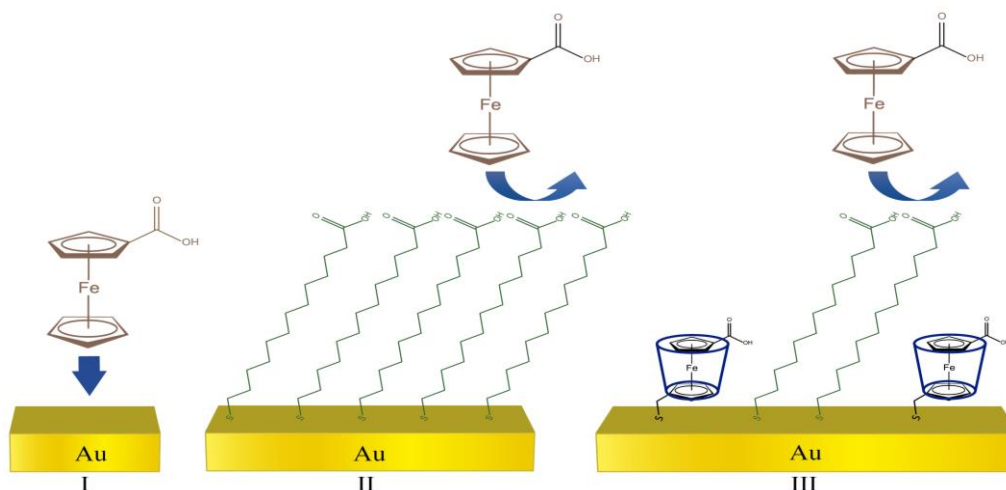
3.3.2 Avaliação da interação entre TA e HP- β -CD em solução

Os estudos foram realizados utilizando as técnicas de VC e VPD. O meio eletrolítico de escolha foi o tampão fosfato pH 7,0, e o acompanhamento dos voltamogramas do composto TA se deu sem e com adição de HP- β -CD ao meio.

3.3.3 Eletrodo de Ouro Modificado com SAM de β -CDSH + MUA

Para o preparo da SAM a monocamada de β CDSH (Figura 15) foi construída no eletrodo de ouro, que após limpo, foram introduzidos em uma solução contendo β -CDSH:FcCO₂H:MUA (2:2:1 m/m/m) em uma mistura de solventes (DMSO:EtOH:H₂O – 5:3:2 v/v/v). Inicialmente, o eletrodo foi imerso, por 1 hora, em uma solução de β -CDSH dissolvida em DMSO, desaerada com Ar₂ e sob agitação, a esta foi adicionado o Fc-CO₂H solubilizado em EtOH. O eletrodo permaneceu na solução por 1 hora, para que se formasse o complexo entre Fc-CO₂H e a cavidade da β -CDSH se mantivesse preenchida. Depois disso, a MUA e a água foram adicionadas à solução e a mistura foi novamente desaerada. Nesta solução final os eletrodos permaneceram em repouso por 24 horas, sendo lavados abundantemente com EtOH e água antes dos experimentos (FERREIRA et al., 2010).

Figura 15 - Representação esquemática da interação de ácido ferrocenocarboxílico em eletrodo de ouro: (I) eletrodo limpo; (II) modificado com monocamada de MUA; (III) modificado com monocamada mista de MUA/ β -CDSH.



Fonte: Adaptado de DAMOS et al., 2007.

Com base nas curvas obtidas por VC foi possível calcular a constante de formação do complexo com β -CD, utilizando o eletrodo modificado com SAM de β -CDSH.

3.4 Extrato de barbatimão

No presente estudo, o extrato da casca do barbatimão foi obtido do caule de *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & Grimes. As cascas de barbatimão foram secas e moídas em moinho elétrico (1,0 Kg), e o extrato obtido através da maceração com álcool etílico hidratado (92,8 °GL) (3L x 2) por 72 h, e após filtração (papel Watman nº 2) foi concentrado em evaporador rotatório a 60 °C até o volume de 0,1 L. Foram obtidos 0,4 Kg do extrato, um rendimento de 35 a 45% m/m em relação ao peso seco das cascas e entrecasas (CAETANO et al., 2012).

3.5 Preparo dos complexos de TA

As soluções nas proporções de 1:1 até 1:5 de ácido tânico e HP- β -CD foram preparadas em água destilada e mantidas sob agitação a 175 rpm à temperatura de 25°C e protegida da luz em uma incubadora Marconi MA-420 (São Paulo, Brasil) por um período de 24h, tempo escolhido para garantir que os compostos envolvidos estão em equilíbrio no meio.

Após passar o tempo reacional, as soluções foram liofilizadas e o pó obtido, com caráter altamente higroscópico, foi deixado em dessecador sob vácuo e encaminhado para análises de RMN e ATR-FTIR, para elucidar o mecanismo de interação envolvido, visto que a estrutura não possibilita a formação de complexos de inclusão com ciclodextrina (FERREIRA, 2013a; FERREIRA et al., 2013b).

3.6 Condições para estudo em células de linfócitos humanos

O isolamento dos linfócitos foi realizado utilizando o reagente Ficoll paque® Heath care, de acordo com as instruções do fabricante. 10 mL de sangue total foi coletado com tubos de heparina e misturado com mesmo volume de meio de cultura de células (meio Gibco® RPMI 1640 (1X), Life Technologies, Paisley, UK).

Alíquotas de sangue diluído foram cuidadosamente colocadas sobre o Ficoll paque® e imediatamente centrifugadas a 400 x g durante 30 minutos em centrífuga. Em seguida, a camada contendo linfócitos foi cuidadosamente aspirada e transferida para um tubo de centrífuga preenchido com o meio de cultura celular. Esta solução foi suavemente misturada e centrifugada a 250 x g durante 10 min. O mesmo procedimento foi repetido mais uma vez. O sedimento de linfócito obtido foi ressuspenso com o meio de cultura celular utilizando uma pipeta Pasteur. A viabilidade dos linfócitos foi verificada usando coloração com azul tripan e foi superior a 96%. Havia 100.000 células/mL da suspensão. Os linfócitos isolados foram então utilizados no experimento (JURICA et al., 2017).

O Kit utilizado foi o Apo Tox-Glo™ Triplex Assay da Promega. As medidas de fluorescência foram realizadas seguindo dois comprimentos de onda:

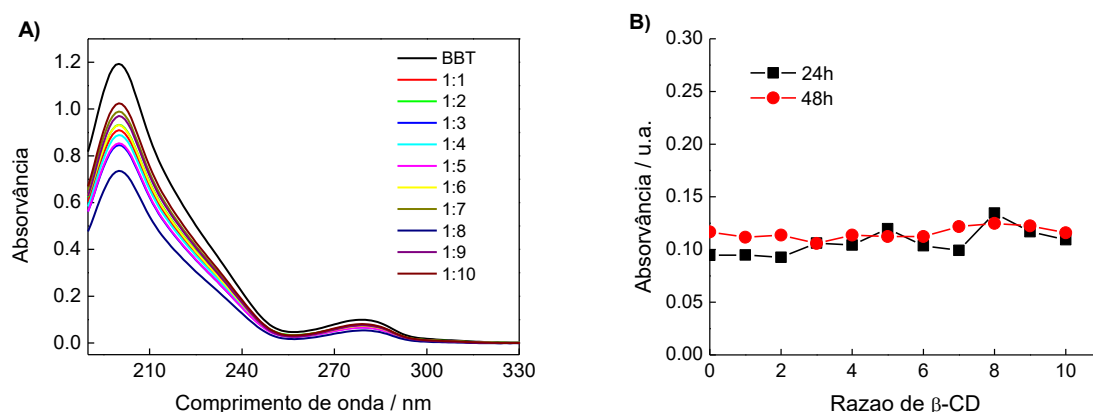
- 400 λ_{ex} /500 λ_{em} para viabilidade;

4 Resultados e discussão

4.1 Estudos de espectroscopia no UV-vis

Com base em estudos anteriores de formação de complexo entre o extrato e β -CD foi proposto o monitoramento do perfil de absorção do BBT frente várias proporções de β -CD no período de 24h e 48h (Figura 16), para estudos posteriores de formação de complexo e análise dos compostos ativos com baixa solubilidade. De acordo com a Figura 16, o tempo de 48h apresenta menor variação de absorção frente as diversas razões de β -CD. Este tempo foi escolhido para a formação do complexo e obtenção por liofilização.

Figura 16 - Relação da absorção eletrônica do BBT na ausência e presença de diferentes razões de β -CD de 1:1 até 1:10 (m/m), A) espectro de absorção após 48h de agitação, B) Absorção em $\lambda=279$ nm, após 24 e 48h de agitação.



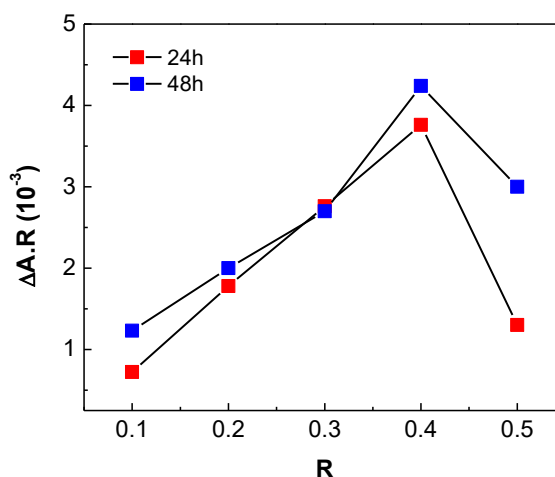
Fonte: Autora, 2018.

Vê-se que as proporções de 1:1 a 1:10 entre o extrato e o carreador se mostrou estável sem mudança significativa de absorção apesar da complexidade da amostra. Desse modo, foi levantado um questionamento sobre os possíveis componentes ativos do extrato que inviabilizam seu uso via oral, dentre eles estão os taninos. Partindo da toxicidade já estabelecida o ácido tânico foi tomado como molécula modelo para estudos com ciclodextrina, mesmo sendo um tanino hidrolisável, pode-se observar resultados interessantes até então não descritos.

4.1.1 Determinação da estequiometria do complexo de interação TA: HP- β -CD

A Figura 17 corresponde ao Job's plot de ($\Delta A \times R$) em função de R, onde ΔA é a variação da intensidade de absorção e R é a razão de Ácido Tânico em relação a HP- β -CD, com base na Tabela 3 descrita na metodologia. O ponto máximo de mudança de inclinação ocorre em $R = 0,4$, sugerindo que o complexo entre TA e HP- β -CD, possui proporção estequiométrica de 1:2. Foi realizado o experimento nos tempos de 24 e 48 horas, tempos mais utilizados na literatura, garantindo a formação do complexo, caso haja interação. Os resultados de ambos deram concordantes.

Figura 17 - Gráfico da razão de TA na mistura TA:HP- β -CD (R) versus a variação de absorção das diferentes razões da mistura em relação a TA ausente de HP- β -CD multiplicado pela razão correspondente ($\Delta A \cdot R$).

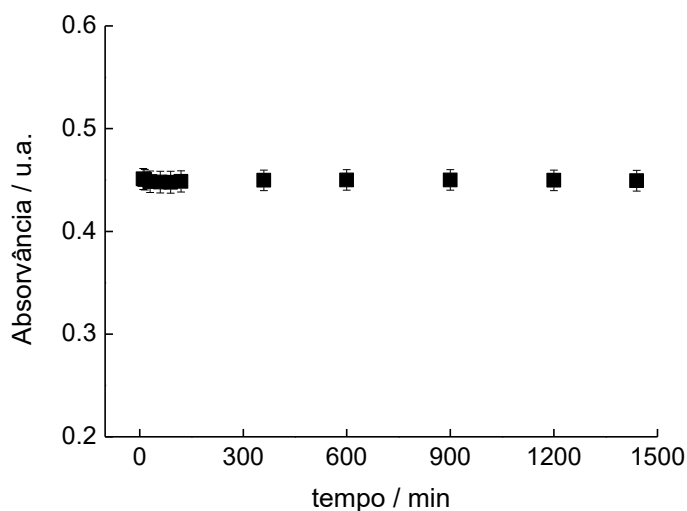


Fonte: Autora, 2018.

Os demais compostos do trabalho já possuem estudos com HP- β -CD e/ou β -CD publicados. O ácido úsnico, a β -lapachona e a mangiferina apresentam estequiometria 1:1 (FERREIRA et al., 2010; NASONGKLA et al., 2003; STANKOVIC et al., 2013).

A Figura 18 mostra o perfil de estabilidade no UV-vis da interação entre o ácido tânico ($3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) e HP- β CD na razão molar 1:2 mantendo a absorção constante dentro do período monitorado de 24h, com desvio de 0,011 num estudo em triplicata.

Figura 18 - Estabilidade da interação do ácido tânico em presença de HP- β -CD 1:2, por 24 horas.



Fonte: Autora, 2018.

4.1.2 Estudo da constante de formação aparente do complexo de interação TA:HP- β -CD

A espectrofotometria vem sendo empregada como técnica clássica no estudo de interações entre moléculas biologicamente ativas, macromolécula e polímero. Os métodos acompanham mudanças no perfil do espectro, como: aumento ou diminuição da absorção eletrônica e deslocamento seja para maiores comprimentos de onda (batocrômico), ou menores comprimentos de onda (hispsocrômico).

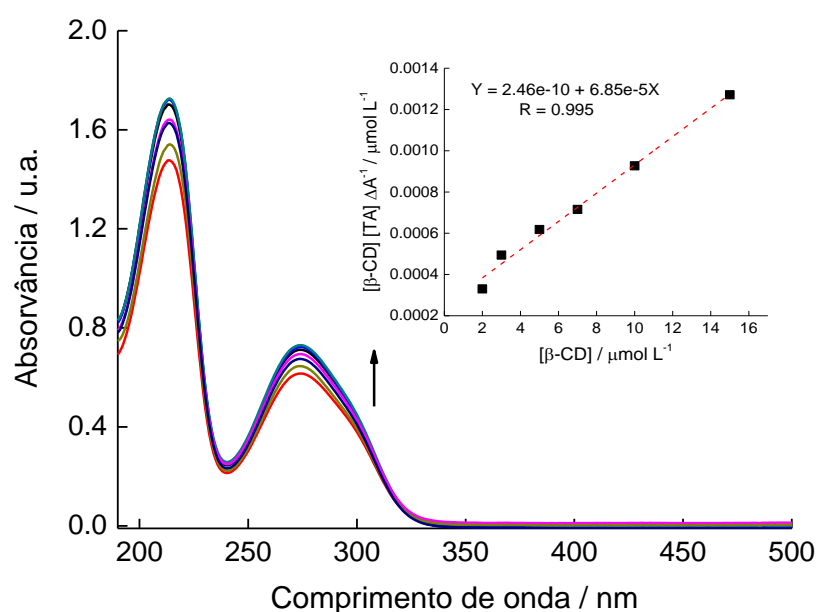
A formação do complexo de interação entre TA e HP- β -CD em tampão fosfato 7,4 foi avaliada no UV-vis, o TA permaneceu fixo a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, e variando a concentração de HP- β -CD de $3 - 20 \mu\text{mol L}^{-1}$. Aplicando a equação de Benesi-Hildebrand (equação 16) (HERNANDEZ-BENITO et al, 1999) foi possível calcular a constante de dissociação K_D e formação $K_F = 1/K_D$ para TA: HP- β -CD:

$$\frac{[\beta\text{CD}][\text{TA}]_0}{\Delta A} = \frac{K_D}{\Delta \epsilon} + \frac{[\beta\text{CD}]}{\Delta \epsilon} \quad \text{Equação 4}$$

Onde $\Delta \epsilon$ corresponde a variação da absorvidade molar. Plotando os valores de $[\beta\text{CD}][\text{TA}]_0/\Delta A$ vs. $[\beta\text{CD}]$ obtém uma linha reta, $K_D = \text{intercepto} / \text{inclinação}$.

O espectro de absorção da interação entre os compostos (Figura 19) mostra efeito hipercrômico das bandas de absorção em 214 e 274 nm do TA, o segundo comprimento de onda foi o utilizado nos cálculos, por apresentar melhor linearidade. O gráfico inserido na Figura 19 é o resultado do ajuste da equação, com um tempo de interação de 2h, sob agitação constante, foi possível calcular as constantes de dissociação e formação: $3,6 \times 10^{-6}$ e $2,8 \times 10^5$, respectivamente. Constante cuja ordem de grandeza caracteriza complexo de inclusão (FERREIRA et al., 2010), porém sabe-se que a estrutura molecular do TA não comporta um encapsulamento efetivo (impedimento estérico), bem como seu caráter hidrofílico possivelmente tem pouca afinidade pela cavidade hidrofóbica da HP- β -CD.

Figura 19 - Espectro de absorção de TA na ausência e presença de HP- β -CD a diferentes concentrações (3, 5, 7, 12, 15 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato pH 7,4. Tempo de contato de 2 h. Inset: regressão linear obtida pela equação citada no comprimento de onda de 274 nm.



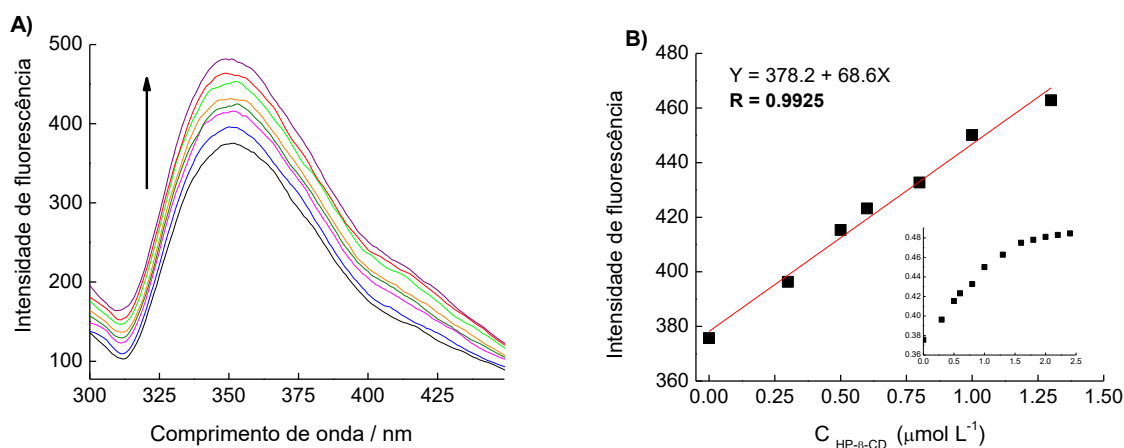
Fonte: Autora, 2018.

4.2 Medidas de Fluorescência

A molécula de TA livre apresenta fluorescência em solução, mas ao interagir com HP- β -CD vê-se um aumento crescente dependente da concentração de HP- β -CD no meio, Figura 20. Provavelmente, similar à o que ocorre com macromoléculas

biológicas, há uma restrição de rotação na molécula de TA, tornando-a planar e possibilitando o alinhamento dos orbitais π , desta forma, provocando aumento na intensidade de fluorescência HEGDE et al., 2012.

Figura 20 - A) Espectro de emissão de TA $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($\lambda_{\text{ext}} = 260 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 350$) na ausência e presença de 0,2- 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ HP- β -CD, em tampão fosfato pH 7,4.



Fonte: Autora, 2018.

Comumente os processos de formação de complexo estão associados a supressão da intensidade de fluorescência, seja do tipo estática ou dinâmica, onde se utiliza a equação de Stern-Volmer para obter a constante de extinção molar (K_{SV}) (VALEUR, 2001). Entretanto, vê-se um aumento da intensidade de fluorescência do TA em presença de concentrações crescentes de HP- β -CD, a faixa de 0,2 a 1,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ apresentou boa linearidade com coeficiente de correlação de 0,9925.

4.3 Estudos eletroquímicos

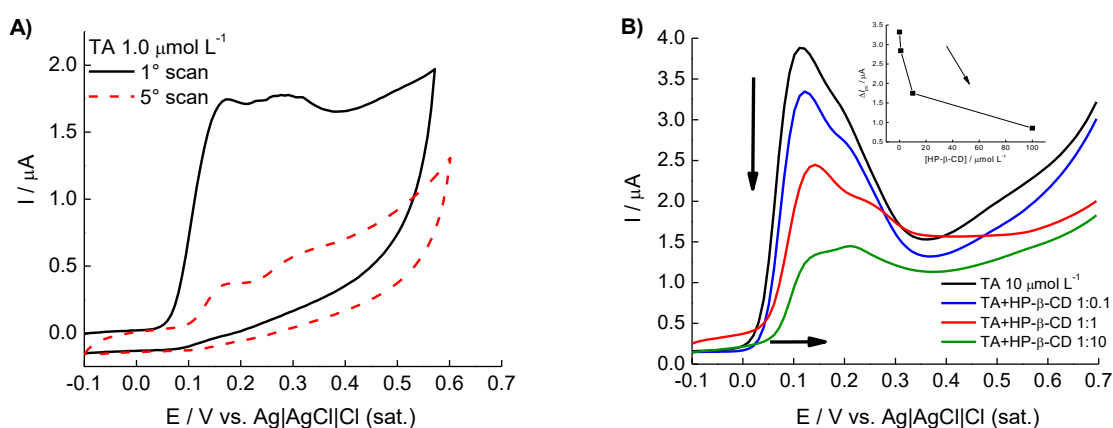
4.3.1 Interação do TA com HP- β -CD em solução

Conforme Figura 21A, a oxidação do ácido tânico apresenta um pico “com ombro” irreversível em 0,17 V, o mecanismo de oxidação pode ser proposto a partir da oxidação do ácido gálico (Figura22) onde o voltamograma deste apresenta 2 picos bem definidos, o primeiro pico de GA origina principalmente a oxidação do grupo orto-hidroquinona no anel da molécula. O segundo pico de oxidação é causado pela oxidação do terceiro grupo -OH de GA. Devido a razões eletrocínéticas, a oxidação do grupo galoil, ocorre em potenciais superiores que 0,4 V (YANG et al., 2001). No TA

se mostram sobrepostos, dada as unidades de ácido gálico se encontrarem hidrolisadas na estrutura.

O processo de transferência de elétrons no eletrodo de carbono vítreo é controlado por adsorção, com significativa redução da I_{pa} . O sinal é pequeno, pois o TA apresenta um pico de corrente dependente de pH, sendo o pH próximo a 7,0 o meio com menor I_p e E_p (WAN et al., 2007).

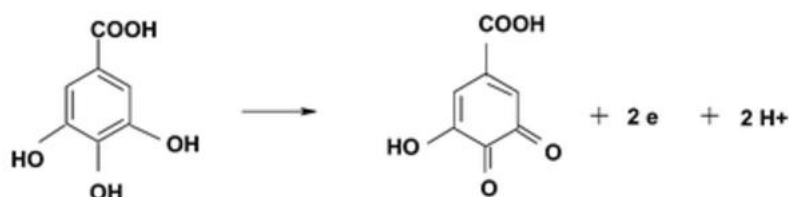
Figura 21 - Voltamograma de TA em eletrodo de carbono vítreo A) por VC 1° e 5° ciclo, processo adsortivo, B) por VPD em ausência e presença de HP- β -CD variando de 1 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$.



Fonte: Autora, 2018.

Em presença de HP- β -CD (Figura 21B) I_{pa} do TA diminui gradualmente e o E_{pa} desloca para valores mais positivos de 0,12 à 0,15 V, o que se deve, provavelmente, a interação em solução entre esses compostos, diminuindo a concentração do TA livre e aumentando a concentração de TA: HP- β -CD, complexo com caráter eletroquímico distinto do TA livre. O mecanismo de oxidação de TA é complexo dado o grande número de grupo eletroativos, por ser constituído de unidades de ácido gálico o mecanismo do ácido gálico está descrito na Figura 22, onde no processo de oxidação participa dois elétrons e dois prótons.

Figura 22 - O mecanismo do processo de oxidação ácido gálico.



Devido a adsorção do TA no eletrodo, foi necessário fazer polimento após cada varredura, sendo a área eletroativa acompanhada pelo perfil voltamétrico do par redox (sonda) $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4}$ (1:1) em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, mantendo-se sempre a mesma área, para fins comparativos dos dados. Apesar do voltamograma nos dar um indicativo do processo envolvido, este é puramente qualitativo, fazendo-se necessário um método que possa formar uma barreira seletiva no transporte de espécies na interface “eletrodo-solução”.

Com esse fim, as SAMs foram utilizadas como um método estratégico para conferir seletividade e sensibilidade na modificação de eletrodos, e a ligação covalente da β CDSH se fez via quimissorção na superfície de ouro.

4.3.2 Estudo da interação entre TA e SAM- β CDSH por VC

Como observado anteriormente o TA interage consideravelmente com HP- β -CD, entretanto, devido ao caráter adsortivo do TA, não foi possível construir uma curva analítica. Para tanto, foi realizada uma modificação na superfície do eletrodo de ouro, com uma SAM mista de MUA e β -CDSH.

A Figura 23 exhibe os voltamogramas obtidos por VC do complexo de interação TA: β -CD em SAM de β -CD+MUA, para a faixa de concentração de $0,1$ a $1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de TA. Pode-se observar um aumento na I_p em função do aumento da concentração do analito, sem deslocamento de potencial significativo ($0,19 \text{ V}$). Apesar de não haver a formação de um complexo de inclusão, a resposta de corrente obtida indica uma associação entre o TA e a CDSH fixada na superfície.

As monocamadas formadas no ouro seguem a cinética de Langmuir-Blodgett (YÁÑEZ, 2006). Assim, de posse das I_{pa} foi possível determinar a constante de associação (K) do TA na SAM, utilizando uma derivação da isoterma de Lagmuir):

$$\frac{[TA]_0}{I} = \frac{1}{KI_{max}} + \frac{[TA]_0}{I_{max}} \quad \text{Equação 5}$$

Onde $[TA]_0$, é a concentração da espécie eletroativa, I é a corrente de medida para cada concentração da molécula de TA, I_{max} é a corrente de pico máxima, e K é a constante de formação correspondente ao complexo de interação entre a molécula TA com β -CD ancorada no eletrodo (FERREIRA et al., 2010). A Figura 23A, apresenta o voltamograma de TA em SAM de β CD, foi possível construir uma curva analítica Figura 23B, cujo limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculado em 7,7 e 25,7 nmol L⁻¹ respectivamente através das equações 6 e 7. O valor obtido de LD está próximo dos descritos na literatura para TA de mesma ordem de grandeza (Li et al., 2006; XIE and LI, 2009; LI et al., 2015; VU et al., 2015).

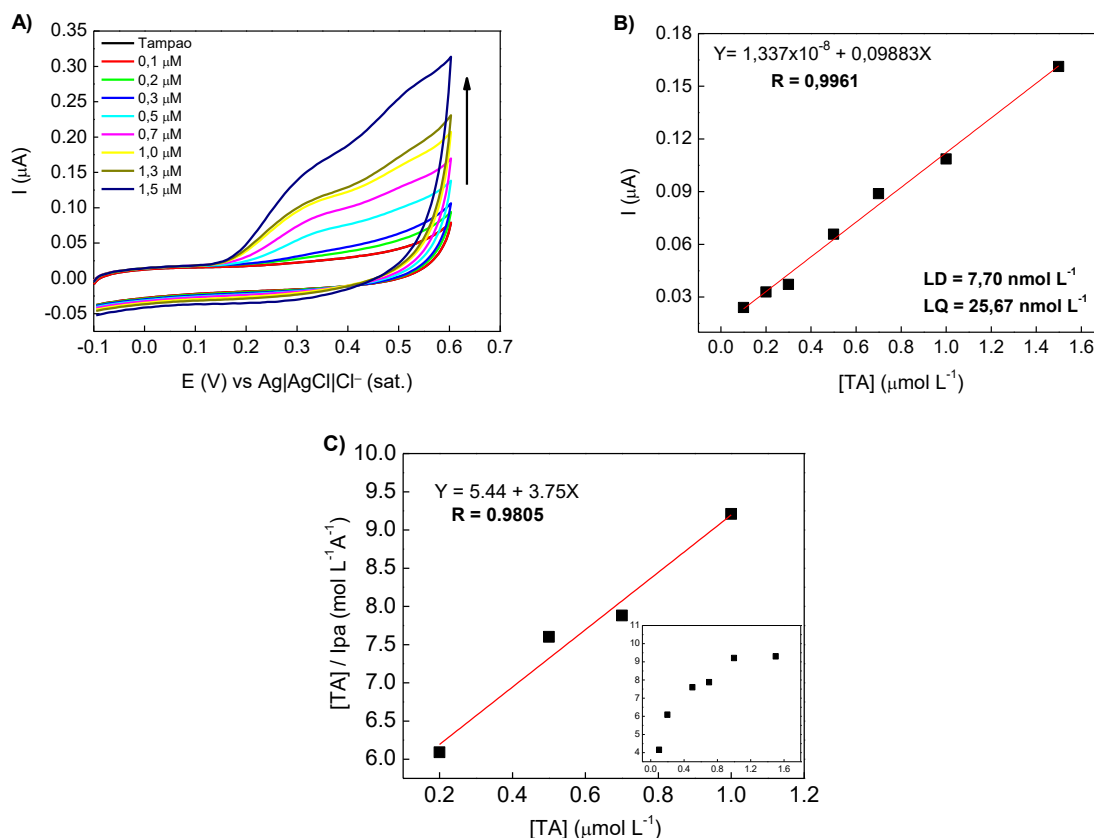
Para a determinação do limite de detecção utilizou-se o desvio padrão da média aritmética das correntes obtidas dos dez voltamogramas de brancos, no mesmo potencial do pico voltamétrico da oxidação de TA, e a relação:

$$LD = 3S_B/b \quad \text{Equação 6}$$

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. Para o limite de quantificação utilizou-se a relação abaixo:

$$LQ = 10S_B/b \quad \text{Equação 7}$$

Figura 23 - A) Voltamogramas em tampão fosfato pH 7,4 em crescentes concentrações de TA (0,1 a 1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em eletrodo modificado com β -CDSH+MUA; B) curva analítica de [TA] vs I_{pa} , para determinar LD e LQ; C) Regressão linear dos valores de [TA]/ I_{pa} vs [TA] para determinar K.



Fonte: Autora, 2018

A partir da equação 5 pode-se calcular a constante de associação K do TA com SAM de β -CD (Figura 23C), com valor de $6,8 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$, um alto valor de constante por SAM, demonstrando uma afinidade no composto pela β -CD (FERREIRA et al., 2010).

4.4 Caracterização da interação entre HP- β -CD e TA

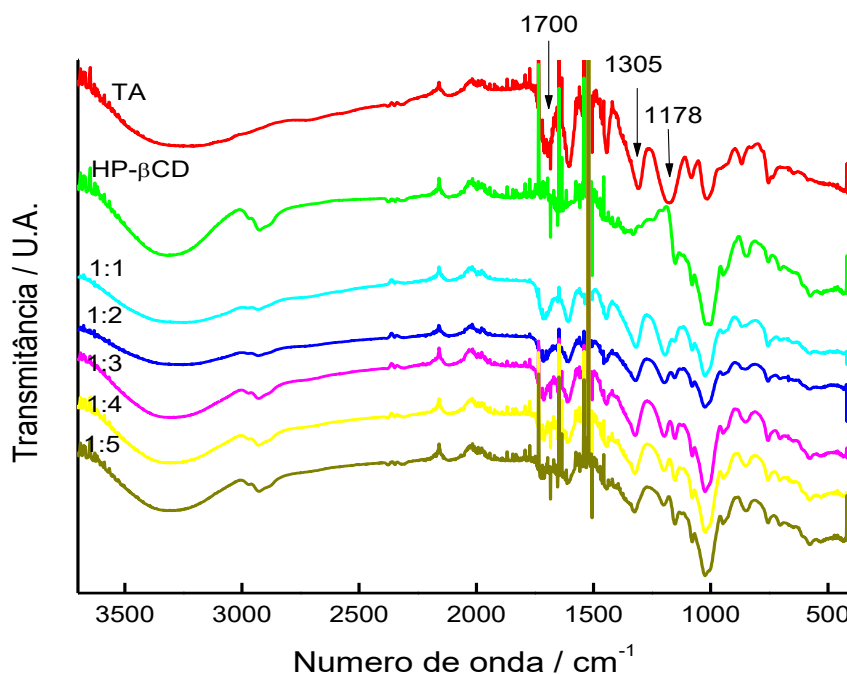
Técnicas clássicas de caracterização de complexo de formação foram utilizadas no intuito de comparar e elucidar a porção da molécula de ácido tânico que interage externamente com a ciclodextrina, bem como confirmar a estequiometria de correlação envolvida

4.4.1 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier obtidos por ATR

A fim de avaliar a formação do complexo de interação foram obtidos os espectros de infravermelho por ATR-FTIR, por meio de análise direta do pó. Os espectros no infravermelho foram registrados em espectrômetro IRPrestige-21 da Shimadzu. Os interferogramas foram acumulados ao longo de um espectro na faixa de números de onda entre 4000-400 cm^{-1} com resolução nominal de 4 cm^{-1} e 128 scans.

Os espectros do ácido tânico, HP- β -CD e seus complexos de interação estão representados na Figura 24, suas respectivas atribuições são descritas abaixo, conforme literatura (PANTOJA-CASTRO; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, 2012).

Figura 24 - Espectro de ATR-FTIR do TA, HP- β CD e seus complexos de interação na estequiometria de 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 e 1:5.



Fonte: Autora, 2018.

O espectro de FT-IR do ácido tânico (polímero constituído por moléculas de ácido gálico e ácido elágico) apresenta pico na região de onda 3300-3600 cm^{-1} , que indica a presença de alongamento $-\text{OH}$; 1700: deformação axial $\text{C}=\text{O}$; 1605 e 1524: deformação axial $\text{C}=\text{C}$ de anel aromático; 1178: deformação angular de $\text{O}-\text{H}$ e

deformação axial de C-O; 750: deformação angular fora do plano de C-H aromático; 640: deformação angular fora do plano de O-H.

O espectro da HP- β -CD indica uma banda de alongamento C-O em torno de 1000 cm^{-1} , a faixa de $3200 - 3600\text{ cm}^{-1}$ se refere ao grupo -OH da molécula.

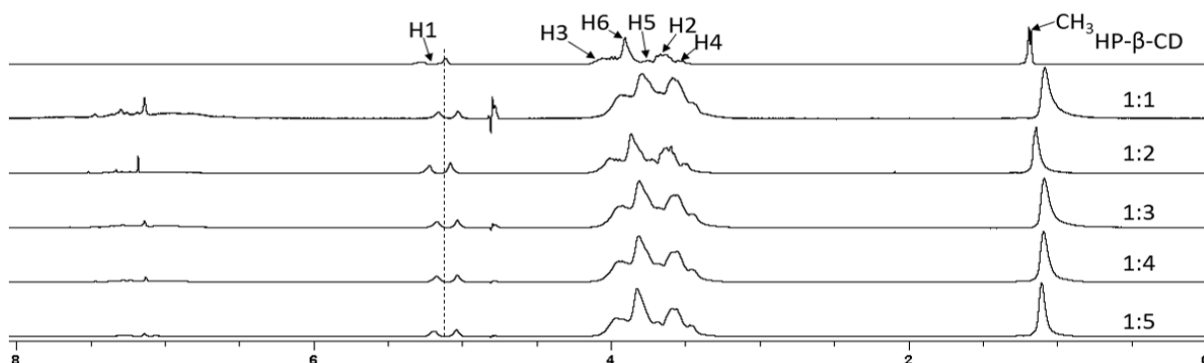
Os espectros correspondentes aos complexos exibem ligeiro deslocamento nos números de onda, quando comparado com o espectro do TA, destacados na Figura 24, maiores mudanças não foram ao comparar os espectros dos complexos com o da HP- β -CD sozinha. Os picos em 1700, 1305 e 1178, deslocam para 1712, 1305 e 1178 cm^{-1} respectivamente. Assim, a mudança se dá na região de banda do grupo carbonila: alongamento C=O em $1730 - 1705\text{ cm}^{-1}$ e C-O em $1100 - 1300\text{ cm}^{-1}$, porção éster da molécula (PANTOJA-CASTRO; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, 2012). A ampliação e a redução da intensidade máxima confirmam a formação de complexação por liofilização (GARG et al., 2010).

4.5 Resultados de RMN H^1

Devido à grande quantidade de hidroxila presente no ácido tânico, sua interação com a parte interna da HP- β -CD, que possui um ambiente hidrofóbico, torna-se impossível. No entanto, como a HP- β -CD também possui uma alta quantidade de hidroxilas na parte externa de sua molécula, isso possibilita que ambas interajam entre si através de ligações de hidrogênio.

Ao se comparar os valores de deslocamento químico dos espectros de RMN- H^1 do complexo HP- β -CD:TA, com diferentes razões da HP- β -CD (Figura 25) (Tabela 4), o complexo com a razão 1:2 foi o único que se comportou diferente dos demais, indicando ser o único a possuir uma estereoquímica diferente.

Figura 25 - Espectro de RMN 1H da hidroxipropil- β -ciclodextrina e os complexos com ácido tânico a diferentes razões molares.



Fonte: autora, 2018.

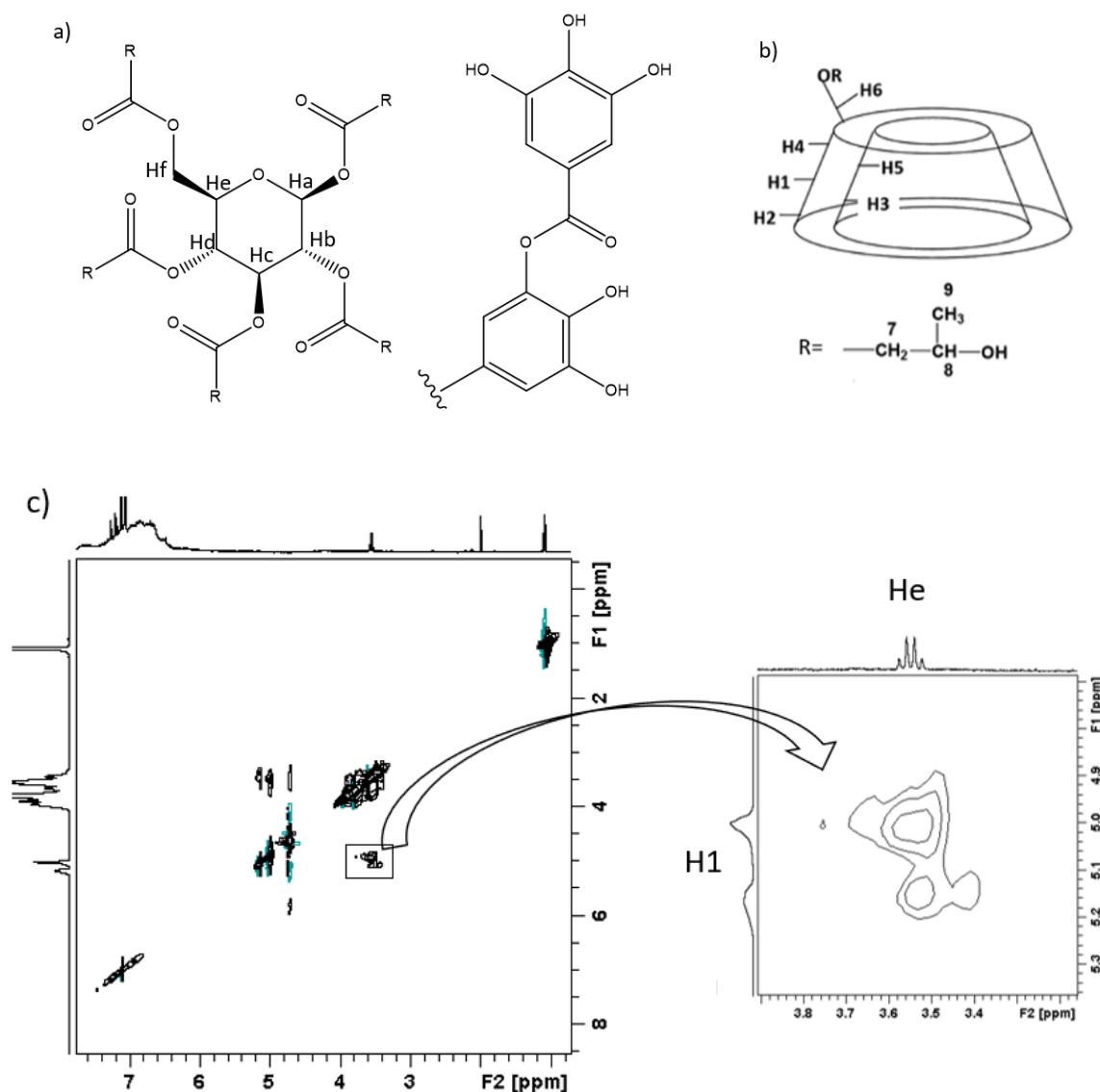
Tabela 4 - Variation of chemical shift of HP- β -CD in different molar ratios with tannic acid.

| ¹ H Identification | δ (ppm) | $\Delta\delta$ (ppm) | | | | |
|----------------------------------|-------------------|----------------------|-------|-------|-------|-------|
| | | 1:0 | 1:1 | 2:1 | 3:1 | 4:1 |
| H-1 | 5.181 | 0.087 | 0.033 | 0.182 | 0.080 | 0.067 |
| H-2 | 3.658 | 0.071 | 0.030 | 0.074 | 0.083 | 0.071 |
| H-3 | 4.050 | 0.110 | 0.045 | 0.106 | 0.103 | 0.085 |
| H-4 | 3.521 | 0.075 | 0.029 | 0.074 | 0.070 | 0.064 |
| H-5 | 3.745 | 0.077 | 0.023 | 0.071 | 0.070 | 0.041 |
| H-6 | 3.896 | 0.102 | 0.033 | 0.088 | 0.085 | 0.073 |
| CH ₃ | 1.173 | 0.088 | 0.028 | 0.084 | 0.081 | 0.068 |

Fonte: Autora, 2018

O estudo por RMN, com a técnica de RMN 2D ROESY, que possibilita através do efeito overhauser nuclear visualizar a interação especial entre dois hidrogênios que estão separados a uma distância menor que 4Å, detectou a interação do hidrogênio externo (H1) da HP- β -CD em 5.179 ppm, com o hidrogênio do anel de açúcar (He) do ácido tânico em 3.547 ppm (Figura 26), indicando que não houve a inclusão de nenhuma parte do ácido tânico no interior da HP- β -CD, mas sim a interação com as partes externas das moléculas. (DENG et al., 2016; JAHED et al., 2014; ZHANG et al., 2016).

Figura 26 - A) estrutura do TA, B) estrutura HP- β -CD, C) Espectro de RMN 2D ROESY, F1 é o espectro da HP- β -CD e em F2 o espectro do TA.

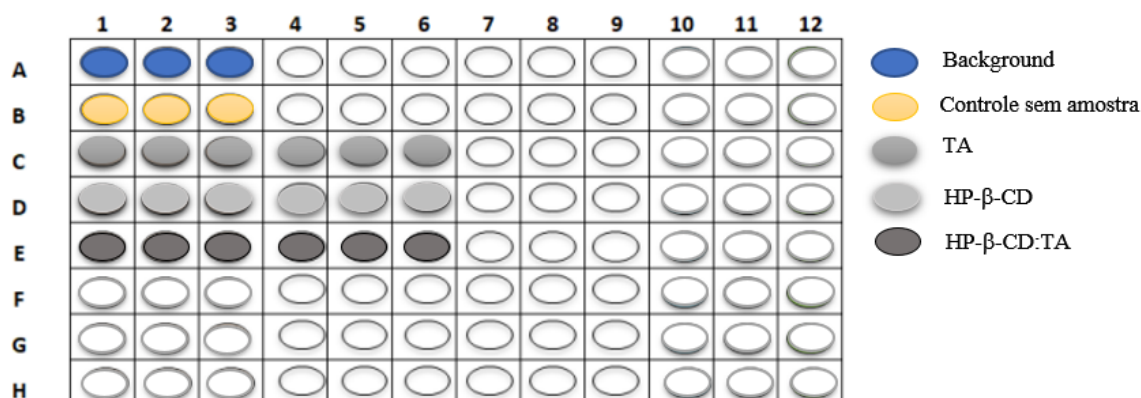


Fonte: autora, 2018.

4.6 Avaliação da viabilidade e citotoxicidade

Tendo em vista a toxicidade inata de TA testes de viabilidade celular foram realizados com o intuito de avaliar a toxicidade do complexo HP- β -CD:TA. Para as análises de viabilidade e citotoxicidade as amostras foram incubadas em placa de microdiluição de 96 poços, formada por 12 colunas (1 - 12) e 8 linhas (A - H), com a disposição segundo ilustrado na Figura 27, por 24h.

Figura 27 - Microplaca de células em presença das amostras em três diferentes concentrações (50 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$), para incubação. Ao lado guia de identificação de cada poço.



Fonte: Autora, 2018.

A Tabela 5 traz os valores referentes as três concentrações investigadas num estudo inicial, em triplicata. Torna-se clara as vantagens promovidas pela presença da CD, quando comparamos os valores do complexo e do composto sozinho. Dentro das condições do experimento o HP- β -CD:TA se mostra menos tóxico, apresentando valores de viabilidade acima de TA e abaixo de HP- β -CD e percentual de citotoxicidade menores que TA e maiores que HP- β -CD aumentando em 10,5 e 17 % a viabilidade de linfócitos no meio na concentrações de 50 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$

Tabela 5 - Resultados do ensaio quantitativo para a identificação da viabilidade em linfócitos do sangue periférico tratados com TA, HP- β -CD sozinhos e HP- β -CD:TA in vitro por 24 horas.

| Grupo experimental | Viabilidade celular (%) |
|---|-------------------------|
| TA 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ | 68,5 \pm 5 |
| TA 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ | 43 \pm 3 |
| HP- β -CD 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ | 116 \pm 2 |
| HP- β -CD 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ | 101 \pm 6 |
| HP- β -CD:TA 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ | 79 \pm 2 |
| HP- β -CD:TA 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ | 60 \pm 4 |

Fonte: Autora, 2018.

5 CONCLUSÃO

Diante dos dados expostos pode-se inferir que o ácido tânico interage com a hidroxipropilβciclodextrina numa relação de equilíbrio 1:2, segundo a metodologia Job's plot e RMN H¹, onde dentre as razões estudadas esta apresentou $\Delta\delta$ distinta das demais, e em experimento de ROESY a interação entre o H1 da HP-β-CD e o H interno do TA pode ser comprovada. Mudanças nos espectros de ATR-FTIR nas mesmas razões de 1:1 até 1:5 foram igualmente comparadas com resultados que corroboram com o já obtido.

Através do aumento da absorção de TA no UV-vis em presença de concentrações crescentes de HP-β-CD, foi possível calcular as constantes de dissociação e formação, com os valores de $3,6 \times 10^{-6}$ e $2,8 \times 10^5$ L mol⁻¹ respectivamente. Esse aumento também foi observado na fluorescência cuja curva apresentou bom coeficiente de correlação.

O LD e LQ foram calculados em 7,7 e 25,7 nmol L⁻¹ a partir de eletrodo de carbono modificado com SAM de CDSH/MUA. Com este foi possível determinar a constante de associação em $6,8 \times 10^5$ L mol⁻¹ corroborando a interação existente entre o carregados CD e o composto TA.

Em estudos preliminares com células de linfócitos o complexo HP-β-CD:TA apresentou menos toxicidade quando comparado ao TA sozinho na mesma concentração. Para maiores conclusões nesta linha estudos mais detalhados são sugeridos.

6 REFERÊNCIAS

AKKAYA, B.; Ç AKIROĞ LU, B.; O ZACAR, M. Tannic Acid-Reduced Graphene Oxide Deposited with Pt Nanoparticles for Switchable Bioelectronics and Biosensors Based on Direct Electrochemistry. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 6, n. 3, p. 3805–3814, 2018.

ANDRADE RG, Jr., Dalvi LT, Silva JM, Jr., Lopes GK, Alonso A, HermesLima M. The antioxidant effect of tannic acid on the in vitro copper-mediated formation of free radicals. **Arch Biochem Biophys**. v 437, p. 1-9, 2005.

BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. Eletroquímica: Princípios, métodos e aplicações. Coimbra, **Almedina**. p. 298-299, 1996.

BUDRYN, G. et al. Inclusion complexes of β -cyclodextrin with chlorogenic acids (CHAs) from crude and purified aqueous extracts of green Robusta coffee beans (*Coffea canephora* L.). **Food Research International**, v. 61, p. 202–213, 2014.

CAETANO, L.C. et al. Composição farmacêutica para tratamento de infecções HPV utilizando extratos de barbatimão. WO 2012000070 A1, 5 jan. 2012.

CEBORSKA, M. et al. Characterization of folic acid/native cyclodextrins host-guest complexes in solution. **Journal of Molecular Structure** 1109, p. 114-118, 2016.

CHEYNIER, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. The American Journal of Clinical Nutrition [online], v.81, supl 1, p. 223S- 229S, 2005.

COSTA, M. A. et al. Safety evaluation of proanthocyanidin polymer-rich fraction obtained from stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (BARBATIMÃO) for use as a pharmacological agent. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** v. 58, p. 330–335, 2010.

CRINI, G. Review: A History of Cyclodextrins Gre g. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 21, p. 10940–10975, 2014.

DENG, Y. et al. Host-guest inclusion systems of daidzein with 2-hydroxypropyl-

b - cyclodextrin (HP- b -CD) and sulfobutyl ether- b -cyclodextrin (SBE- b - CD): Preparation , binding behaviors and water solubility. **Journal of Molecular Structure**, v. 1118, p. 307–315, 2016.

DEVARAKONDA, B. et al. Effect of pH on the solubility and release of furosemide from polyamidoamine (PAMAM) dendrimer complexes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 345, n. 1–2, p. 142–153, dez. 2007.

DEVI, L. B.; MANDAL, A. B. Self-assembly of Ag nanoparticles using hydroxypropyl cyclodextrin: synthesis, characterisation and application for the catalytic reduction of p-nitrophenol. **RSC Advances**, v. 3, n. 15, p. 5238, 2013.

EL-HADY, D. A. Selective and sensitive hydroxypropyl-beta-cyclodextrin based sensor for simple monitoring of (+)-catechin in some commercial drinks and biological fluids. **Analytica Chimica Acta**, v. 593, n. 2, p. 178–187, 2007.

FABRÍCIO, L. et al. Quality control of tannic acid from some pharmacies of campo grande city (ms), Brazil. **Revista eletrônica de farmácia**, v. 3, n. 3, p. 33–38, 2008.

FERREIRA, F. D. R. et al. Electrochemical investigations into host-guest interactions of a natural antioxidant compound with β -cyclodextrin. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 2, 2010.

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

GARG, A. et al. Preparation and characterization of hydroxypropyl – β – cyclodextrin inclusion complex of eugenol: differential pulse voltammetry and ¹H-NMR. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 58, n. 10, p. 1313–1319, 2010.

GOULART, S. L. Características anatômicas, químicas e densidade do barbatimão. 2010. 131f. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2010.

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

GRILLO, R. et al. Caracterização físico-química de complexo de inclusão entre hidroximetilnitrofurazona e hidropropil- β -ciclodextrina. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 290–295, 2008.

HE, J. L. et al. β -Cyclodextrin incorporated carbon nanotube-modified electrode as an electrochemical sensor for rutin. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 114, n. 1, p. 94–100, 2006.

HEM, J. D. Complexes of Ferrous Iron With Tannic Acid. In: **HEMISTRY OF IRON IN NATURAL WATER**. 1. ed. Washington: [s.n.]. p. 75–94.

HERNÁNDEZ-MUÑOZ, L. S.; FRONTANA, C.; GONZÁLEZ, F. J. Covalent modification of carbon surfaces with cyclodextrins by mediated oxidation of β -cyclodextrin monoanions. **Electrochimica Acta**, v. 138, n. 0, p. 22–29, 2014.

HSUA, C.-M. et al. Enhancement of rhubarb extract solubility and bioactivity by 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Carbohydrate Polymers** 98, 1422-1429, 2013.

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

JU, M. J. et al. Fabrication of $\text{TiO}_2/\gamma\text{-CD}$ films for nitro aromatic compounds and its sensing application via cyclic surface-polarization impedance (cSPI) spectroscopy. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 123, n. 1, p. 359–367, 2007.

JURICA, K. et al. cytogenetic effects of hydroquinone in human peripheral blood lymphocytes. **Arh Hig Rada Toksikol**, v. 68, n. 11, p. 322–335, 2017.

KRAAL, P. et al. Copper complexation by tannic acid in aqueous solution. **Chemosphere**, v. 65, n. 11, p. 2193–2198, dez. 2006.

LENS ORGANIZATION. **The Lens - Free & Open Patent and Scholarly**

Search.

LI, G. et al. Analytical Methods Determination of tannic acid based on luminol chemiluminescence catalyzed by cupric oxide. **Analytical Methods**, v. 7, p. 1924–1928, 2015.

LI, S. et al. Original Paper Determination of Tannic Acid by Flow Injection Analysis with Inhibited Chemiluminescence Detection. **Microchim Acta**, v. 155, p. 427–430, 2006.

LOPES, G. C. et al. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wounds in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 265-272, 2005.

MEIRA, M. R. Viabilidade técnica e econômica de planos de manejo sustentável para o barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* Mart. Coville) no norte de Minas Gerais. 2012. 134f. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, Minas Gerais, 2012.

MELLO, J. C.P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: Ed.UFGRS/Ed.UFSC. cap. 24, p.517-543, 2001.

MELO, N. F. S. et al. Preparação e caracterização inicial de complexo de inclusão entre nitrofurazona e 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, p.35-44, 2007.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U.P. AND ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Quim. Nova*, v. 28, 892-896, 2005.

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

NASCIMENTO, R. O. Atividade antitrombótica do extrato da casca do barbatimão *Abarema cochilicarpo* e estudo bioeletroquímico de nitroaromáticos sintéticos. Tese de doutorado. UFAL, Instituto de química e Biotecnologia. 2015.

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

PANTOJA-CASTRO, M. A.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, H. Study by infrared spectroscopy and thermogravimetric analysis of Tannins and Tannic acid. **Revista latinoamericana de química**, v. 39, n. 3, p. 107–112, 2012.

SHANG, F. et al. Selective nanomolar detection of dopamine using a boron-doped diamond electrode modified with an electropolymerized sulfobutylether- β -cyclodextrin-doped poly(N-acetyltyramine) and polypyrrole composite film. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 10, p. 4089–4098, 2009.

SILVA, N. C. B. et al. Antinociceptive effects of *Abarema cochliacarpus* (B.A. Gomes) Barneby & J.W.Grimes (Mimosaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. February, p. 46–50, 2009.

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

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

STANKOVIC, M. et al. Inclusion complexes with cyclodextrin and usnic acid. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 76, n. 1–2, p. 173–182, 2013.

STEFAN-VAN STADEN, R. I.; NEJEM, R. M.; VAN STADEN, J. F. Enantioselective, potentiometric membrane electrodes based on cyclodextrins for the assay of glyceric acid in urine and serum samples. **Revue Roumaine de Chimie**, v. 58, n. 7–8, p. 659–665, 2013.

SZEJTLI, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 1743–1754, 1998.

UMASANKAR, Y.; THIAGARAJAN, S.; CHEN, S. M. Pinecone shape hydroxypropyl- β -cyclodextrin on a film of multi-walled carbon nanotubes coated with gold particles for the simultaneous determination of tyrosine, guanine, adenine and thymine. **Carbon**, v. 45, n. 14, p. 2783–2796, 2007.

VU, D. L. et al. Voltammetric Determination of Tannic Acid in Beverages using Pencil Graphite Electrode. **Food Analysis, Food Quality and Nutrition**, v. 33, n. 1, p. 72–76, 2015.

WAN, H. et al. Original Paper Electrochemistry and voltammetric determination of tannic acid on a single-wall carbon nanotube-coated glassy carbon electrode. **Microchim Acta**, v. 159, p. 109–115, 2007.

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

WANG, G. et al. Electrocatalytic response of norepinephrine at a β -cyclodextrin incorporated carbon nanotube modified electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 567, n. 2, p. 227–231, 2004.

XIE, C.; LI, H. Determination of tannic acid in industrial wastewater based on chemiluminescence system of KIO₄ – H₂O₂ – Tween40. **Luminescence**, v. 25, n. March 2009, p. 350–354, 2010.

YÁÑEZ, C. Cyclodextrin Modified electrodes and its application to pharmaceutical analysis. In: NÚÑEZ-VERGARA, J. A. S. S. B. L. J. (Ed.). . **Electroanalytical aspects of biological significance compounds**. Kerala, India: [s.n.]. p. 33–50.

YANG, B. et al. Relationship of electrochemical oxidation of catechins on their antioxidant activity in microsomal lipid peroxidation. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 49, n. 6, p. 747–751, 2001.

YANG, Y. et al. Electrochemical sensor for cinchonine based on a competitive host-guest complexation. **Analytica Chimica Acta**, v. 528, n. 2, p. 135–142, 2005.

ZHANG, D. et al. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy Preparation, characterisation and antitumour activity of β -, γ - and HP- β -cyclodextrin inclusion complexes of oxaliplatin. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 152, p. 501–508, 2016.

ZIMMERMAN, H. J. **Hepatotoxicity: the adverse effects of drugs and other chemicals on the liver**. [s.l.] Lippincott Williams & Wilkins, 1999.

**Sistemas carreadores nanohíbridos de PAMAMs, Ciclodextrinas e
Pontos quânticos de CdSe/CdS, encapsulamento e associação,
uma alternativa para compostos de baixa solubilidade**

1 INTRODUÇÃO

Muitos agentes terapêuticos, como extratos, moléculas pequenas, genes e peptídeos apresentam excelente potencial terapêutico, porém são limitados por baixa solubilidade, alta toxicidade ou mesmo instabilidade, impedindo significativamente seu uso na clínica medicamentosa. Na tentativa de solucionar essas problemáticas, muitas pesquisas têm recorrido a nanotecnologia com o intuito de melhorar as propriedades físico-químicas e biológicas de tais agentes como: maior solubilização, capacidade de liberação prolongada e aumento na especificidade dos locais de ação desejados.

Tendo em vista a importância do estudo da interação entre compostos de interesse biológico e nanocarreadores (ciclodextrinas e dendrímeros) e as inúmeras vantagens relacionadas a formação de complexos, o presente trabalho buscou inicialmente, através de métodos de eletroquímica clássica, espectroscopia no UV-Vis e fluorescência, investigar e compreender a relação existente entre os compostos estudados e os nanocarreadores, para assim, fazer a associação destes aos pontos quânticos.

Em estudos anteriores do grupo de eletroquímica, a mangiferina e a β -lapachona vem se apresentando como compostos promissores, e assim como o ácido úsnico, já apresentam comportamento eletroquímico bem definido. Sendo assim, um outro viés do trabalho foi a construção, caracterização e uso de plataformas híbridas nanoestruturada com ponto quântico e o carreador de escolha, como proposta para sensores inovadores. A estas heteroestruturas foi avaliado o comportamento eletroquímico das moléculas supracitadas com determinação de constantes.

1.1 Revisão bibliográfica

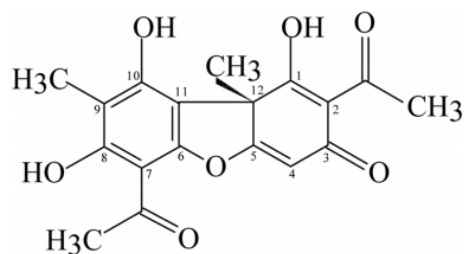
Conjugação ou complexação de agentes terapêuticos em transportadores poliméricos (ciclodextrinas ou dendrímeros) pode resultar em prolongada meia-vida de circulação, aumento da concentração no local de ação (como tumores, ou sistema retículo-endotelial) e diminuição da toxicidade não específica (SADEKAR; GHANDEHARI, 2012).

Mediante essas vantagens, os compostos de origens natural escolhidos neste estudo, se mostram promissores quanto as suas atividades farmacológicas, com diversas publicações de alvos biológicos e mecanismos de ação. Com o intuito de se obter dados relevantes como ponto de partida para pesquisas mais avançadas, o desenvolvimento do trabalho se baseia nos dados a seguir apresentados tanto para as moléculas eleitas como as técnicas utilizadas e seus princípios teóricos.

1.1.1 Ácido úsnico

O Ácido úsnico (UA) foi isolado a partir do líquen, uma relação simbiótica entre uma alga e um fungo, de *Usnea barbata*, é uma substância cristal de cor amarela de origem natural, é um derivado dibenzofurano [2,6-diacetil-7,9-di-hidroxi-8,9b-dimetil-1,3(2H,9BH)dibenzo-furandiona]. A Figura 28 mostra o líquen e sua fórmula estrutural (STANKOVIC et al., 2013).

Figura 28 - A) Línquen de *Usnea Barbata* e B) estrutura química do UA.



Fonte: (STANKOVIC et al., 2013).

Das centenas de metabólitos secundários conhecidos do líquen, o ácido úsnico derivado do dibenzofurano é sem dúvida o mais extensamente estudado. Possui 3

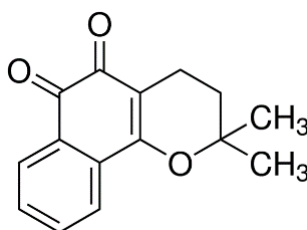
valores de pKa consequência da presença das três OH presentes na molécula, pKa1 = 4,4 (1-OH), pKa2 = 8,8 (10-OH) e pKa3 = 10,7 (8-OH) (INGÓLFSDÓTTIR, 2002).

O UA é conhecido por suas atividades biológicas tais como antibiótica, anti-inflamatória, antiprotozoária, antiviral, antitumoral e antimicótica (COCHIETTO et al., 2002; DE CARVALHO et al., 2005; INGÓLFSDÓTTIR, 2002). Entretanto, apesar dessa gama de atividades biológicas sua utilização na terapêutica é restrita devido à baixa hidrofiliabilidade e hepatotoxicidade da molécula (HAN et al, 2004). Sendo assim, vê-se necessário o uso de alternativas para contornar seus aspectos físico-químicos que tornam restrito seu uso na forma livre, bem como diminuir os efeitos tóxicos mantendo o composto biologicamente ativo, para tanto o uso de carreadores é uma dessas alternativas.

1.1.2 β -Lapachona

β -Lapachona (3,4-di-hidro-2,2-dimetil-2H-naftol [1,2-b] pirano-5,6-diona) (Figura 29) é um produto natural, presente na casca do Lapacho sul americano (*Tabebuia avellanedae*), que cresce principalmente no Brasil, que pode ser facilmente sintetizado por transformação química do lapachol, também isolado da casca de plantas da família Bignoniaceae ou lomatiol, isolada a partir de sementes de lomatia (DE ABREU et al., 2007).

Figura 29 - Estrutura da β -lapachona.



Fonte: Autora, 2018.

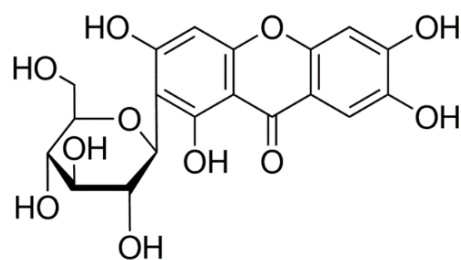
O presente composto mostrou ter uma variedade de efeitos farmacológicos, dentre eles: antibacterianos, antifúngicos (GUIRALD et al., 1994), antimaláricos (ANDRADE-NETO et al., 2004), atividades de tripanocidas (GOIJMAN ; STOPPANI, 1985), bem como antineoplásica contra linhagens celulares de câncer de próstata, cólon, mama, ovário, pulmão entre outras (DE ABREU et al., 2007).

Apesar da sua potencialidade a β -lapachona demonstra baixa solubilidade em água o que limita sua administração sistêmica e aplicação clínica. Para contornar essa problemática Abreu (2007) e colaboradores realizaram estudos de complexo de inclusão da β -lapachona em α e β -ciclodextrina com melhora da solubilidade, neste trabalho a proposta é de um novo carreador que cumpra o mesmo papel.

1.1.3 Mangiferina

A Mangiferina (1,3,6,7-tetrahidroxi-2-[3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]xanten-9-ona) (MGF) representada na Figura 30 é uma xantona glicosilada de origem natural obtida a partir de Plantas medicinais tradicionais e vários vegetais, entre eles *Mangifera indica L.* (nome comum: manga) (FERREIRA et al., 2010).

Figura 30 - Estrutura da mangiferina.



Fonte: Autora, 2018.

Este composto apresenta uma ampla variedade de atividades farmacológicas, que incluem ação antibacteriana, imunomoduladora, Anticancerígena, antidiabético, gastroprotetor, antiinflamatória, analgésica, atividades anti-HIV, cardio e citoprotetora, bem como capacidade antioxidante. Uma decocção aquosa da casca de manga (*M. indica L.*) foi desenvolvida e registrado como Vimang® um suplemento nutricional (FERREIRA et al., 2010, 2013).

A interação de MGF foi avaliada por fluorescência com albumina do soro bovino (BSA) com K_b na ordem de 10^5 e K_{sv} na ordem de 10^4 e indicou alteração conformacional da proteína com distanciamento de 5,2 nm segundo a teoria de Förster (LIN et al., 2009). A interação com DNA de esperma de arenque mostra que a MGF pode intercalar nos pares de bases, segundo testes de fluorescência em diferentes

temperaturas num mecanismo de extinção do tipo estático associado a ligações de hidrogênio e forças hidrofóbicas (TIAN et al., 2016)

A MGF também mostra ação inibidora, em estudos de perda de massa via eletroquímica, em processo corrosivo em aço carbono, como uma alternativa aos inibidores convencionais que mostram alta toxicidade, uma preocupação crescente associada aos problemas irreversíveis gerados ao ecossistema (PINHEIRO et al., 2016).

Entretanto, o uso de MGF é limitado em meios aquosos devido à sua baixa solubilidade, este problema pode ser contornado usando sistema de complexo de inclusão. Nosso grupo tem publicação com formação de complexo de MGF com ciclodextrina e encapsulação em sílica mesoporosa ordenada tipo SBA-15 outros carreadores que possibilitam o aumento da solubilidade no meio aquoso (FERREIRA et al., 2010; PONTES et al., 2017).

1.1.4 Carreadores

No estudos de formação de complexo com carreadores as forças que estabilizam a interação entre os carreadores e o ligante tem papel fundamental, ao passo que, num equilíbrio dinâmico em solução as forças estabilizantes não podem ser muito fortes, pois não há liberação da droga no alvo, porém não pode ser muito fraca, pois pode comprometer o carreamento até o alvo, podendo o ativo ser liberado antes. Estas ligações intermoleculares podem ser estabelecidas através de par iônico, interação hidrofóbica ou hidrofílica, ligação de hidrogênio, hóspede-hospedeiro, e interações $\pi-\pi$ que mantêm complexos unidos (MONTANARI et al., 1998).

Nos complexos o substrato está acomodado dentro de uma cavidade, um "encaixe complementar" e a interação ocorre em múltiplos "sítios", apropriadamente localizados e orientados. Embora a energia de interação com cada sítio seja de poucos Joules/mol (muito inferior a ligação covalente), o efeito cumulativo resulta em uma forte interação do substrato com o sítio ativo (MONTANARI et al., 1998).

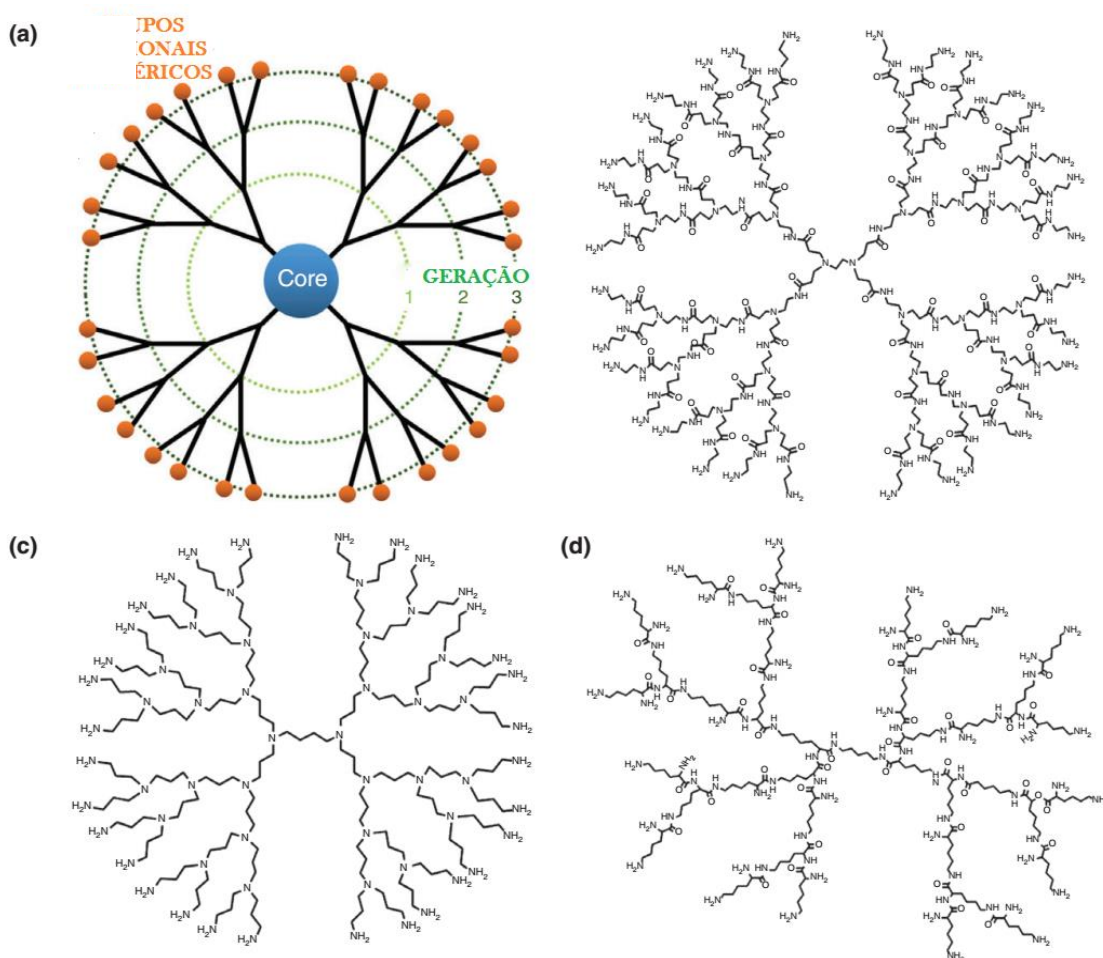
O trabalho traz dendrímero e ciclodextrinas como carreadores, as ciclodextrinas já foram bem descritas no capítulo anterior, na sequência uma breve introdução sobre dendrímeros.

1.1.4.1 Dendrímeros

Os dendrímeros são uma classe de polímero tridimensionais hiperramificado explorados em aplicações de nanomedicina, descritos inicialmente por Tomalia e Newkome em 1985, separadamente, como estruturas de núcleo-casca, construídas camada a camada, formando gerações, conforme Figura 31A. O nome dendrímero foi derivado da palavra grega *dendron* que significa “árvore” e *mer* “seguimento”, que é representativa de sua arquitetura ramificada distinta de “árvore”. Esse recurso faz do dendrímero uma estrutura bem definida o que possibilita controlar suas funções de superfície (HSU et al., 2017; NEWKOME et al., 1985; TOMALIA et al., 1985).

Há diversos tipos de dendrímeros com diferentes grupos terminais, a Figura 31 mostra os dendrímeros comumente usados na administração de fármacos, Figura 31B dendrímeros de poli (amidoamina) (PAMAM), Figura 31C poli (propilenimina) (PPI) e Figura 31D poli (L-lisina) (PLL) (HSU et al., 2017).

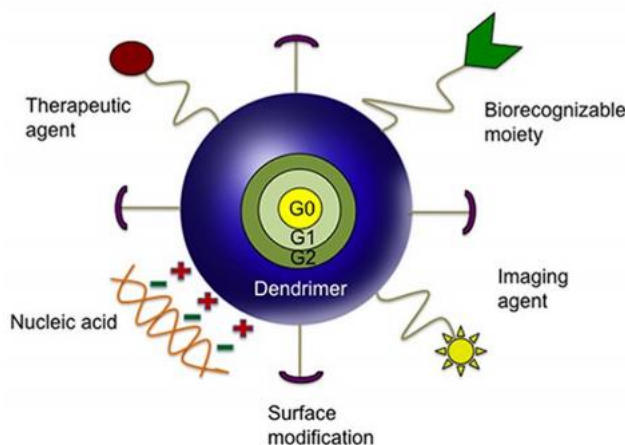
Figura 31 - A) Uma ilustração esquemática com os três componentes de uma molécula de dendrímero e estruturas químicas de B) dendrímeros de poli (amidoamina) (PAMAM), C) poli (propilenimina) (PPI) e D) poli (L-lisina) (PLL).



Fonte: Adaptado de (HSU et al., 2017).

Devido à sua síntese controlada, estes polímeros têm a vantagem única de ter polidispersibilidades muito baixas. Um dendrímero PAMAM de geração completa tem grupos amina primários na superfície ($pK_a = 6,85$) e grupos amina terciária dentro do núcleo ($pK_a = 3,86$). A alta densidade de grupos funcionais de superfície nos PAMAM apresenta-se como uma oportunidade de funcionalização destes polímeros com drogas, ácidos nucleicos e componentes de sistemas de imagem (Figura 32). Dendrímeros PAMAM de certas gerações e carga superficial pode permear a barreira epitelial do intestino, sugerindo seu potencial como carreadores de droga oral (SADEKAR AND GHANDEHARI 2012).

Figura 32 - Esquema de sistema de entrega baseado em dendrímero funcionalizado com agente terapêutico, unidade bioconhecível, agente de imagem, ácido nucleico e grupo modificador de superfície.



Fonte: SADEKAR AND GHANDEHARI 2012.

Estudos de toxicidade aguda e subcrônica de dendrímeros PAMAM catiônico (G3, G5 e G7), em camundongos swiss-webster, revelaram que a toxicidade aumenta com aumento da geração e densidade de carga superficial dos grupos amina. Foi observado maior acúmulo de G3 nos rins e G5 e G7 no pâncreas, porém não exibiam propriedades que impedissem seu uso em aplicações biológicas nas concentrações (ROBERTS et al., 1996). Em testes de Toxicidade em Embriões de Peixes zebra a carga dos grupos terminais dos dendrímeros catiônicos também pareceu ser a principal razão para a toxicidade *in-vitro* (BODEWEIN et al., 2016).

Neste trabalho, os dendrímeros PAMAM-NH₂, transportadores eficientes para ácidos nucleicos, devido à sua carga positiva em pH fisiológico (MÁRQUEZ-MIRANDA et al., 2016), foram os dendrímeros de escolha, como portadores dos compostos terapêuticos, dada a afinidade dos pontos quânticos por grupos aminas e a possibilidade de formar ligação covalente com carbonila terminais, função importante na construção dos eletrodos quimicamente modificados, etapa crítica do projeto.

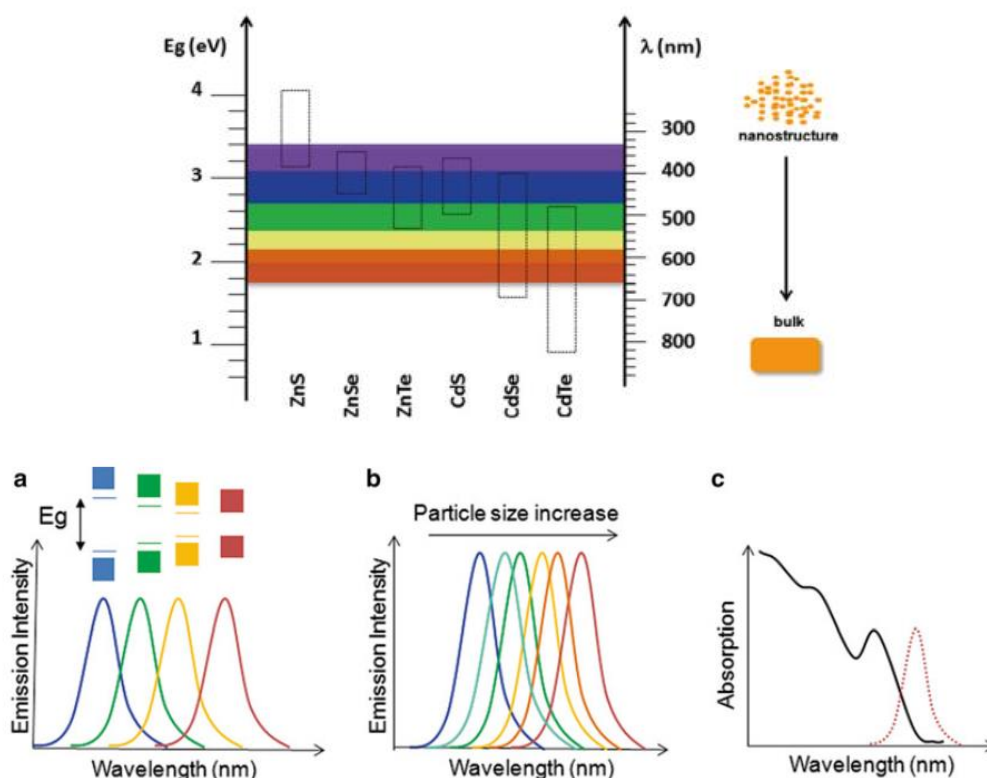
1.1.5 Pontos quânticos

Pontos quânticos (PQ's) semicondutores, são nanocristais que apresentam confinamento quântico em três dimensões. Essas dimensões devem ser maiores que o parâmetro de rede e menores ou iguais ao raio de Bohr do éxciton do

correspondente material *bulk* (macroscópico). Cada material apresenta uma massa efetiva dos seus portadores e conseqüentemente um dado raio de Bohr, assim, a depender do material têm-se diferentes faixas de tamanhos de nanocristais que apresentam propriedades de confinamento quântico, como mostra a Figura 33.

O tamanho muda a energia de confinamento que altera as propriedades ópticas do material, como absorção, índice de refração e bandas de emissão, o que confere propriedades piezoelétrica, optoeletrica, fotoquímica, magnética, e propriedades catalíticas (HUANG et al., 2008)(HUANG; ZHU, 2013). Deste modo, os diâmetros típicos PQ's variam de 2 a 10 nm e podem apresentar emissão à luz do ultravioleta ao infravermelho (Figura 33). Esta é uma consequência do nível de energia de discretização, bem como da energia de banda proibida (CESAR, 2014).

Figura 33 - Intervalo de energia de banda proibida de alguns pontos quânticos (II-VI) que variam de cristais manométricos para uma massa, com a sua respectiva região espectral. Abaixo: espectros que exibem algumas propriedades ópticas de pontos quânticos (a e b) banda proibida (E_g), dependência do tamanho da partícula e (c) a sua capacidade de multi-espectral de emissão.



Fonte: (CESAR, 2014).

Nos PQs core/shell o núcleo é o responsável pelas propriedades ópticas (região espectral de absorção eletrônica e fluorescência) e a casca é constituída por algumas monocamadas de um outro material semiconductor, é usada para passivar os defeitos da superfície do núcleo, com o objetivo de melhorar e a aumentar a intensidade de fluorescência e diminuir a largura de linha da banda de emissão. Normalmente, ambos núcleo e escudo são compostos por elementos dos grupos II B e VI A da tabela periódica (Figura 33). Os melhores exemplos são aplicados CdSe/ZnS, CdS/CdTe e ZnSe/ZnS PQ's (DABBOUSI et al., 1997; SANTOS, FARIAS, FONTES, 2008). Na interface biomédica, a aplicação de PQ's é baseada em fluorescência, que essencialmente transforma fótons em fótons de diferentes comprimentos de onda (CESAR, 2014).

Dada a complexidade do tema, faz-se necessário demonstrar, sucintamente, a teoria que fundamenta este material de alta relevância para aplicações químicas e biológicas.

1.1.5.1 Teoria envolvida

Os pontos quânticos constituem um caso particular da solução da Equação de Schrödinger (equação 8), conhecida como poço quadro finito de potencial (GRIFFITHS, 2011):

$$i\hbar \frac{\partial \psi}{\partial t} = -\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 \psi \quad \text{Equação 8}$$

Onde:

i é a unidade imaginária;

\hbar é a constante de Planck;

$\partial\psi/\partial t$ primeira derivada temporal da função de onda;

m é a massa;

$\nabla^2 \psi$ é a Laplaciana da função de onda

De acordo com as condições de contorno do sistema, o ponto quântico utilizado nos estudos deste trabalho, pode ser caracterizado pela solução da equação 9, uma evolução temporal (SILVA et al., 2013):

$$I(t) = I(0) \left[1 - \frac{\theta}{2} \tan^{-1} \left(\frac{2mV}{[(1+2m)^2 + V^2] \tau_c / 2t + 1 + 2m + V^2} \right) \right]^2 \quad \text{Equação 9}$$

Onde:

τ_c = constante térmica temporal característica

m = parâmetro do feixe

D = difundidade termal

V = é um parâmetro relacionado à distância confocal do feixe de prova. Ou seja $V = Z_t/Z_c$, onde Z_c é a distância confocal.

Os PQs podem ser divididos em classes nas quais os ultra pequenos (USPQs) são nanocristais com tamanhos extremamente pequenos, com fortes efeitos de confinamento quântico, em que a maioria dos seus átomos estão localizados na superfície. A grande quantidade de átomos na superfície e a presença de várias ligações pendentes, originam mudanças nas propriedades dos nanocristais, podendo ser observado nos espectros de fluorescência (MURRAY; KAGAN; BAWENDI, 2000).

Uma nova classe de PQs de CdSe, a de tamanhos mágicos (MSPQs) vem se apresentando promissora em estudos biológicos (SILVA et al 2014). Os MSPQs são nanocristais com tamanhos extremamente pequenos (< 2 nm) e que apresenta propriedades físicas completamente diferentes dos PQs tradicionais (CHEN et al., 2005). Algumas propriedades fundamentais colocam esses PQs em classes diferentes. As propriedades características dos MSPQs são as: estruturas termodinamicamente estáveis, o amplo intervalo de luminescência, a alta estabilidade do tamanho com o tempo, os espectros de absorção relativamente estreitos.

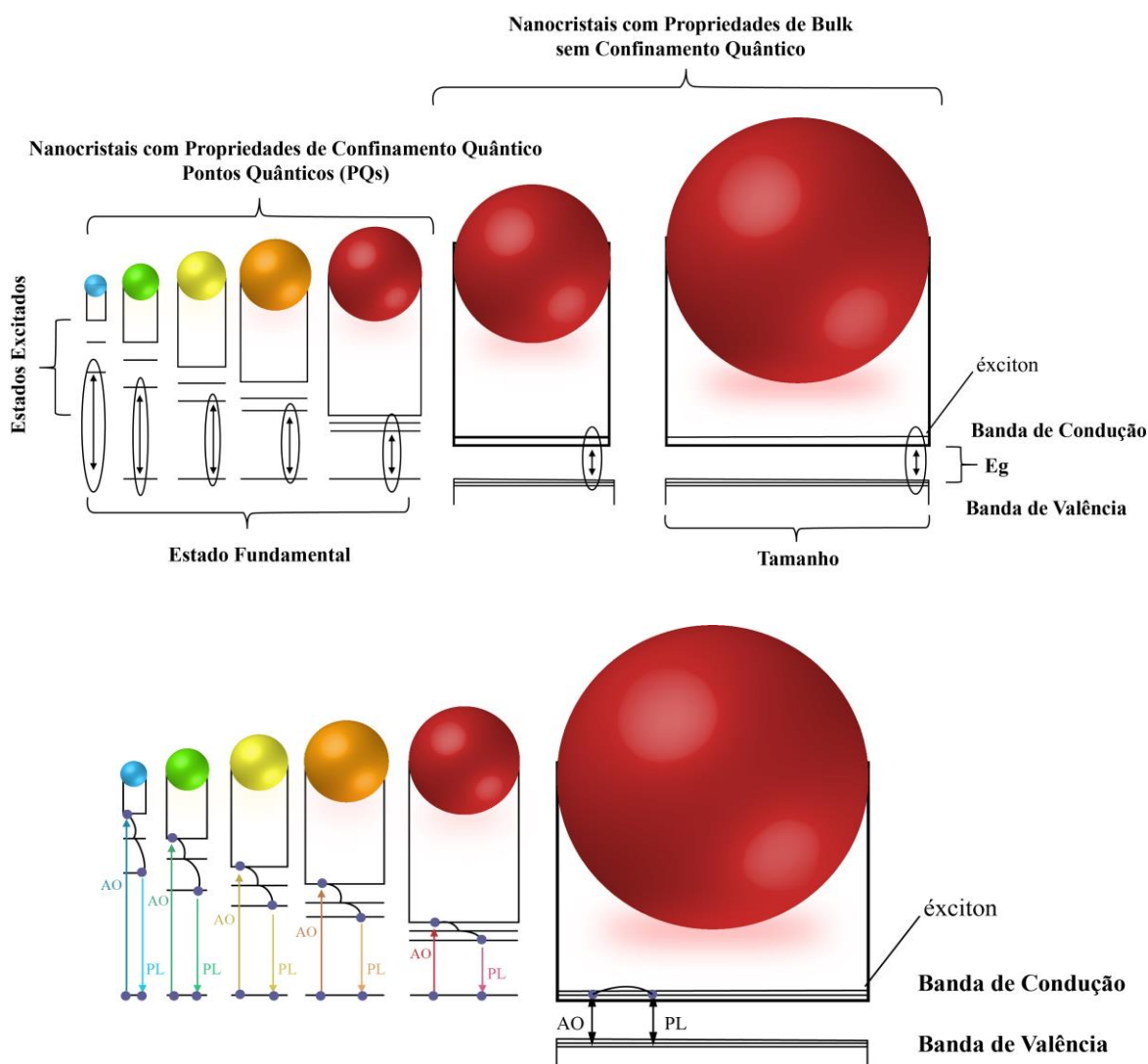
O termo tamanho mágico está relacionado a um número (mágico) de átomos na estrutura que faz com que os PQs sejam extremamente estáveis. O espectro de luminescência largo ocorre devido aos MSPQs terem defeitos atômicos internos (ausência ou presença extra de átomos) (ANIELLE, 2014; SILVA et al 2014).

1.1.5.1.1 Mas porque o Ponto Quântico fluoresce?

Através do processo conhecido como “transição interbandas”, os átomos, moléculas ou materiais semicondutores e isolantes podem emitir luz de forma espontânea quando o elétron realiza a transição da banda de condução para a banda de valência (materiais isolantes e semicondutores) ou do estado excitado para o fundamental (átomos ou moléculas).

O processo de luminescência é constituído de três passos: excitação (criação do par elétron-buraco por uma fonte externa), termalização (elétrons e buracos relaxam para o fundo da banda de condução e de valência, respectivamente) e recombinação (elétrons e buracos se recombinaem produzindo a emissão de fótons). A Figura 34 ilustra o processo de absorção de fótons, para a criação do par elétron-buraco, seguido da termalização, que posiciona os portadores nas extremidades das bandas e da recombinação radiativa, na qual ocorre a emissão de fótons em nanocristais com propriedades de bulk e de confinamento quântico. Vê-se também que o tamanho dos PQs é inversamente proporcional a energia de transição entre as bandas de energia.

Figura 34 - Esquema representativo da variação da energia do éxciton em função do tamanho para nanocristais com propriedades de confinamento quântico e de bulk, e abaixo sobre o processo de absorção (AO) e emissão (PL).



Fonte: adaptado de (SILVA, 2014a).

Um dos principais problemas para usar com sucesso os pontos quânticos como novas sondas ópticas em sistemas biológicos é garantir a qualidade e a eficiência do processo de conjugação com proteínas e outras biomoléculas específicas e ultimamente as análises de interação em conjunto com os sistemas biológicos. Uma má conjugação acarreta numa aplicação sem sucesso. Por esta razão, a caracterização e avaliação da bioconjugação dos PQ's é necessário, independentemente das abordagens físico-químicas aplicadas conjugação. Nas últimas décadas diferentes métodos para caracterizar PQ's bioconjugados foram

relatados. No entanto, a falta de padronização para interpretar os resultados, e utilização de equipamentos caros, e/ou metodologias laboriosas representam desvantagens comuns aos métodos correntes (JUNIOR et al., 2014).

1.1.6 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

As técnicas eletroquímicas mais usuais estudam o comportamento de um sistema quando submetido a uma determinada perturbação, seja pela variação de potencial ou aplicação de uma corrente controlada. A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) estuda-se a resposta do sistema em equilíbrio quando submetido a variação de potencial na forma de uma onda senoidal de baixa amplitude, descrita conforme a equação 10. Para cada frequência de oscilação aplicada têm-se uma resposta de corrente, conforme a equação 11, que é convertida pela lei de Ohm na grandeza chamada impedância, equação 12:

$$E(t) = A \cos(2\pi ft) = A \cos \omega t \quad \text{Equação 10}$$

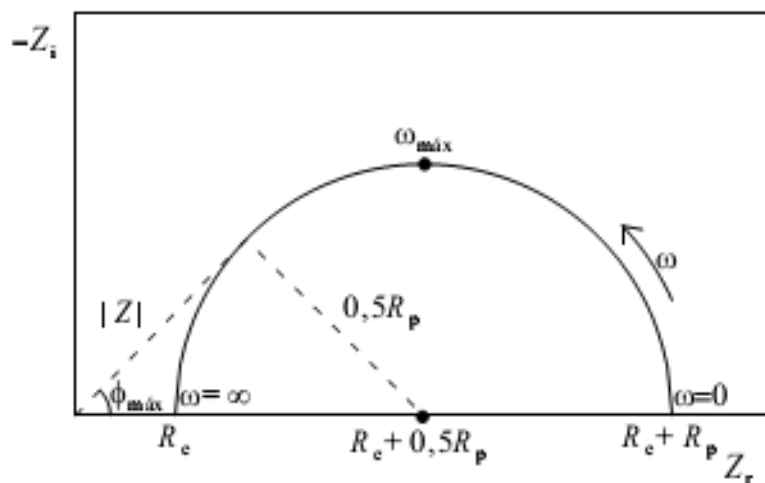
$$I(t) = B \text{Sen}(\omega t + \varphi) \quad \text{Equação 11}$$

$$Z = \frac{E(t)}{I(t)} = \frac{A \cos \omega t}{B \text{Sen}(\omega t + \varphi)} \quad \text{Equação 12}$$

A impedância Z é um número complexo que representa a resistência em um sistema de corrente alternada. As modulações de potencial e corrente em diferentes frequências (ω) fornecem informações acerca dos processos na interface eletrodo-solução como mecanismos de difusão, adsorção, porosidade e espessura de filmes dentre outras. A EIE é uma técnica não destrutiva de estado estacionário, sendo assim, é de fundamental importância que o princípio de linearidade dentro do intervalo de potencial escolhido seja respeitado.

A representação gráfica mais comum relaciona as componentes real e imaginária da impedância, respectivamente Z_r e Z_i , conhecida como diagrama de Nyquist que também é conhecido como representação de Argand ou Cole-Cole. Tal diagrama é caracterizado pela presença de arcos de semicírculos conforme o mostrado na Figura 35.

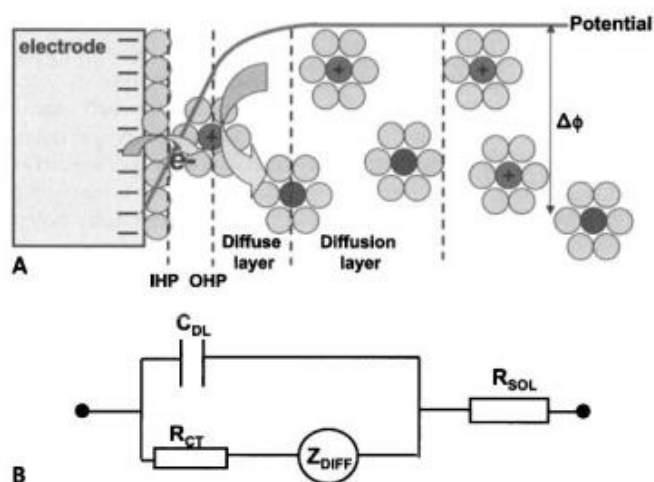
Figura 35 - O Diagrama de Nyquist.



Fonte: WOLYNEC, 2003.

A impedância do transporte de massa reflete a quantidade de espécies transportadas para o local da reação a partir do volume do eletrólito e a quantidade de reagentes transportado do eletrodo para a solução. O transporte geral em massa ocorre pela migração e convecção na solução em massa e pela migração, convecção e difusão na camada de difusão. A impedância de difusão relevante é tipicamente vista na faixa de frequência mais baixa do espectro de impedância. Um esquema simplificado assume que toda a diferença de potencial ocorre através da camada dupla compacta, onde ocorrem as reações de transferência de carga e adsorção (Figura 36A). A representação "completa" do circuito de Randles pode ser aplicada para descrever este sistema, com a capacitância de dupla camada CDL sendo colocada em paralelo com o processo Faradaico representado por uma série de impedâncias de transferência de carga e difusão $R_{CT} - Z_{DIFF}$ (Figura 36B). O eletrólito de suporte elimina essencialmente a contribuição migratória para a transferência de massa "puramente difusiva" de espécies eletroativas, diminui a resistência à solução de volume impulsionada pela migração e comprime a camada dupla. Essa situação resulta na estrutura convencional de Randles para um sistema com $Z_{DIFF} - R_{CT}$ para espécies eletroativas fornecidas por difusão e C_{DL} desenvolvido como resultado dos íons de suporte (principalmente) em migração em série com R_{SOL} (LVOVICH, 2012).

Figura 36 - A) Reação eletroquímica interfacial, com componentes de difusão e dupla camada; B) Circuito elétrico representativo correspondente.



Fonte: LVOVICH, 2012.

EIS é uma ferramenta poderosa no estudo dos fenômenos de interface entre eletrodo e solução, particularmente modificação de superfície, tendo em vista que o processo de modificação pode aumentar ou diminuir a resistência à transferência de carga. Assim, esta técnica foi utilizada no trabalho como alternativa para caracterização da modificação química proposta nos eletrodos de ouro.

1.1.7 Interação com DNA

O DNA foi identificado como o principal alvo para fármacos anticâncer, considerado um dos receptores biológicos mais promissores para o desenvolvimento de agentes quimioterapêuticos, onde, ao alterar a conformação do DNA, inibem a duplicação ou transcrição (LI et al., 2012). Dentre os fármacos anticancerígenos comuns em terapia clínica, estão os fármacos que podem inserir ou intercalar entre os pares de bases do DNA e inibir a síntese de ácidos nucleicos (TORIGOI et al., 2002).

Existem vários tipos de interações associadas com os ligantes de DNA. Estas incluem intercalação, ligação não covalente às fendas, ligação covalente/ligação cruzada, quebra de DNA, e incorporação de nucleosídeo (ERDEM et al., 2008). De modo geral, há duas classes de agentes de ligação não-covalentes com DNA que foram identificadas, os intercaladores e os ligantes de fenda, os quais podem

apresentar interações moleculares do tipo hidrofóbicas, iônica, ligações de hidrogênio, ou van der Waals. Os intercaladores se ligam por meio da inserção de um cromóforo aromático planar entre os pares de bases adjacentes do DNA, onde a interação ocorre entre os sistemas π -elétron da molécula e os anéis heterocíclicos dos pares de base; ao passo que ligantes de fenda encaixam-se na fenda menor do DNA, causando menor perturbação conformacional ou da estrutura primária do DNA (RESCIFINA et al., 2014).

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

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

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

1.1.7.1 *Técnicas de investigação*

Há diversas técnicas para a investigação da capacidade de um composto interagir com o DNA. A exemplo, alterações na absorção no UV-Vis e mais conclusivamente, estudos de desnaturação térmica, onde os compostos que se associam fisicamente com o DNA aumentam a temperatura do ponto médio de desnaturação (T_m) (SUH; CHAIRES, 1995; MARTINEZ et al., 2005). Compostos fluorescentes podem ter deslocamento no comprimento de onda, e/ou aumento ou redução das emissões de fluorescência quando ligados ao DNA. O brometo de etídio, intercalador, sonda fluorescente, está associado a metodologias de competição pelo sítio de ligação ao DNA. FTIR é frequentemente usada para caracterizar a natureza da interação e para monitorar os efeitos de vários fármacos sobre a estrutura do DNA. (NEAULT et al., 1996).

Medições de viscosidade são úteis para processos com intercaladores, pois este provoca o desenrolamento e o alongamento do DNA, aumentando a viscosidade da solução. Porém, limita-se a compostos solúveis em meio aquoso (PILCH et al., 1993). Já o dicroísmo circular é uma forma de espectroscopia que faz uso da absorção diferenciada da luz polarizada no sentido horário ou no sentido anti-horário, pode distinguir simultaneamente entre os modos intercalante e de ligação ao sulco (PALCHAUDHURI; HERGENROTHER, 2007).

O uso de modelos biológicos experimentais *in vitro*, que mimetizam o ambiente biológico também são muito empregados nos estudos de interação com DNA, como o teste do cometa, que avalia a extensão da quebra ao DNA após exposição de linfócitos a substâncias suspeitas de potencial genotóxico.

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

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Síntese, caracterização e aplicação de nanocarreadores (ciclodextrinas e dendrímeros) à compostos naturais, visando a melhora na solubilidade e a associação à pontos quânticos visando o monitoramento da terapêutica e/ou diagnóstico.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar o processo de interação entre os agentes encapsulantes e as moléculas bioativas, via eletroquímica através de eletrodos modificados e/ou em solução e por espectroscopia no UV-vis e fluorescência;

Determinar constantes de interação pelas técnicas utilizadas;

Sintetizar e caracterizar sistemas de carregamento e liberação controlada por dendrímeros sem e com pontos quânticos.

Construir e caracterizar as plataformas híbridas nanoestruturada com ponto quântico e o carreador de escolha.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Produtos químicos e solventes

O Pontos quânticos de seleneto de cádmio (CdSe/CdS) foi sintetizado e gentilmente cedido pelo Laboratório de novos materiais nanoestruturados e funcionais do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas (SILVA et al., 2013).

Todos os reagentes químicos utilizados nas análises e listados na Tabela 6 foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas em água grau Milli-Q (18 MΩ cm).

Tabela 6 - Lista de reagentes com o laboratório de aquisição.

| REAGENTES | AQUISIÇÃO |
|---|-------------------------------|
| PAMAN G0-G3 kit (20% m/v em metanol) | Sigma Aldrich |
| Usnic acid | |
| β-Lapachona | |
| Hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etil-carbodiimida (EDC) | |
| N-hidroxisuccinamida (NHS) | |
| Mangiferina | |
| Ácido ferrocenocarboxílico (Fc-CO ₂ H) | |
| NaAuCl ₄ | |
| Polivinilpirrolidina (PVP) | Fluka [®] Analytical |
| Ferricianeto de potássio (K ₃ [Fe(CN) ₆]) | Êxodo [®] |
| Ferrocianeto de potássio (K ₄ [Fe(CN) ₆]) | |
| Ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) | Merck (Germany) |
| <i>Extran</i> MA01 alcalino | |
| Hidrocloreto de 2-aminoetanotiol (AET) | TCI américa.- U.S.A. |
| Ácido acético (HOAc) | Cromoline [®] |
| Etanol P.A. | Panreac [®] |
| Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄) | |
| Acetato de sódio (NaOAc) | Vetec Química Fina Ltda |
| Fosfato de sódio diidratado (Na ₂ HPO ₄) | (Rio de Janeiro, BR) |
| Fosfato de sódio monoidratado (NaH ₂ PO ₄) | |
| Hidróxido de potássio (KOH) | |
| Metanol | |

Fonte: Autora, 2018.

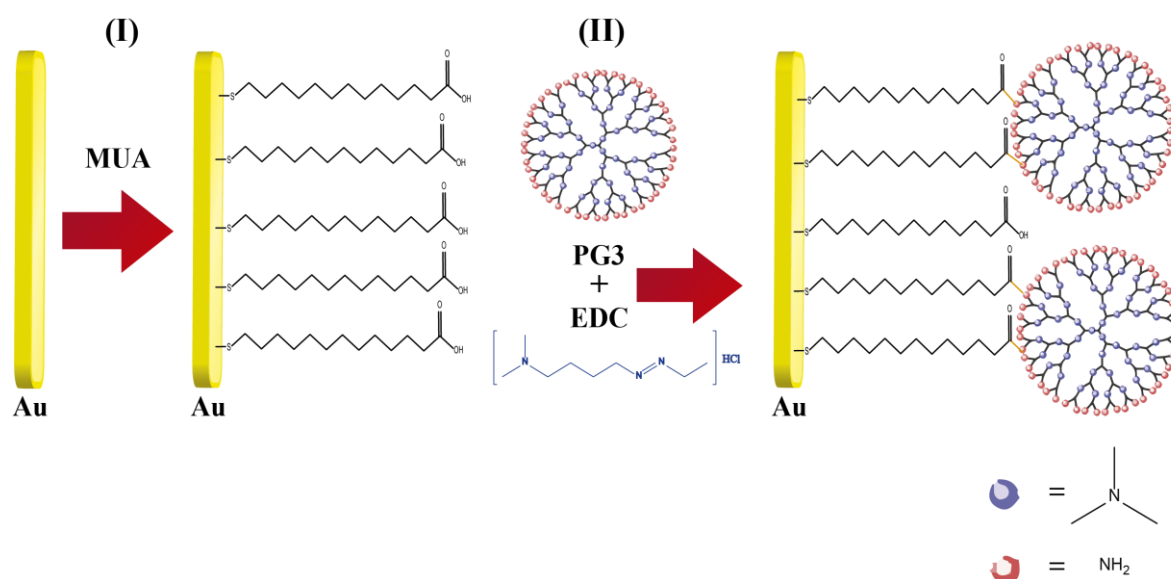
3.2 Estudos eletroquímicos

Todas as condições iniciais de leitura eletroquímica já foram descritas no tópico 3.3.1. do capítulo anterior.

3.2.1 Eletrodo de Ouro Modificado com SAM de MUA + PAMAM

Para o preparo da SAM o eletrodo limpo foi imerso em solução etanólica de MUA à $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ por 1h, a 37°C , lavado com etanol e em seguida imerso em solução etanólica de PAMAM $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com EDC $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ por mais 12h (BUSTOS et al., 2008; WU; LIN; WANG, 2009). Ao fim do processo, o eletrodo apresenta uma plataforma de acordo com a Figura 37, antes de realizar as análises é lavado com metanol, para remover o excesso adsorvido, porém não ligado.

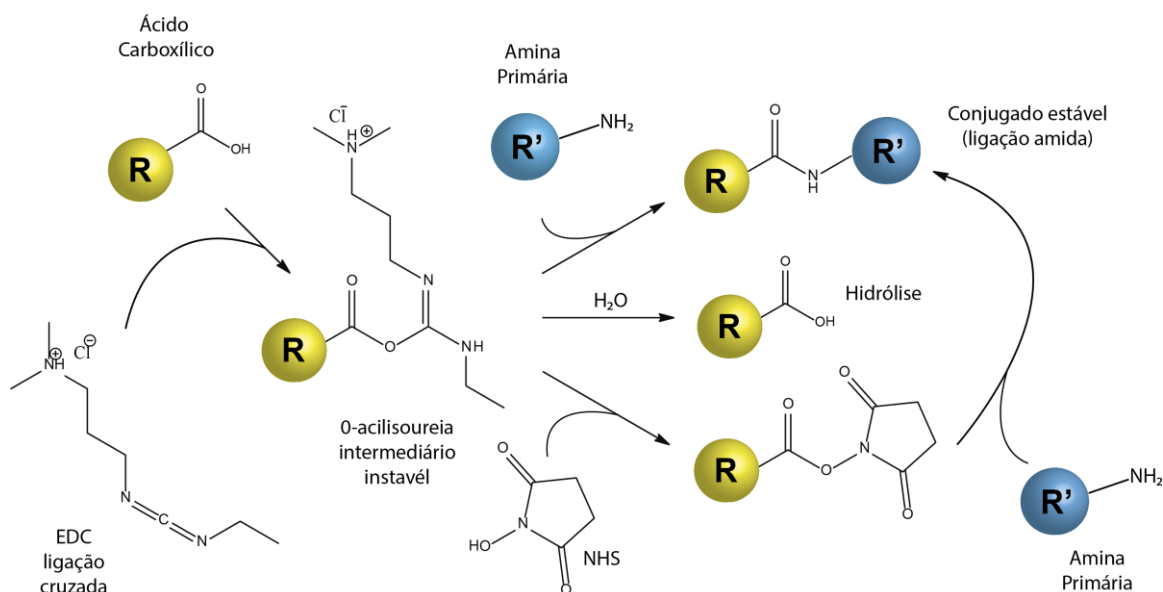
Figura 37 - Esquema do processo usado para preparar SAM no ouro. Etapa I: modificação da superfície do ouro com tiol para formar Au / SAM; Etapa II: funcionalização da Superfícies de ouro tiolada para produzir Au / SAM / PGn, n= 1, 2, 3.



Fonte: Adaptado de Bustos et al., 2008.

Na etapa de construção do eletrodo modificado com PAMAM, o uso concomitante de NHS junto com EDC, também foi testado, com melhores resultados de imobilização, sendo este o apresentado no trabalho. A adição deste, aumenta a eficiência e habilita a molécula com o grupo carboxila (Figura 38) formar um conjugado estável por ligação amida. A ativação por NHS é a base para síntese de aminas reativas, rotulagem de reagentes e ligação cruzada.

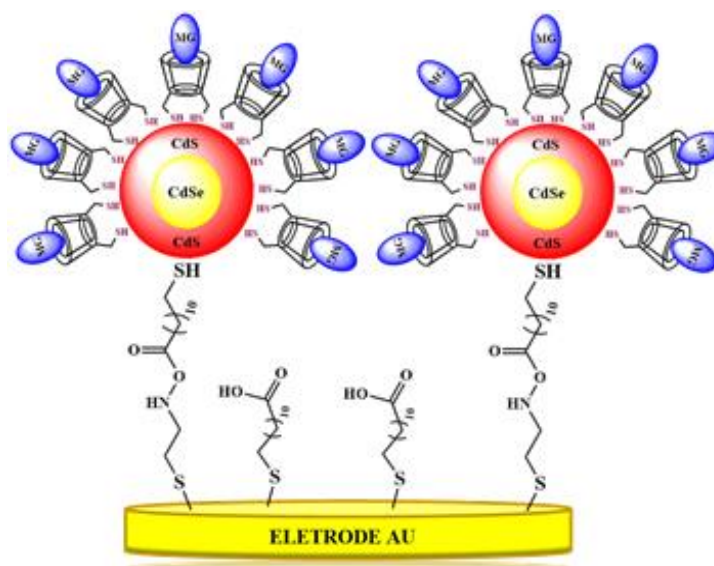
Figura 38 - Esquema de reação cruzada usando EDC e NHS, hidrólise após EDC e ligação amida seguida de EDC.



3.2.2 Eletrodo de Ouro Modificado com PQ's CdSe/CdS e β -CDSH

No processo de modificação, o eletrodo de ouro foi imerso em uma solução de 1:1 mg/mL de aminoetanotiol, dissolvido em etanol, por 1 hora, em seguida imerso em uma solução 1:1 mg/mL de MUA e EDC em etanol, por 1h e, em seguida foi adicionado 5 μ L de CdSe/CdS (0,038 mol L⁻¹) à superfície por 1,5 horas e, por fim, imerso em uma solução de β -CDSH por 1 hora. Após cada etapa de modificação o eletrodo foi lavado com etanol e água, com a montagem descrita obtendo-se uma plataforma conforme ilustrada na Figura 39 (DE LIMA FRANCA et al., 2016; FERREIRA, 2009). No estudo, a montagem da SAM se deu pela ligação do grupo tiol do AET ao eletrodo de ouro e o grupamento amina fica exposto, então com a adição de MUA o grupo carboxila se ligou ao grupamento amino deixando o tiol da MUA exposto aos PQ's que se liga por afinidade ao grupo. Os PQ's também fazem ligação com -NH₂, porém segundo estudos do grupo a resposta eletroquímica sugere menor eficácia de imobilização dos PQs estudados e optou-se por não o reproduzir (HUANG et al., 2013).

Figura 39 - Esquema representando o eletrodo de ouro modificado com SAM de AET/MUA/PQ's/ β -CDSH.



Fonte: (DE LIMA FRANCA et al., 2016).

3.2.3 Microbalanço Eletroquímico de Cristal de Quartzo (MECQ)

Para o estudo foi replicado o sensor de PAMAMG3 e monitorado por MECQ (FERREIRA, 2013). Inicialmente foi observada a frequência de oscilação do cristal de quartzo no mesmo solvente da modificação, metanol. Em seguida, uma solução $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de MUA em metanol, foi colocada na cela da microbalança, cuidadosamente desaerada com Ar e isolada. A formação desta monocamada foi acompanhada pelo tempo de 3 h; ao fim, foi retirada e cuidadosamente lavada com metanol, sendo obtida a SAM de MUA. Em seguida, uma solução contendo $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de PAMAM-G3 e $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$ de EDC e NHS em metanol permaneceu na cela por 3h.

Com o cristal modificado um novo procedimento foi realizado. Em tampão fosfato pH 7,0, 5% etanol, o analito foi adicionado ao meio para investigar o efeito da. A interação da substância de interesse biológico com o PAMAM-G3 foi monitorada através da variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo a cada 10 min uma nova leitura, sem aplicação de potencial. Todos os experimentos foram realizados em temperatura de $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

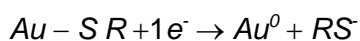
3.2.4 Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)

Os estágios de construção do eletrodo de ouro modificado com PAMAM foram monitorados por medições de VC e EIE. As medições eletroquímicas foram realizadas, em um primeiro momento, utilizando 5 mL de solução tampão de MES 50 mmol L⁻¹, experimentos posteriormente optou-se pelo uso da solução tampão de fosfato (PBS, 10 mmol L⁻¹ pH 7,4) ambos contendo 2,5 mmol L⁻¹ [Fe (CN) 6]³⁻ (1:1) do par redox e 5 mmol L⁻¹ KCl usado como eletrólito de suporte, usando um sistema eletroquímico com três eletrodos. As medidas de VC foram realizadas a uma taxa de varredura de 50 mV s⁻¹ de 0,6 a - 0,3 V. As medidas de EIE foram realizadas em potencial de circuito aberto (OCP) “open circuit potential”, valor variável a depender da solução eletrolítica, aplicando-se uma amplitude de potencial de 5,0 mV com intervalo de frequência na faixa de 10⁵ a 10⁻¹ Hz (DE LIMA FRANCA et al., 2016; WU; LIN; WANG, 2009). Todas as medidas foram realizadas a uma temperatura ambiente, aproximadamente 25 °C.

3.2.5 Dessorção redutiva de tióis

Objetivando comprovar a formação da monocamada auto-organizada sobre o eletrodo de ouro, foi registrado o voltamograma por VC da dessorção para estimar a quantidade de tióis adsorvidos na superfície do ouro. A dessorção eletroquímica foi realizada em solução de KOH 0,5 mol L⁻¹, variando o potencial de 0,1 V a -1,2 V com velocidade de 0,05 V.s⁻¹. Monocamadas de alcanotióis de cadeias alquílicas longas como do mercaptoundecanóico (11-MUA) apresentam E_{pc} de dessorção próximos ou maiores do que -1,0 V, porém monocamadas de cadeia curta como o AET apresentam E_{pc} de dessorção menores do que -1,0 V vs Ag|AgCl (SANTOS et al., 2015). No presente trabalho verificou-se potencial de -0,93 V para MUA e -0,86 V para o AET.

O pico de redução observado relaciona-se à redução do tiol adsorvido, representado pela seguinte semi-reação equação 13: (ROJAS et al., 1995; BOLLO et al., 2003).



Equação 13

onde RS é um alceno tiol (MUA ou AET). Esse comportamento constitui uma forte evidência do rompimento da ligação RS-Au, e pode ser utilizado para o cálculo do excesso superficial da camada de AET na superfície do cristal de ouro utilizando a equação 14 (CANCINO, 2008):

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA} \quad \text{Equação 14}$$

sendo, Γ o excesso superficial (mol cm^{-2}), Q representa a carga medida em C (Coulomb), obtida pela integração do pico catódico de dessorção, multiplicado pelo inverso da velocidade de varredura, n o número de elétrons, F é a constante de Faraday de 96.500 C que corresponde ao número de Avogadro multiplicado pela carga do elétron e A é a área eletroativa do eletrodo de ouro (cm^2), um dos eletrodos de ouro utilizados apresenta 1,6 mm de diâmetro, resultando em $0,020 \text{ cm}^2$, para este foi possível calcular o excesso superficial. Assumindo que uma camada de MUA bem organizada apresenta um recobrimento superficial de ($\Gamma_{\text{MUA,m}}$) de $1,2 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$, o processo de imobilização foi bem sucedido, apresentando uma monocamada de MUA na superfície do eletrodo de Ouro com uma razão ($\Gamma_{\text{MUA}} / \Gamma_{\text{MUA,m}}$) 0,82 (BUSTOS et al., 2008). Quando o eletrodo foi modificado com AET, este apresentou um Γ_{AET} de $9,8 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$.

3.3 Estudos de espectrofotometria no UV-vis

Os espectros no UV-vis foram registrados em um espectrofotômetro NanoDrop de arranjo de diodos Hewlett-Packard 8453A, utilizando uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm.

3.3.1 Medidas da constante de interação com PAMAM

As medidas da absorvência foram realizadas em 10 mmol L^{-1} de tampão fosfato pH 7,4, com 10% de etanol, mantendo a concentração da amostra constante ($25 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), enquanto variava a concentração do dendrímero (10 a $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), sob agitação de 200 rpm. Supôs-se que a ligação é independente e que a interação entre o ligante e o PAMAM é 1:1 formando um único complexo (SL) e que a Lei de Beer é seguida por todas as espécies. (ABDERREZAK et al., 2012). Assim as constantes de ligação foram calculadas de acordo com a equação abaixo:

$$\frac{b}{\Delta A} = \frac{1}{S_t K_b \Delta \epsilon_{SL} [L]} + \frac{1}{S_t \Delta \epsilon_{SL}} \quad \text{Equação 15}$$

Onde b é o comprimento do caminho de luz, $\Delta A = A - A_0$ para as absorvências do ligante livre e ligado, S_t é a concentração do PAMAM livre mais complexo e $[L]$ do ligante não-complexado e, finalmente, $\Delta \epsilon_{SL} = \epsilon_{SL} - \epsilon_S - \epsilon_L$ (ϵ_L é a absorvência molar do ligante).

Assim, o gráfico duplo recíproco de $1/\Delta A$ versus $1/[L]$ é linear e a constante de ligação pode ser estimada a partir da seguinte equação:

$$K_b = \frac{\text{intercepto}}{\text{inclinação}} \quad \text{Equação 16}$$

Para contribuir ainda mais para a elucidação do tipo de interação entre os compostos e PAMAM, os parâmetros termodinâmicos foram calculados. O plot de $\ln K_b$ versus $1/T$ permite a determinação de ΔH e ΔS , obtidos a partir de coeficiente angular e linear, respectivamente, utilizando a equação de Van't Hoff (equação 17):

$$\ln K_b = \frac{-\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{Equação 17}$$

Onde R é a constante dos gases ($8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) e T é a temperatura absoluta. Foram utilizadas três temperaturas diferentes de 298, 304 e 310 K. Se a temperatura não variar significativamente, a mudança de entalpia pode ser considerada como uma constante. Com base nas constantes de ligação obtidas a diferentes temperaturas, a energia livre de Gibbs (ΔG) do complexo de interação com PAMAM pode ser estimada pelas seguintes equações:

$$\Delta G = -RT \ln K = \Delta H - T \Delta S \quad \text{Equação 18}$$

3.3.2 Determinação da concentração de pontos quânticos CdSe/CdS

A quantidade necessária de precursores de Cd^{2+} e S^{2-} , para o crescimento de cada monocamada de CdS sobre a superfície das nanopartículas de CdSe pode ser determinada com base no tamanho do núcleo e da espessura da casca desejada. O PQ objeto de estudo apresenta tamanho médio de 2,4 nm obtido por protocolo químico a base de água e 1-tioglicerol como estabilizante (SILVA et al. 2014).

É também necessário o conhecimento da concentração de núcleos de CdSe presentes na solução, esta pode ser obtida através dos dados de UV-Vis aplicando-se a lei de Lambert-Beer descrita pela equação 19.

$$A = \varepsilon \cdot C \cdot l \quad \text{Equação 19}$$

Onde:

A é o valor de absorvência correspondente ao valor máximo da banda de absorção.

ε é a absortividade molar do material ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

C é a concentração de nanocristais presente na solução (mol L^{-1}).

l é o caminho óptico da cubeta (cm).

Como o tamanho dos nanocristais está diretamente relacionada ao primeiro pico de excitação presente no espectro de absorção, o coeficiente de extinção molar ε (que também depende do tamanho dos nanocristais) também pode ser determinado através de equações empíricas (YU et al., 2003). Para nanocristais de CdSe a relação entre o tamanho do nanocristal e ε está descrita na equação 20

$$\varepsilon = 5857 \times (D)^{2,65} \quad \text{Equação 20}$$

Onde D é o diâmetro dos nanocristais obtido pela equação 21:

$$\text{CdSe: } D = (1,6122 \times 10^{-9})\lambda^4 - (2,6575 \times 10^{-6})\lambda^3 + (1,6242 \times 10^{-3})\lambda^2 - (0,4277)\lambda + (41,57) \quad \text{Equação 21}$$

Onde λ é o comprimento de onda do primeiro pico de absorção, o qual representa o máximo de absorção.

De acordo com Yu e colaboradores (2003), a concentração da casca também pode ser determinada, entretanto, esta não foi levada em consideração dado o grau menor da equação polinomial em relação ao núcleo, tendo-se que o comprimento de onda é fixo (equação 22 e 23):

$$\varepsilon = 21536 \times (D)^{2,3} \quad \text{Equação 22}$$

$$\text{CdS: } D = (-6,6521 \times 10^{-8})\lambda^3 + (1,9557 \times 10^{-4})\lambda^2 - (9,2352 \times 10^{-2})\lambda + (13,29) \quad \text{Equação 23}$$

3.3.3 Caracterização dos eletrodos de ITO modificados com PQ's e PAMAM

Os eletrodos transparentes ITO (*índium Tin Oxide*, 8-10 Ω , área 1,6 cm², Delta Technologies) foram primeiramente limpos por imersão em uma solução 10 % de *Extran* MA01 alcalino e mantidos na solução por 30 minutos. Em seguida, os eletrodos foram lavados com água destilada e deixados imersos em água destilada por mais 30 minutos. Logo após, foram imersos em isopropanol e mantidos por mais 10 minutos, depois secos ao ar. Após a secagem, foi utilizado um multímetro para identificar a superfície condutora do eletrodo, que foi delimitada em uma área de 1,6 cm² (2 cm x 0,8 cm), usando uma fita adesiva. Os eletrodos foram então armazenados em dessecador a vácuo.

As etapas de modificação do eletrodo de CdSe/CdS conjugado com PAMAM foram reproduzidas e acompanhadas no ITO, tanto por UV-vis como por VC em ferri/ferrocianeto de potássio. Onde o branco para ajuste de linha de base dos espectros foi o ITO antes das modificações químicas.

3.3.3.1 Eletrodeposição de nanocristais de Au

Um filme de nano Au foi eletrodepositado na superfície do ITO por cronoamperometria com aplicação de potencial em -0,3 V por 150 s, de em solução de ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹ (WANG et al., 2009).

3.4 Medidas de fluorescência

Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos do espectrofotômetro RF-5301PC (Shimadzu, Japão).

O espectro gerado seguiu os parâmetros de leitura de emissão na faixa de 280 à 350, com $\lambda_{ex.} = 260$ nm, para o ácido tânico e faixa de 450 à 650, com $\lambda_{ex.} = 355$ nm, para o quantum dot CdSe/CdS, ambos os estudos titulando ciclodextrina em TA, PAMAM e CDSH ao PQ em água destilada, antes de cada leitura foi estabelecido um tempo de 15 minutos sob agitação com barra magnética.

Uma análise quantitativa do potencial de interação entre MGF e o PAMAMG3 foi realizada por titulação fluorimétrica. O espectro gerado seguiu os parâmetros de leitura de emissão na faixa de 450 à 650, com $\lambda_{ex.} = 365$ nm

Os cálculos das constantes foram baseados nos dados de fluorescência para $\lambda_{em.} = 530$ nm à 25 °C, a constante de extinção de Stern-Volmer, K_{SV} , foi obtida usando a clássica equação de Stern-Volmer, equação abaixo:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad \text{Equação 24}$$

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

Os valores da constante de ligação K_a e o número de sítios de ligação n foram calculados usando a equação de Scatchard, equação abaixo:

$$\text{Log} \frac{F_0 - F}{F} = \text{Log} K_a + n \text{Log}[Q] \quad \text{Equação 25}$$

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

3.5 Preparo dos complexos

Os dados de metodologia utilizados para formação dos complexos entre os analitos estudados e os carreadores estão descrito na Tabela 7.

Tabela 7 - Dados metodológicos para obtenção do complexo entre o composto e nanocarreador.

| Composto | Carreador | Proporção | Solvente | Tempo |
|--------------|--------------------------------------|-------------------|------------------|-------|
| Ácido úsnico | PAMAM G ₂ -G ₃ | 1:n*; 1:20 e 1:40 | 1ª Etapa:Metanol | 24h |
| Mangiferina | PAMAM G ₂ -G ₃ | 1:n*; 1:20 e 1:40 | 2ª Etapa:Água | 24h |

n*: número de aminas terminais da respectiva geração.

As suspensões e soluções foram mantidas sob agitação de 175 rpm à 25°C e protegidas da luz em uma incubadora Marconi MA-420 (São Paulo, Brasil) o tempo total de realização dos experimentos contou com duas etapas de 24h, tempo

necessário para atingir o equilíbrio da reação de complexação. Após a evaporação do metanol da mistura reacional, o precipitado foi resuspenso em água e ao fim da agitação o material não complexado foi removido por filtração utilizando filtros de acetato de celulose 0,2 μm (Minisart, Sartorius Stedin). O filtrado foi liofilizado e as amostras foram mantidas em dessecador sob vácuo (FERREIRA, 2013a; FERREIRA et al., 2013b; DEVARAKONDA et al., 2007).

3.6 Estudos com CT-DNA

Os estudos eletroquímicos com CT-DNA (Calf Thymus-DNA) foram realizados em solução de tampão acetato (pH 4,5, força iônica 1,0 mol L⁻¹) preparados com acetato de sódio (NaAcO) e ácido acético (HAcO), dissolvidos em água purificada. Experimentos voltamétricos com o biossensor de dsDNA e ssDNA em solução foram realizados em meio misto aquoso, tampão acetato pH 4,5 e 20% álcool etílico P.A.

3.6.1 Preparo e aplicação do biossensor de dsDNA

Para a produção do gel de dsDNA, um eppendorf com 12 mg de dsDNA para 1 mL de tampão acetato pH 4,5 foi deixado na geladeira entre 2 à 8°C, por 48 h para homogeneização e evitar degradação pelo calor. O eletrodo de carbono vítreo devidamente limpo foi submetido a análise de área eletroativa em solução de ferri/ferrocianeto de potássio, conforme parâmetros anteriores. Para cada novo biofilme fez-se esse procedimento, devendo o eletrodo manter o mesmo perfil de voltamograma. Fez-se cinco varreduras com condicionamento de 120 s sem aplicação de potencial por VPD nos potenciais de 0,0 à 1,4 V, $v = 5,0 \text{ mV s}^{-1}$ e amplitude de 0,05 V; valores também usados para os estudos eletroquímicos com DNA, etapa justificada pela geração de cargas positivas na superfície do eletrodo, o que favorece as respostas do biossensor pela interação destas com os grupos fosfatos do DNA que apresentam natureza negativa (DE ABREU et al., 2008).

São adicionados 10 μL do gel de dsDNA sobre a superfície do eletrodo de CV limpo e seco sob fluxo de argônio (Ar) antes da realização dos experimentos. O eletrodo modificado é imerso em 5 mL de tampão a 20% de etanol, sendo este o branco. Um novo eletrodo de dsDNA foi confeccionado, seguindo-se os mesmos procedimentos e posto em contato com a substância a ser avaliada a uma

concentração pré-determinada. Antes das análises voltamétricas, o eletrodo é deixado em contato com a solução por 10 min, sem agitação.

3.6.2 Emprego de dsDNA em solução

A partir de uma alíquota do gel de dsDNA e tampão Tris-HCl 0,1 mol L⁻¹ a concentração da solução estoque de dsDNA, por nucleotídeos, é determinada via UV-vis pela leitura de absorvência a 260 nm e utilização do coeficiente de extinção molar de 6.600 L mol⁻¹cm⁻¹, para CT-DNA (MAHLER et al., 1964) com posterior aplicação da lei de Lambert-Beer, equação 19 (KANAKIS et al., 2009).

As razões entre as absorvências em 260 e 280 nm (A₂₆₀/A₂₈₀) do espectro de DNA foram calculadas antes de iniciar os estudos, sendo um indicativo de DNA livre de contaminação por proteína os que apresentam valores entre 1,80 e 1,9. O mesmo para 260 e 230 nm (A₂₆₀/A₂₃₀) razão que permite avaliar se o DNA está livre de contaminantes, como sais e compostos orgânicos, devendo apresentar razão inferior à 2 (HEGDE et al., 2012; LUIS, 2011). Em todo o estudo, o DNA utilizado estava dentro da margem de pureza, isento de contaminação.

A constante de ligação K do complexo composto-DNA foi calculada espectrofotometricamente aplicando uma adaptação da equação de Benesi-Hildebrand para a banda II, 260nm, equação 9, a mesma utilizada para os estudos com PAMAM índice 3.3.1 (AGARWAL et al., 2013).

A substância foi mantida a concentração constante e submetida à adições de dsDNA para avaliar a $\Delta I/pa$. O tratamento quantitativo da dependência da corrente de pico relativa a concentração de DNA determina o valor da constante de ligação de acordo com a equação modificada de Benesi-Hildebrand, assumindo a formação do complexo na estequiometria 1:1, equação 26:

$$\frac{1}{I_{MGF-DNA} - I_{MGF}} = \frac{1}{\Delta I} + \frac{1}{K[MGF]_0 \Delta I [DNA]_0} \quad \text{Equação 26}$$

Onde I_{MGF} é a corrente de pico da oxidação da molécula MGF, e $I_{MGF-DNA}$ é a corrente de pico do complexo. $[MGF]_0$ e $[DNA]_0$ são as concentrações iniciais dos componentes. A constante é obtida pelo plot de $(1/ I_{MGF-DNA} - I_{MGF})$ versus $(1/[DNA])$

3.6.3 Preparo e aplicação do ssDNA

Para a obtenção do ssDNA um tubo com tampa contendo 1 mL de HCl 1,0 mol L⁻¹ e 3 mg de CT-DNA permaneceu 1h em banho-maria a 100 °C. Imediatamente após, adicionou-se 1 mL de NaOH 1,0 mol L⁻¹, para neutralizar, e em um balão de 10 mL, o volume foi completado com tampão acetato pH 4,5 (DE VASCONCELLOS et al., 2016).

O ssDNA em solução tampão acetato com 20% etanol é o branco, exibindo os resíduos das bases guanina e adenina, quando realizados ensaios de VPD, nos mesmos parâmetros do item anterior. A esta solução foi adicionado o analito, deixado em contato por 10 min.

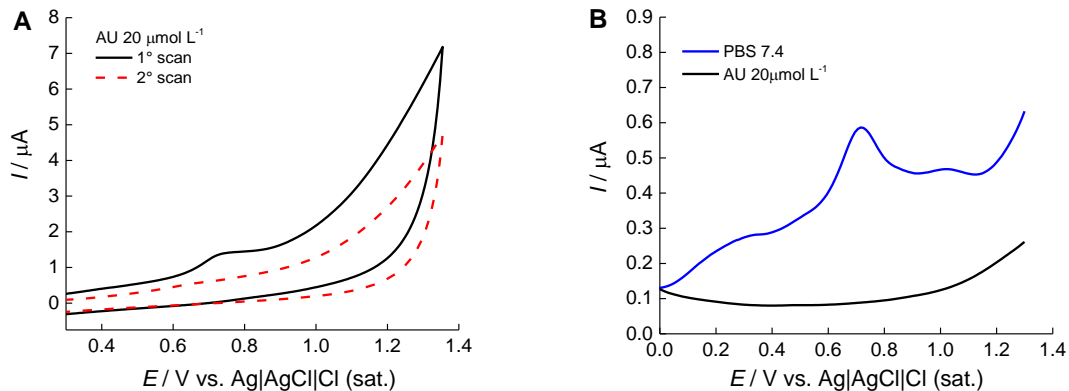
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo da interação de compostos bioativos com plataformas contendo ciclodextrinas

4.1.1 EQM de ouro com MUA/CDSH

O comportamento eletroquímico do AU em eletrodo de carbono vítreo foi verificado em tampão fosfato 7,4, por VC a 50 mV s^{-1} (Figura 40A) e VPD a 5 mV s^{-1} (Figura 40B). Os voltamogramas cíclicos mostraram apenas um pico anódico, mas não foram observados picos de redução. A oxidação é devido aos grupos hidroxilo ligados a anéis aromáticos. O processo é irreversível e segue diferentes caminhos de oxidação de acordo com o pH da solução de eletrólito (JORGE et al., 2010)

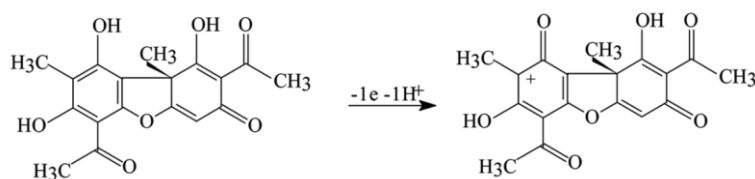
Figura 40 - UA $20 \mu\text{mol L}^{-1}$, 10% etanol, PBS pH 7,4 A) Voltamograma cíclico, $v= 50 \text{ mV s}^{-1}$. B) Voltamograma de pulso diferencial, $v= 5 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autora, 2018

O voltamograma de VPD exhibe o que seria 3 sinais bem definidos em pH ácido, em torno de 3,5. O mecanismo de oxidação do AU está representado na Figura 41. O segundo pico de oxidação, o principal, está relacionado com o grupo hidroxilo do carbono 10. No entanto, a oxidação eletroquímica da UA é dependente do pH em um processo irreversível de um elétron e um próton e ocorre nos três grupos hidroxilo na molécula, correspondendo à posição 1, pico 1, posição 10, pico 2 e posição 8, pico 3.

Figura 41 - Mecanismo de oxidação do ácido úsnico.

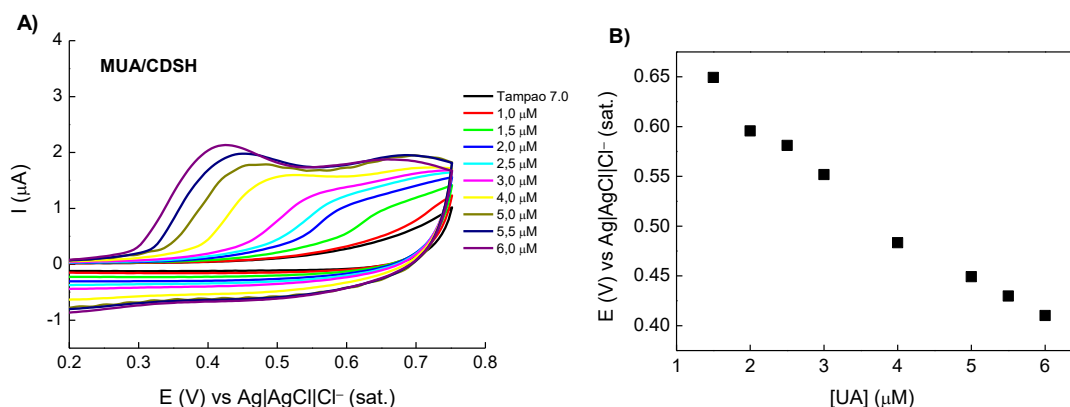


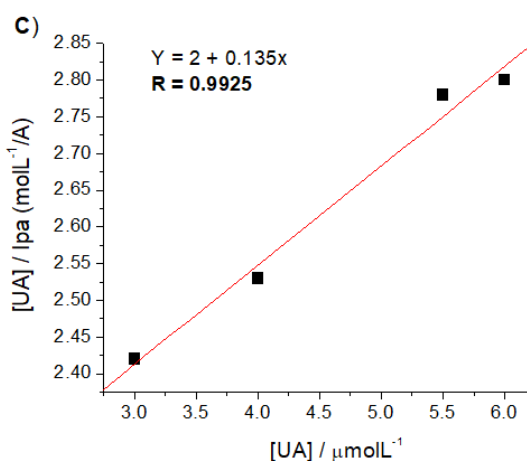
Fonte: Autora, 2018

Inicialmente foi proposto avaliar o perfil do ácido úsnico em eletrodo modificado com CDSH, visto que já estudos bem descritivos sobre o complexo formado e perfil em solução, porém, não há relatos do carreados imobilizado numa plataforma.

Assim, na Figura 42A o voltamograma exibi uma onda de oxidação com potencial variando para valores menos positivos e um sinal de oxidação parcial em 0,7 V, comprometido pela limitada janela de potencial do eletrodo de ouro, o qual oxida em 0,8 V. A Ipa é crescente com a variação da concentração de UA. Entretanto, na faixa de concentração estudada não foi possível construir uma curva com bom coeficiente de correlação, devido ao potencial variável, Figura 42B. Apesar disso, pode-se observar maior intensidade de corrente e presença do primeiro sinal de oxidação (0,4 V) que antes só era observado em VPD.

Figura 42 - A) Voltamograma de VC para o eletrodo de ouro com SAM de CDSH e UA em solução de 1,0 - 6,0 mmol L⁻¹. B) Gráfico da variação do potencial em função da concentração. C) Regressão linear da razão entre a concentração de UA e a Ipa em função da concentração de UA. Tampão fosfato 7,0, 5% etanol, v=50 mV.





Fonte: Autora, 2018.

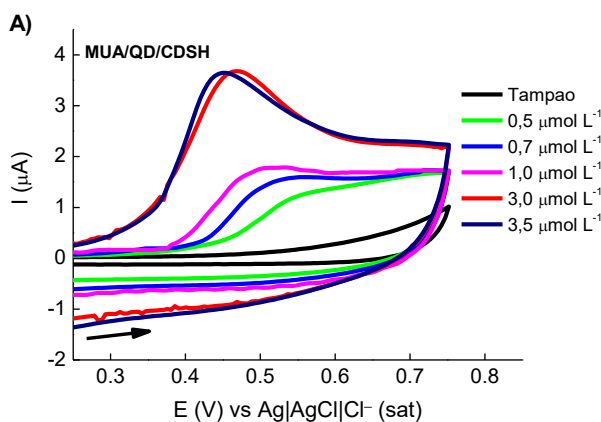
Com isso, é possível inferir que este primeiro sinal é influenciado pelo processo de encapsulação com a CD, onde além de facilitar a oxidação, comprovada pelas I_{pa} , também possibilitou um estudo com variação de concentração, uma alternativa para moléculas que adsorvem em carbono vítreo. Sendo possível determinar a constante de interação a partir da regressão linear da Figura 42C, aplicando a equação 5 da seção 1, que apresentou o valor de $6,75 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}$, mostrando boa interação entre o ácido úsnico e a monocamada de ciclodextrina tiolada.

4.1.2 EQM de ouro com AET/MUA/PQ/CDSH

A fim de comprovar os benefícios do uso de PQs, uma nova imobilização foi proposta e agora as CDSH estão ligadas a uma camada de MSPQs de CdSe/CdS que por sua vez está ligado a uma cadeia de alceno tiol a superfície de ouro do eletrodo.

Ao comparar o voltamograma na Figura 43 com o da Figura 42A é notória a definição do sinal de oxidação, bem como os valores mais altos de I_{pa} , como observado em um estudo similar. França (2016) ao comparar o eletrodo de CDSH com PQs/CDSH pode calcular a constante de interação que foi duas vezes mais alta para plataforma contendo o PQ, dada a melhor resposta de corrente. Entretanto, este apresentou saturação em baixas concentrações que pode estar diretamente ligado a área do eletrodo utilizado 1,6 mm menor que os convencionais 3 mm e os tempos de modificação, fazendo-se necessário estudos complementares de monitoramento do tempo de modificação e recobrimento de superfície.

Figura 43 - Voltamograma cíclico do UA em solução de 1,0 - 6,0 mmol L⁻¹ em eletrodo de ouro com SAM de CDSH. Tampão fosfato 7,0, 5% etanol, $v=5$ mV.



Fonte: Autora, 2018.

4.2 Estudo da interação de compostos naturais com PAMAMs no UV-vis

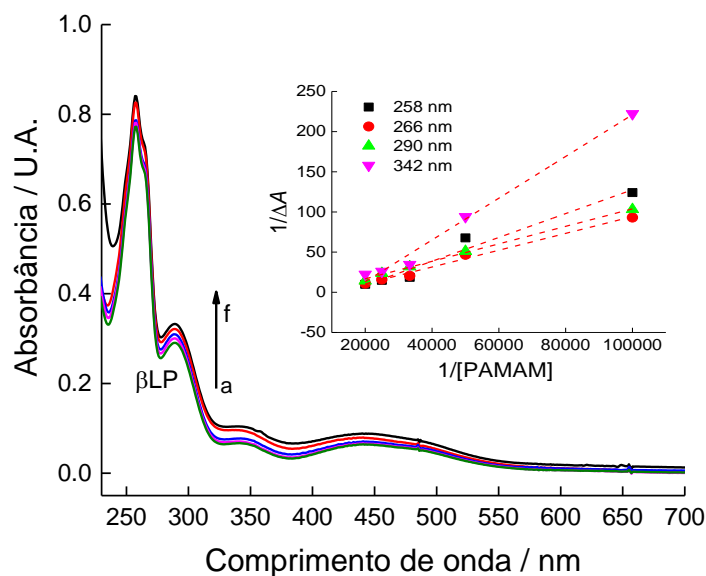
Nos últimos anos, grande atenção tem sido dada no transporte de drogas através de dendrímeros, uma vez que estes polímeros contêm vários domínios de ligações para complexação de diferentes tipos de drogas (ABDERREZAK et al., 2012).

De um modo geral, a formação do complexo pode resultar em mudanças nos espectros no visível ou no ultravioleta. Alguns compostos orgânicos, como fármacos que sejam parcialmente insolúveis em água, apresentam um aumento da solubilidade nesse solvente na presença do dendrímero. Isto se deve ao fato de se formar um complexo entre o fármaco e o dendrímero. A complexação diminui a atividade termodinâmica do fármaco dissolvido. Conseqüentemente, mais fármaco dissolve-se até que a atividade do fármaco livre, que está em equilíbrio químico com o complexo, torna-se igual à atividade termodinâmica da droga como sólido puro (MONTANARI et al., 1998).

Relatamos um estudo espectroscópico UV-vis de quatro tipos diferentes de dendrímeros de poli (amidoamina). Os resultados indicam que o grau de protonação das aminas terciárias interiores destes dendrímeros se correlaciona diretamente com uma banda de absorção com λ_{max} na faixa de 280-285 nm. Especificamente, a pH baixo, as aminas terciárias são protonadas e a banda de 280-285 nm está ausente. No entanto, a pH elevado, quando estes grupos são desprotonados, esta banda aparece (PANDE; CROOKS, 2011).

A Figura 44 mostra o espectro de absorção no UV-vis da β -LP com variação da concentração de PAMAM de 2ª geração a volume constante, nesse estudo foi acompanhada as bandas de absorção da β -LP a três temperaturas diferentes. As interações entre a molécula e os dendrímeros de diferentes gerações são demonstradas pela regressão linear (Figura 45) a partir da equação descrita na metodologia ítem 3.3.1.

Figura 44 - Espectro no UV-vis da β -LP ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$) em ausência e presença de PAMAM-G2 ($10 - 50 \mu\text{mol L}^{-1}$). Inserção: regressão linear $1/\Delta A$ vs $1/[\text{PAMAM}]$, no λ de 258, 266, 290, 342 nm.

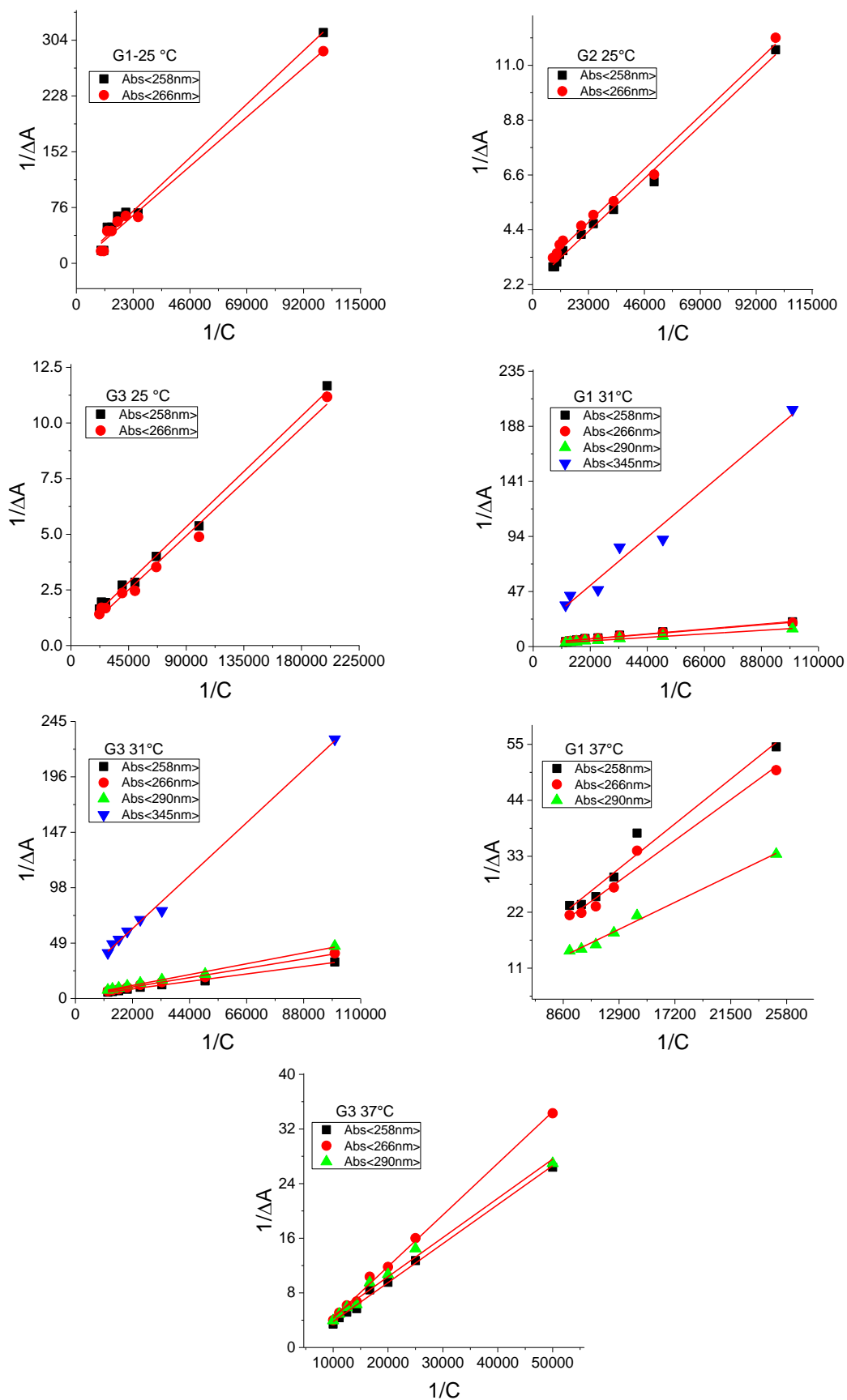


Fonte: Autora, 2018.

Podemos evidenciar um efeito hipercrômico no espectro da Figura 44 que se deve a interação da β -LP com o PAMAM de 2ª geração, outras gerações também foram testadas, com comportamento similar, porém dentro da variação de concentração escolhida essa foi a geração que apresentou maiores valores de constante de interação com o dendrímeros, os valores de constante e coeficiente de correlação estão listados na Tabela 8. Quando comparados a uma mesma temperatura, as gerações de dendrímeros mostram um padrão diferentes influências no hiperchromismo das bandas da β -LP, mas de um modo geral a 1ª geração tem uma menor influência sobre a variação das bandas de absorção da β -LP. O PAMAM

apresenta duas bandas de absorção uma próxima de 220 nm e a outra em 275 nm, esta última de baixíssima absorção, assim as bandas utilizadas para os cálculos não tiveram contribuição direta da absorção de PAMAM, ao normalizar as absorvências com uma curva de calibração para o respectivo PAMAM, os valores de ΔA entre β -LP livre e complexada não se mostraram significativos, permanecendo o efeito hipercrômico, evidência de formação de complexo, onde este (β -LP: PAMAM) exibe um coeficiente de absorvidade molar maior que a β -LP livre.

Figura 45 - Regressão linear $1/\Delta A$ vs $1/[PAMAM]$, nas temperaturas de 25, 31 e 37 °C.



Fonte: Autora, 2018.

Tabela 8 - Dados de constante de ligação, coeficiente de correlação e parâmetros termodinâmicos da relação entre PAMAM (10 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) de várias gerações e β -LP (25 $\mu\text{mol L}^{-1}$) por estudo no UV-vis.

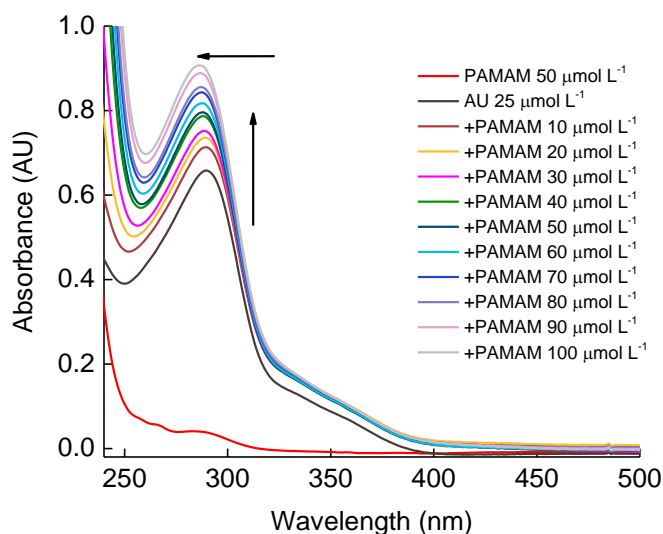
| Temperatura (K) | Dendrímero | λ (nm) | K_b (L mol^{-1}) | R | ΔG (kJ/mol) |
|-----------------|------------|----------------|-------------------------------|--------|---------------------|
| 298 | PAMAM-G1 | 258 | $6,9 \times 10^2$ | 0,994 | -16.20 |
| | | 266 | $5,8 \times 10^2$ | 0,993 | -15.76 |
| | PAMAM-G2 | 258 | $2,4 \times 10^4$ | 0,996 | -24.99 |
| | | 266 | $2,7 \times 10^4$ | 0,995 | -25.28 |
| | PAMAM-G3 | 258 | $6,3 \times 10^3$ | 0,997 | -21.67 |
| | | 266 | $1,5 \times 10^3$ | 0,995 | -18.12 |
| 304 | PAMAM-G1 | 258 | $1,35 \times 10^3$ | 0,9953 | -18.22 |
| | | 266 | $1,33 \times 10^4$ | 0,9957 | -24 |
| | | 290 | $1,34 \times 10^4$ | 0,9967 | -24.02 |
| | | 345 | $1,0 \times 10^3$ | 0,9884 | -17.46 |
| | PAMAM-G3 | 258 | $6,4 \times 10^3$ | 0,9978 | -22.15 |
| | | 266 | $5,28 \times 10^3$ | 0,9976 | -21.66 |
| | | 290 | $4,64 \times 10^3$ | 0,9946 | -21.34 |
| | | 345 | $7,5 \times 10^3$ | 0,9998 | -22.55 |
| | | 258 | 2×10^3 | 0,84 | -19.59 |
| | | 266 | $5,96 \times 10^2$ | 0,986 | -16.47 |
| 310 | PAMAM-G1 | 290 | $2,1 \times 10^3$ | 0,996 | -19.71 |
| | | 258 | $3,35 \times 10^3$ | 0,998 | -20.92 |
| | | 266 | $4,3 \times 10^3$ | 0,998 | -21.56 |
| | PAMAM-G3 | 290 | $1,2 \times 10^3$ | 0,994 | -18.27 |

Fonte: Autora, 2018.

Os processos de interação com β -LP se apresentam como uma reação espontânea, com ΔG negativo entre os valores de -15,8 a -25,3 KJ mol^{-1} . Outros dados termodinâmicos podem ser extraídos do estudo como ΔH e ΔS para elucidar as forças que regem essa interação.

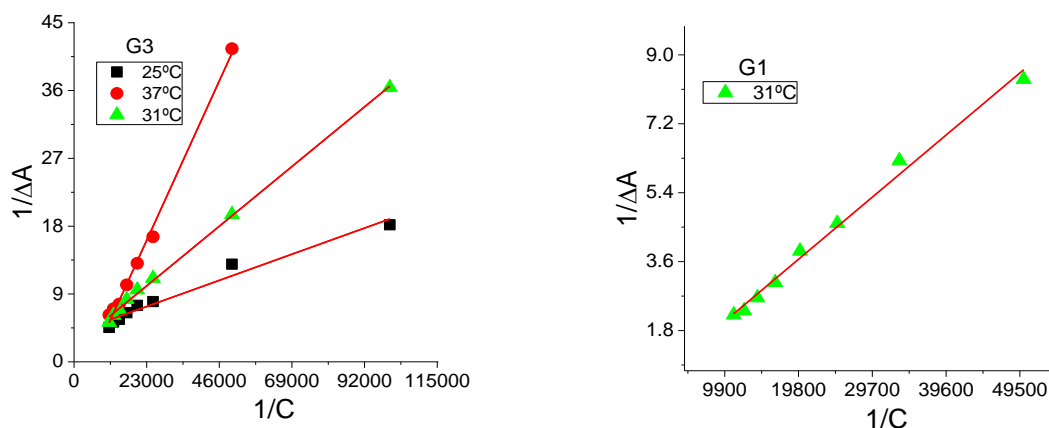
O processo de interação avaliado por espectrofotometria para o ácido úsnico se mostrou similar ao da β -LP, acrescido de deslocamento hipsocrômico observado em função do aumento da concentração de PAMAM no meio, conforme Figura 44. Também foram calculadas as constantes de interação ente o AU e os PAMAMs de geração 1 e 3 (Tabela 9), pois para a geração 0 vemos comportamentos distintos (figura 30) nas temperaturas estudadas, que impossibilitaram a construção de uma curva, isto se deve, em parte, por se tratar de uma molécula muito pequena, apresentando majoritariamente processo de interação por afinidade de moléculas e não o encapsulamento com formação de complexo de fato. A partir das constantes calculadas a energia de Gibbs pode ser estimada estando entre $-19,8$ e $-25,17$ KJ mol^{-1} demonstrando a espontaneidade da reação de complexação envolvida.

Figura 46 - Espectro no UV-vis do UA ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$) em ausência e presença de PAMAM-G3 ($10 - 100 \mu\text{mol L}^{-1}$) no λ de 290 nm, a 25°C .



Fonte: Autora, 2018.

Figura 47 - Regressão linear $1/\Delta A$ vs $1/[PAMAM]$, para as gerações 1 e 3 nas temperaturas de 25, 31 e 37 °C.



Fonte: Autora, 2018.

Tabela 9 - Dados de constante de ligação, coeficiente de correlação e parâmetros termodinâmicos da relação entre PAMAMG1 e G3 (10 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e ácido úsnico (25 $\mu\text{mol L}^{-1}$) ($\lambda = 290 \text{ nm}$) por estudo no UV-vis.

| Temperatura (K) | Dendrímero | K_b (L mol^{-1}) | R | ΔG (kJ/mol) |
|-----------------|------------|-------------------------------|--------|---------------------|
| 298 | PAMAM-G3 | $2,58 \times 10^4$ | 0,984 | -25.17 |
| 304 | PAMAM-G1 | $2,55 \times 10^3$ | 0,9958 | -19.8 |
| | PAMAM-G3 | $6,3 \times 10^3$ | 0,9992 | -22.1 |
| 310 | PAMAM-G3 | $5,4 \times 10^3$ | 0,9978 | -22.15 |

Fonte: Autora, 2018.

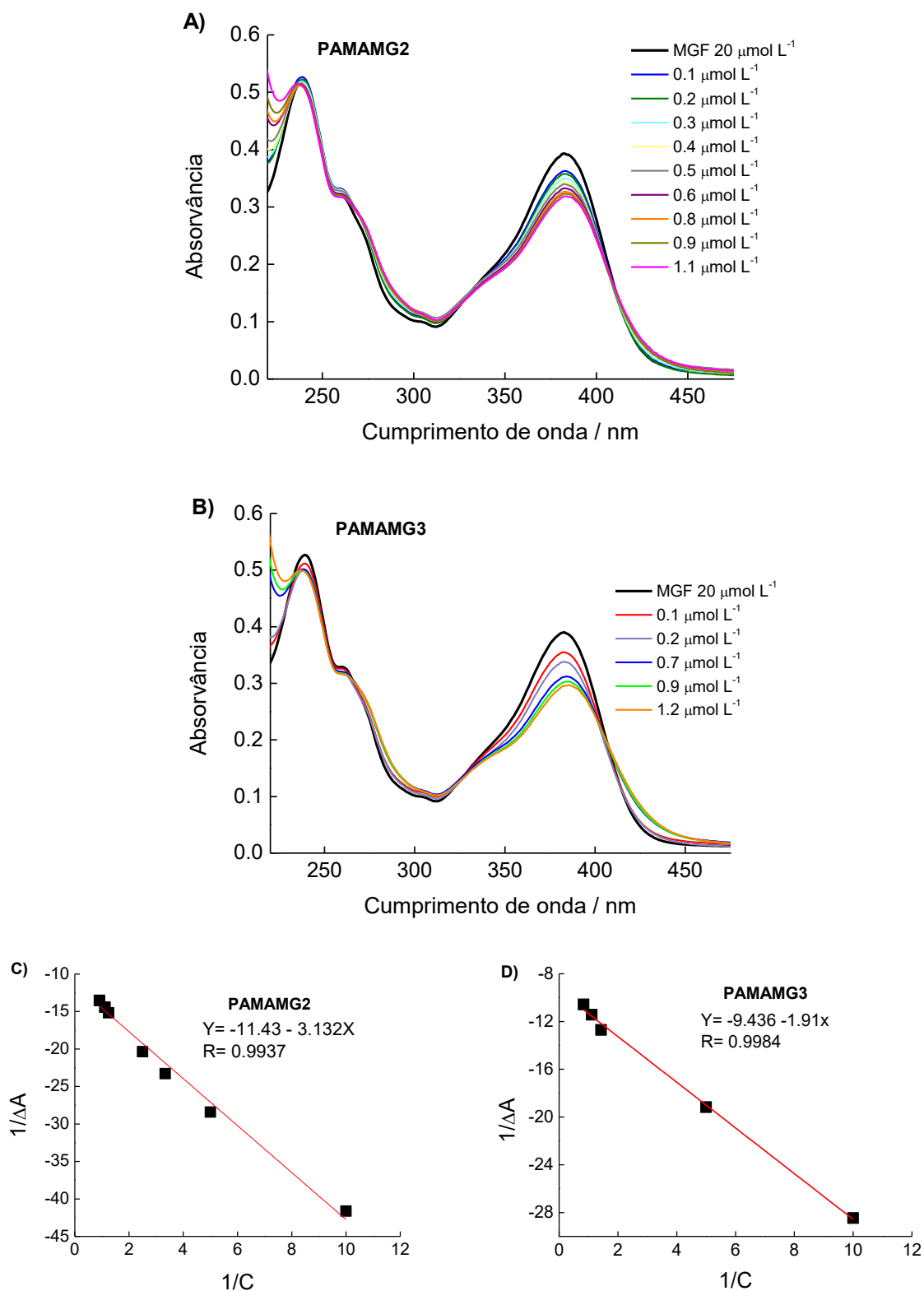
A mangiferina em solução apresenta características intrínsecas da molécula que fez com que durante a realização dos experimentos mostrasse mais de um processo de interação com PAMAM, hora absorvência era suprimida hora aumentava, sendo testadas diversas faixas de concentração.

A faixa de concentração de PAMAM utilizada para o estudo foi de 100 a 10 vezes menor que a de MGF e nesta pode se observar efeito hipsocrômico da banda da MGF a 382 nm com pequeno deslocamento batocrômico mais acentuado em G3, com $\Delta\lambda$ de 5nm (Figura 50). Estes como mencionado anteriormente são indicativos de interação e formação de complexo. Aliado a essas evidências o monitoramento da

absorção é realizado na banda da MGF num comprimento de onda onde não há contribuição da absorção de PAMAM (Anexo II) e este tem sua absorção quase que majoritariamente na região em torno de 200 nm.

Os valores das constantes de ligação foram calculados a partir da equação da reta dos gráficos da Figura 48. Para PAMAMG2 $K = 3,65 \times 10^6$ e G3 a $K = 5 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$, que indicam forte interação entre o carreador e o agente encapsulante.

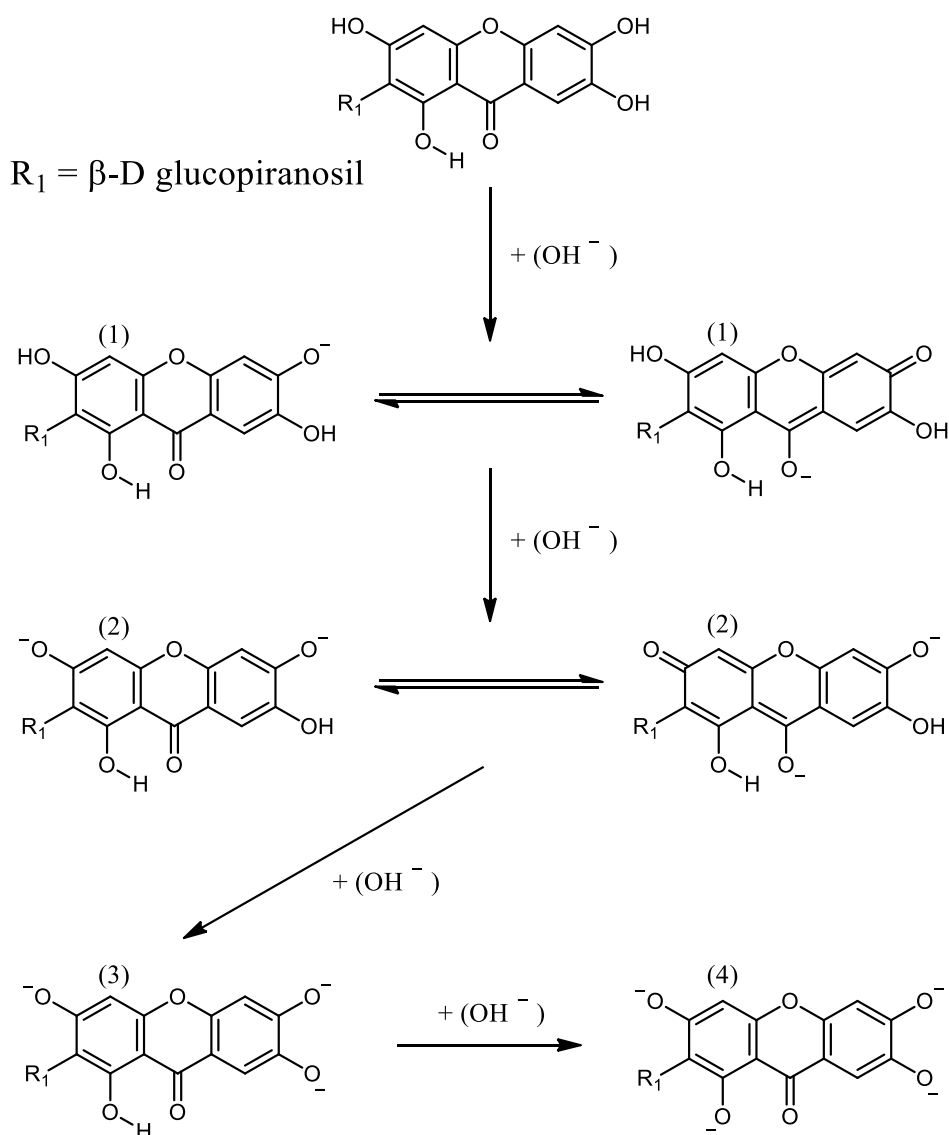
Figura 48 - Espectros no UV-vis do MGF ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) em ausência e presença de 0,1 – 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ PAMAMG2 A) G3 B) no λ de 382 nm, a 25 °C. Regressão linear de $1/\Delta A$ vs $1/[PAMAM]$ C) Para geração 2 e D) para geração 3.



Fonte: Autora, 2018.

Levando-se em consideração que a mangiferina apresenta quatro valores de pK_a (Figura 49) (Tabela 10) e que a densidade de carga pode afetar o processo de encapsulação, nas condições do experimento a MGF apresenta carga negativa, decorrente de uma desprotonação, como o PAMAM tem carga positiva, esse é outro fator que pode ter contribuído e justificar o alto valor da constante de ligação.

Figura 49 - Modelo químico para as atribuições dos quatro pK_a da MGF.



Fonte: GOMEZ-ZALETA et al., 2006.

Tabela 10 - Valores de pKa da Mangiferina e formas de equilíbrio correspondente.

| Equilíbrio | pKa |
|-------------------------------------|----------------------------|
| $H_4(MGF) = H_3(MGF)^- + H^+$ | $pK_{a1} = 6.52 \pm 0.06$ |
| $H_3(MGF)^- = H_2(MGF)^{2-} + H^+$ | $pK_{a2} = 7.97 \pm 0.06$ |
| $H_2(MGF)^{2-} = H(MGF)^{3-} + H^+$ | $pK_{a3} = 9.44 \pm 0.04$ |
| $H(MGF)^{3-} = (MGF)^{4-} + H^+$ | $pK_{a4} = 12.10 \pm 0.01$ |

Fonte: GOMEZ-ZALETA et al., 2006.

Como a MGF emitir fluorescência, quando excitada, experimentos de interação com PAMAM via fluorescência também foram realizados para somar aos resultados obtidos pela absorção no UV-vis.

4.3 Estudo da interação de MGF com PAMAMs na fluorescência

A fim de evidência a interação entre a MGF e o dendrímero de PAMAM, foi realizado um estudo em fluorescência, partindo do princípio de que a MGF fluoresce e que ao interagir com PAMAM este funcionará como quencing reduzindo sua fluorescência, pois indisponibilizará o composto livre no meio.

Para o estudo de extinção da fluorescência o meio foi tampão fosfato pH 7,2 com 5% de etanol. Foi escolhido o PAMAMG3 em concentrações próximas de 100 à 10 vezes menor que a de MGF, pois se trata de um dendrímero que possibilita incorporar muitas moléculas, seja em seus sítios internos (encapsulação), seja por interação com os grupos amina terminais (conjugação). Os espectros são mostrados na Figura 50 , como esperado houve diminuição da intensidade de fluorescência da MGF a $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ com as sucessivas adições de PAMAM.

Figura 50 - Espectro de emissão de MGF, na ausência e presença de 0,1 a 1,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PAMAM. (A) G1, (B)G2, (C)G3.

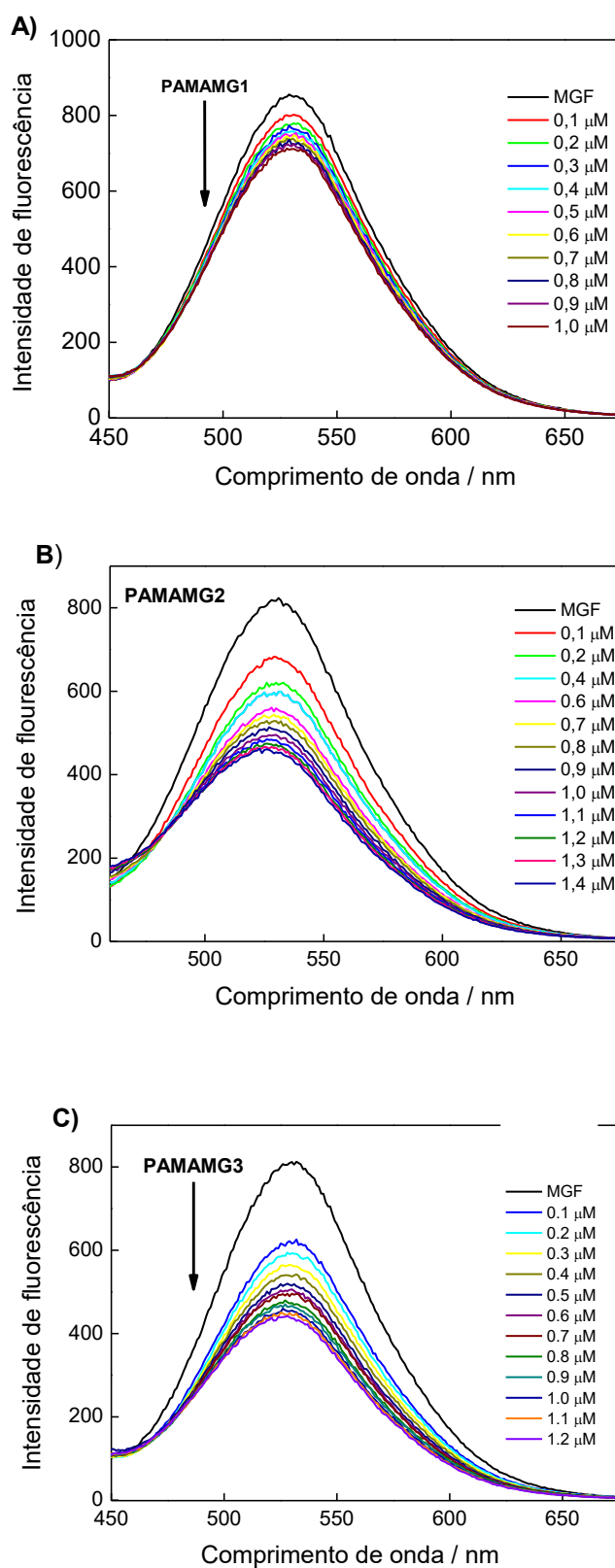
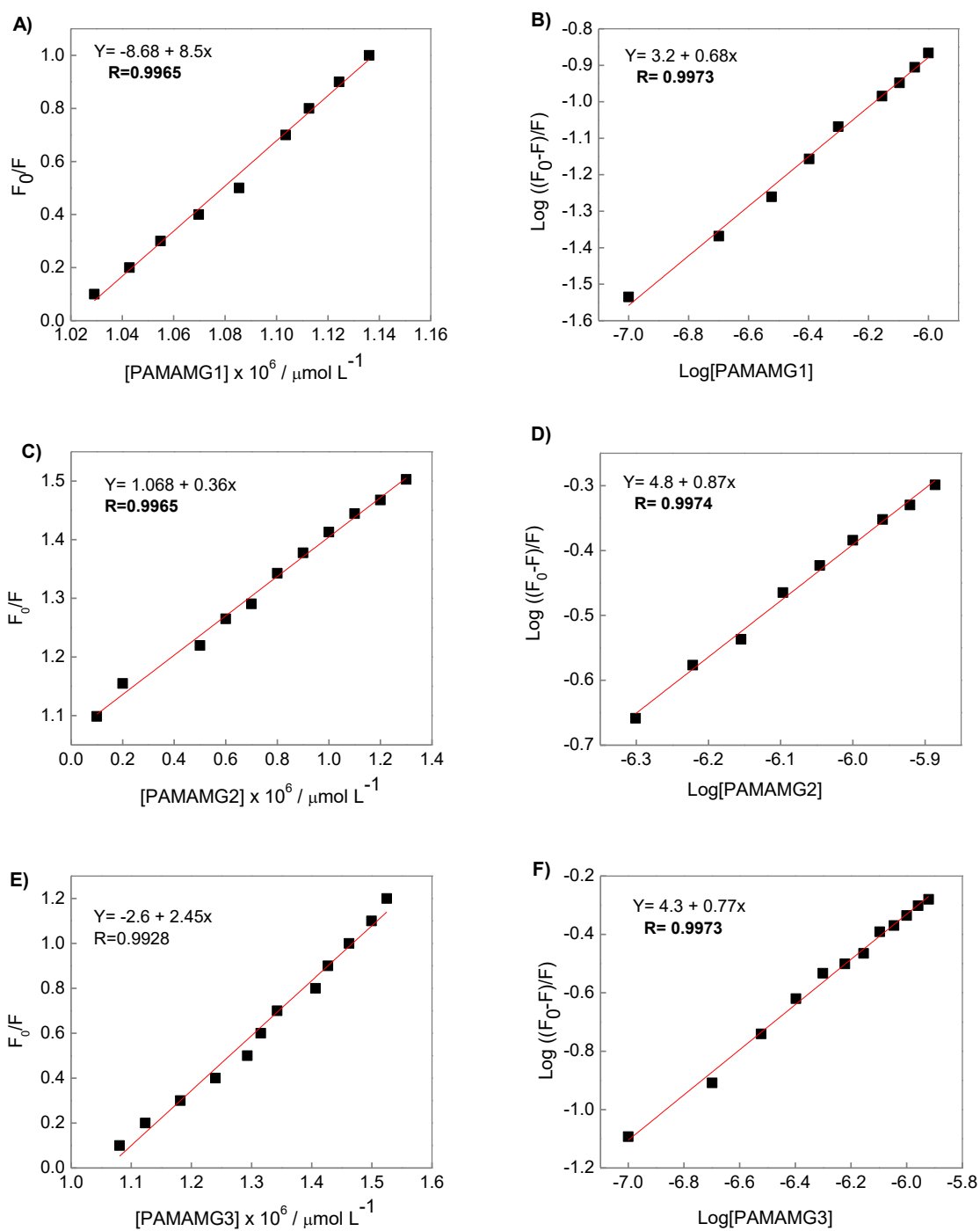


Figura 51 - Regressão linear de F_0/F vs [PAMAM] e regressão linear de $\text{Log}[(F_0-F)/F]$ vs $\text{Log}[\text{PAMAM}]$ ($\lambda_{em.} = 530 \text{ nm}$) para a geração 1 (A) e (B); geração 2 (C) e (D); geração 3 (E) e (F).



Fonte: Autora, 2018.

Para os tratamentos de regressão linear com base nas equações de Stern-Volmer e Scatchard, foram utilizadas as concentrações de 0,1 até 1,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a depender da geração do PAMAM, no geral, apresentaram melhor linearidade no processo de quenching de fluorescência, conforme as Figura 51 das quais pode se obter os valores das constantes listados na Tabela 11.

Tabela 11 - As constantes de extinção de Stern Volmer (K_{sv}), constante de ligação (K_a), estequiometria de ligação (n) e o coeficiente de correlação envolvido, para a ligação entre MGF e PAMAMs.

| Geração | K_{sv} (L mol^{-1}) | $\text{Log}K_a$ (L mol^{-1}) | n | R1 | R2 |
|---------|----------------------------------|---|------|--------|--------|
| G1 | --- | $(3,2 \pm 0,1) \times 10^6$ | 0,68 | --- | 0.9973 |
| G2 | $(3,36 \pm 0,01) \times 10^5$ | $(4,8 \pm 0,13) \times 10^6$ | 0,87 | 0,9965 | 0,9974 |
| G3 | --- | $(4,3 \pm 0,1) \times 10^6$ | 0,77 | --- | 0.9973 |

R₁= coeficiente de correlação de K_{sv} ; R₂ = coeficiente de correlação de $\text{Log}K$.

Fonte: Autora, 2018.

De acordo com a Tabela 11, o número de sítios de ligação na interação entre PAMAM e MGF apresenta valores próximo de 1,0, sugerindo que há um sítio de ligação envolvido. Os valores de K_{sv} só pode ser calculado para G2, tendo em vista que os demais exibiram valores de coeficiente angular para o equivalente da equação que não correspondem ao modelo matemático proposto, que é 1,0 ou próximo, não sendo listados na tabela. A constante de ligação K_a foi expressa como logaritmo para evitar se embutir o erro do desvio, podendo estes valores serem estimados em $1,6 \times 10^9$, $6,3 \times 10^{10}$.e $2,0 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1}$ para G1, G2 e G3 respectivamente, de acordo com a ordem de grandeza estudos com biomoléculas definem como uma interação forte (SILVA, 2014b; SILVA et al., 2013; VASCONCELLOS et al., 2016).

A formação de complexo entre a MGF e o PAMAM pode envolver dois processos o dinâmico e o estático. No processo de extinção dinâmica, o aumento da temperatura leva a colisões mais efetivas entre as moléculas com o consequente aumento de K_{sv} . Em contraste, o aumento na temperatura também pode estar associado à diminuição da estabilidade do complexo e, assim, promover uma diminuição nos valores de K_{sv} o que resulta em extinção estática (DE

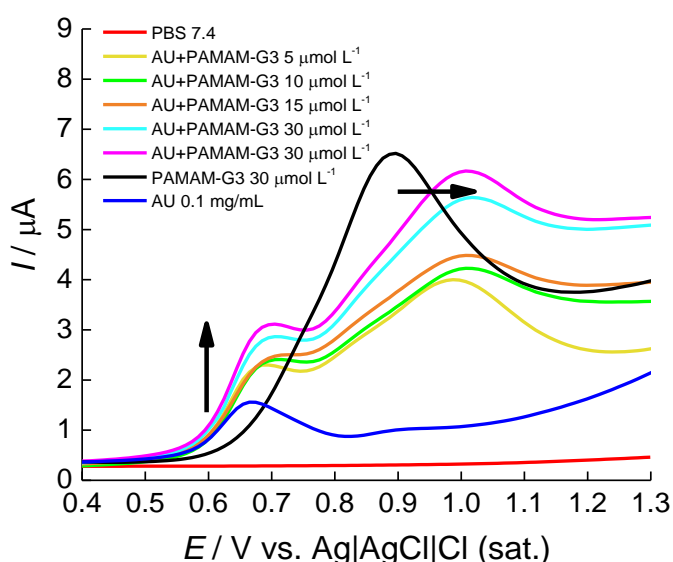
VASCONCELLOS et al., 2016). O Ksv da formação do complexo com PAMAM em diferentes temperaturas (298, 305 e 310 K) deve ser realizado, para comprovar o provável mecanismo de extinção da MGF pelo PAMAM.

4.4 Interação do PAMAM-G3 via eletroquímica

4.4.1 Estudo em solução

Com o intuito de observar o processo de transferência de fase do AU parcialmente solubilizado (1mg/mL) em solução contendo PAMAM, sem a presença de co-solvente, a concentração do carreador foi variada em 5, 10, 15, 30, 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato 7,4, de acordo com a Figura 52. Como podemos ver, o ácido úsnico em presença de quantidades crescentes de PAMAM desloca o potencial para valores mais positivos, o que evidencia uma oxidação dificultada, muito provavelmente pela formação do complexo. Ao mesmo tempo há um aumento considerável de I_{pa} , devido a solubilização do composto, antes suspenso na solução.

Figura 52 - Voltamograma de pulso diferencial do AU 0,1 mg/mL em ausência e presença de PAMAM-G3 5 a 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$, PBS pH 7,4, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.



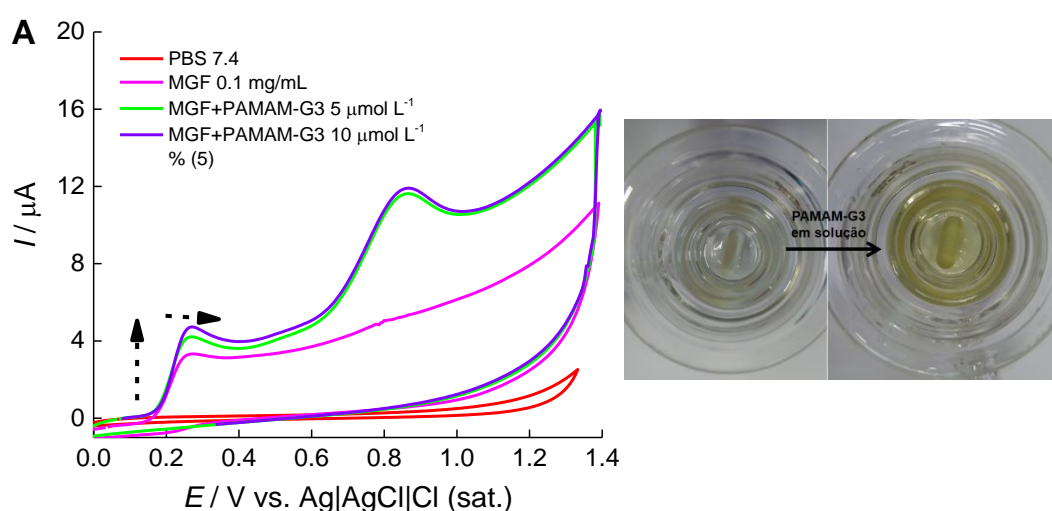
Fonte: Autora, 2018

Simultâneo ao aumento da corrente de pico do ácido úsnico há também o aumento da I_{pa} do PAMAM, adicionado ao meio, porém quando comparado ao

PAMAM livre vê-se um deslocamento acentuado e gradual do E_{pa} . As mudanças observadas nos voltamogramas de VPD da Figura 52 são indicativos de encapsulamento do AU nas cavidades internas da macromolécula. As cavidades internas geralmente têm propriedades hidrofóbicas, o que torna possível a interação com substâncias pouco solúveis em água. As interações hidrofóbicas são as mais comuns para encapsulamento de moléculas hóspedes em dendrímeros (POURIANAZAR, MULTLU, GUNDUZ, 2014).

O processo de transferência de fase foi reproduzido para a MGF (0,1mg/mL) e também foi acompanhado visualmente, pela intensidade da coloração exibida pela solução na Figura 53B. O pico de oxidação da MGF em 0,25 V (Figura 53) é atribuído à oxidação do grupo fenol mais ácido presente na estrutura da MGF, ou seja, o C6-OH que é rico em elétrons e não está estericamente confinados (FERREIRA et al., 2010). O pico de oxidação é irreversível e o composto adsorve na superfície do eletrodo.

Figura 53 - A) Voltamograma cíclico da MGF 0,1 mg/mL em ausência e presença de PAMAM-G3 5 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, PBS pH 7,4, $v= 50 \text{ mV s}^{-1}$. B) Foto da solução de MGF na cela eletroquímica antes e após a adição de PAMAM-G3 a solução.



Fonte: Autora, 2018.

Assim como o AU a MGF apresenta mudanças nos voltamogramas em presença de PAMAM, indicando um processo de encapsulação, como aumento da I_{pa}

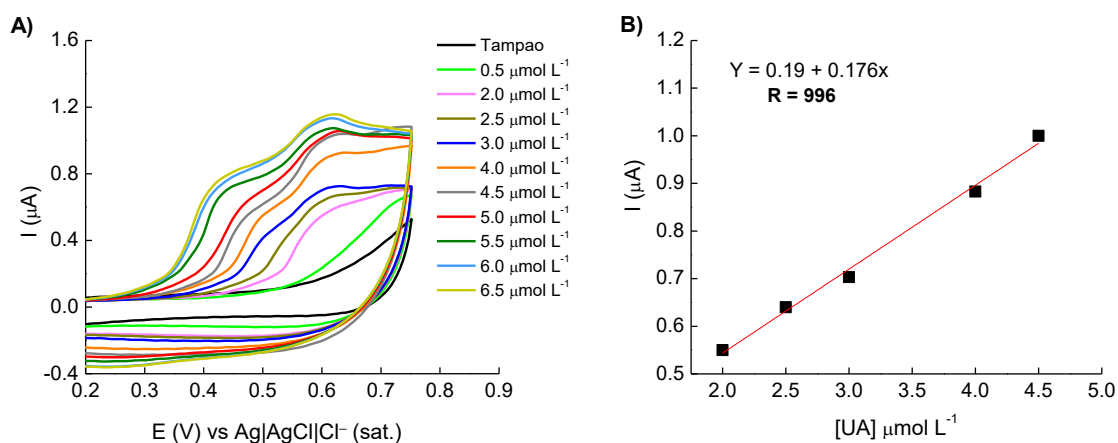
e deslocamento de E_p de 0,25 V para 0,27 V. O pamam apresenta E_p em 0,86 V. A técnica de VC é menos sensível que a VPD, utilizada no estudo anterior, porém para fins qualitativos, esta mostra-se suficiente.

A interação de BLP com PAMAM-G2 e G3 em solução, foi descrita por CANDIDO, 2017. Semelhante aos compostos supracitados, observou-se que com o aumento da concentração de PAMAM no meio há aumento de corrente do pico catódico e anódico (hidroquinona correspondente) sem mudança significativa no processo de oxidação da quinona, provavelmente devido a interação da quinona com os dendrímeros.

4.4.2 EQM de ouro com MUA

Tendo em vista que a MUA é a molécula base na construção das plataformas nanoestruturadas, a interação dos compostos com este crosslinker, pois a heteroestrutura final pode apresentar lacunas não preenchidas nas etapas de modificação e o composto, foco da análise pode ter resposta não apenas com o compósito final da estrutura, mas com outros constituintes das fases anteriores.

Figura 54 - A) Voltamogramas cíclicos do UA de 0,5 a 6,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com eletrodo de ouro modificado com MUA. B) curva da I_{pa} vs [UA]. Tampão fosfato 10 mmol L^{-1} , 5% de etanol, $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$.

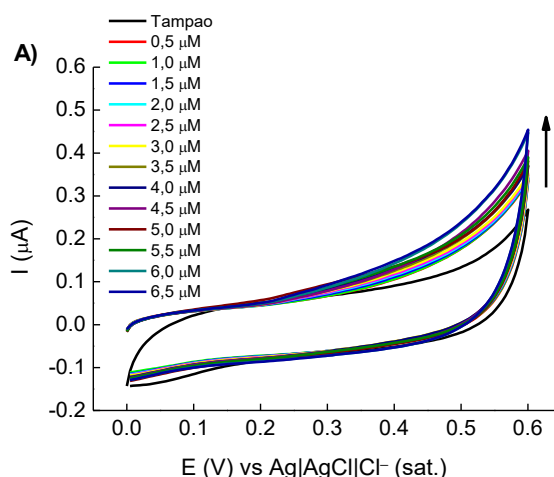


Fonte: Autora, 2018.

A curva analítica da Figura 54B foi construída com a lpa correspondente ao potencial 0,62 V, o qual demonstrou melhor linearidade, possibilitando a determinação de LD $1,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e LQ $5,2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para a respectiva SAM de MUA.

Diferente de UA a MGF não interage com MUA, com perfil voltamétrico muito semelhante ao tampão, Figura 55. Não foi observado o sinal de oxidação do composto que aparece próximo de 0,4 V. Resultado interpretado como bom, pois estudos de MGF com plataformas que usam a MUA como base e esta estiver disponível, a MGF fornecerá uma resposta “mais fiel” ao composto de fronteira.

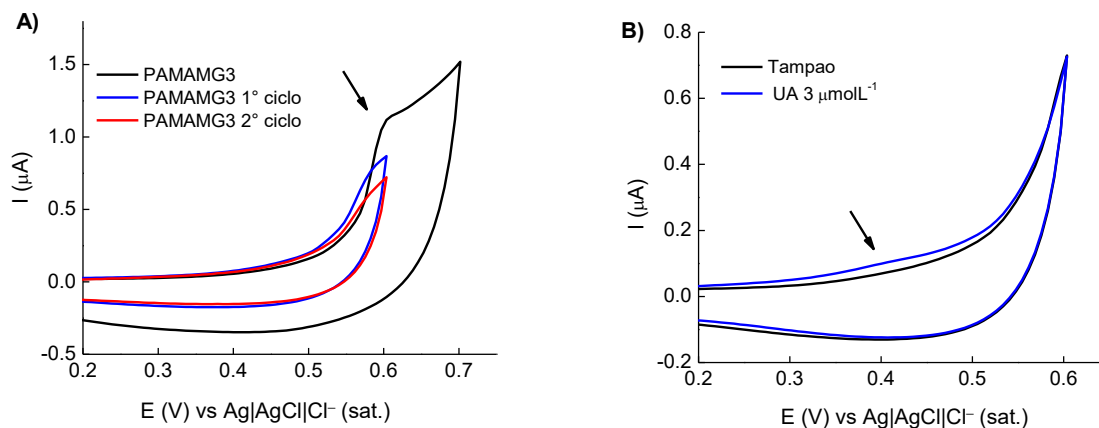
Figura 55 - Voltamogramas cíclicos da MGF de 0,5 a 6,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com eletrodo de ouro modificado com MUA. Tampão fosfato pH 7,0, 5% de etanol, $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$.



Fonte: Autora, 2018.

As amostras também foram testadas em sensor MUA/PAMAM, sendo este o principal motivo do estudo com MUA. Entretanto, não se obteve sucesso, o PAMAM imobilizado na SAM oxida em potenciais menos positivos que quando em solução, no ítem 4.4.1. (Figura 56A) comprometendo os estudos de espécies que oxidam próximo a esse potencial (0,6 V) como o UA (Figura 56B) e espécies de baixa intensidade de corrente como MGF, mesmo após um tempo de 30 minutos em contato com a solução os sinais se mostraram baixos e sem uma relação direta com a concentração do composto em solução.

Figura 56 - Voltamogramas cíclicos A) de eletrodo de ouro com SAM de MUA/PAMAG3 em tampão pH 7,0, 5% etanol; B) de SAM de MUA/PAMAG3 na ausência e presença de UA a 3 mmol L⁻¹ .



Fonte: Autora, 2018.

Entretanto, SILVA et al., 2017, obteve uma constante de associação de $2,16 \times 10^5 \text{ Lmol}^{-1}$ para estudos desta mesma SAM com a molécula 6-CN10, e CANDIDO et al., 2018, calculou uma constante de $2,9 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}$ para a β -LP. De acordo com os resultados obtidos e dentro das condições dos experimentos realizados, para os estudos de interação com SAM de PAMAM os compostos eletroativos na faixa da redução são mais promissores.

Além de MUA foram realizados experimentos com diferentes tipos de NTCs, para utilizar este como suporte para modificação por adsorção de PAMAM, porém esbarra na mesma problemática. As Curvas obtidas para UA estão no anexo II.

4.4.3 Microbalança Eletroquímica de cristal modificado com MUA/PAMAM

A microbalança de cristal de quartzo (MCQ) é uma ferramenta eficiente para detectar moléculas, estimar constantes de afinidade, e estudar os processos de adesão celular (FERREIRA, 2013). Também permite a determinação de parâmetros específicos de camadas imobilizadas, tais como a densidade de carga na superfície e viscosidade.

Na área piezoelétrica há uma relação linear entre a frequência de ressonância e a massa adicionada, de acordo com a relação de Sauerbrey (equação 31):

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

Equação 27

Onde μ_q é o módulo de cisalhamento do quartzo, em $\text{g cm}^{-2} \text{s}^{-2}$, ρ_q é a densidade do quartzo, em g cm^3 , A é a área do cristal em cm^2 e f_0 representa a frequência de ressonância nominal do cristal de quartzo, sendo representado por:

$$f_0 = \frac{1}{2h_q} \sqrt{\frac{\mu_q}{\rho_q}}$$

Equação 28

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

$$-\Delta f = \Delta m C_f$$

Equação 29

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

para líquidos Newtonianos como a água, a mudança na frequência depende da densidade (ρ) e viscosidade (η) do fluido de acordo com a seguinte relação:

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

Equação 30

Esta relação permite o uso da MCQ em eletroquímica servindo como eletrodo de trabalho em uma célula eletroquímica.

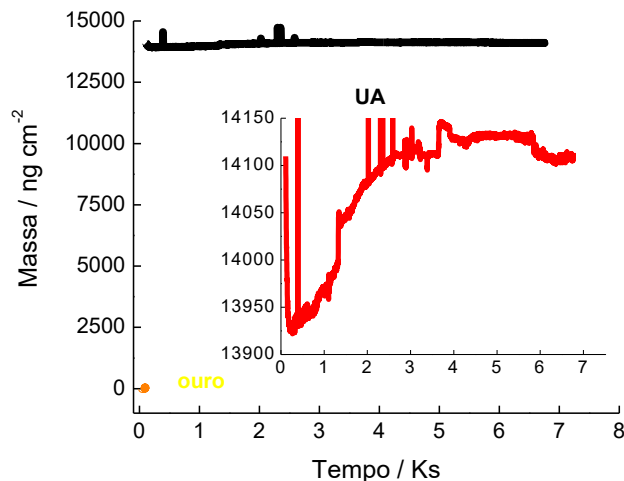
Dentre as várias técnicas exposta no trabalho, a MECQ permite observar a interação de uma substância com seu carreador através do aumento da massa depositada na superfície do cristal de quartzo.

Foi preparada uma SAM através da imobilização covalente de MUA sobre uma superfície de ouro através do método de montagem camada-por-camada e posteriormente PAMAM. Na Figura 57, estão representados os massogramas (massa aparente) para as camadas depositadas sobre um cristal de quartzo recoberto com ouro. É possível observar que a massa de MUA estabiliza a partir de 1h assim como

a de PAMAM, porém um tempo maior foi estabelecido para garantir a formação das camadas.

Após a modificação do cristal uma nova análise foi realizada Figura 57, agora o meio é tampão fosfato pH7,0 a 5% etanol, o cristal foi calibrado com esse novo meio e as respostas em massa, é dada pelas adições de UA em interação com PAMAM. Foi dado um tempo de 10 min, para mimetizar estudos anteriores com outras técnicas e foi observado o aumento da massa de forma crescente e formação de diminuição e formação de plator na adição 12 correspondente a $12 \mu\text{molL}^{-1}$ de UA, um indicativo de saturação do sistema, já que a interação é dada pela dinâmica de conjugação com o dendrímero. Com base na diferença de massa de UA foi possível calcular o número de moléculas ligadas ao dendrímero de 3×10^{11} moléculas de UA.

Figura 57 - Massograma da interação de SAM MUA/PAMAMG3 com UA. Cristal de quartzo com cobertura de ouro modificado com SAM MUA/PAMAMG3, em amarelo; UA em preto e ampliado em vermelho.

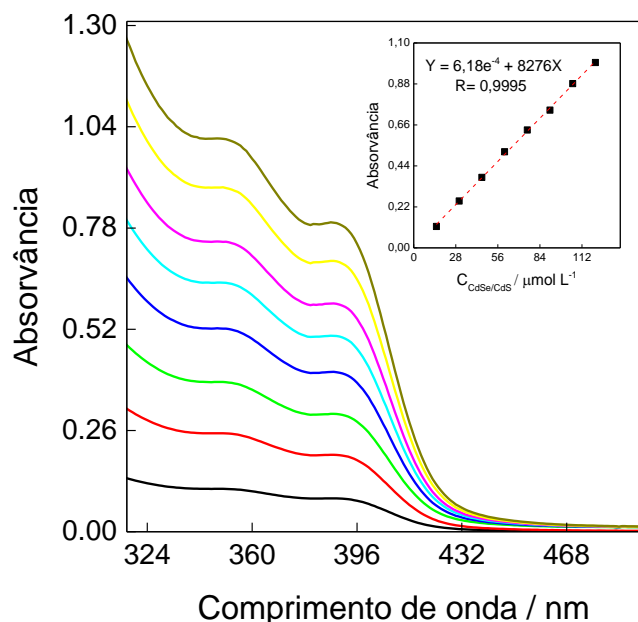


Fonte: Autora, 2018.

4.5 Avaliação espectroscópica da interação com Pontos Quânticos

Inicialmente foi feita uma curva de calibração no UV-vis do PQ CdSe/CdS em água Milli-Q, obtendo-se ótima linearidade da sua absorção, com coeficiente de correlação de 0,9995 (Figura 58) calculado com base na absorção da 1ª banda em 355 nm a 2ª se apresenta em 395 nm.

Figura 58 - Espectro de absorção de CdSe/CdS de 15 - 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato 7,4.



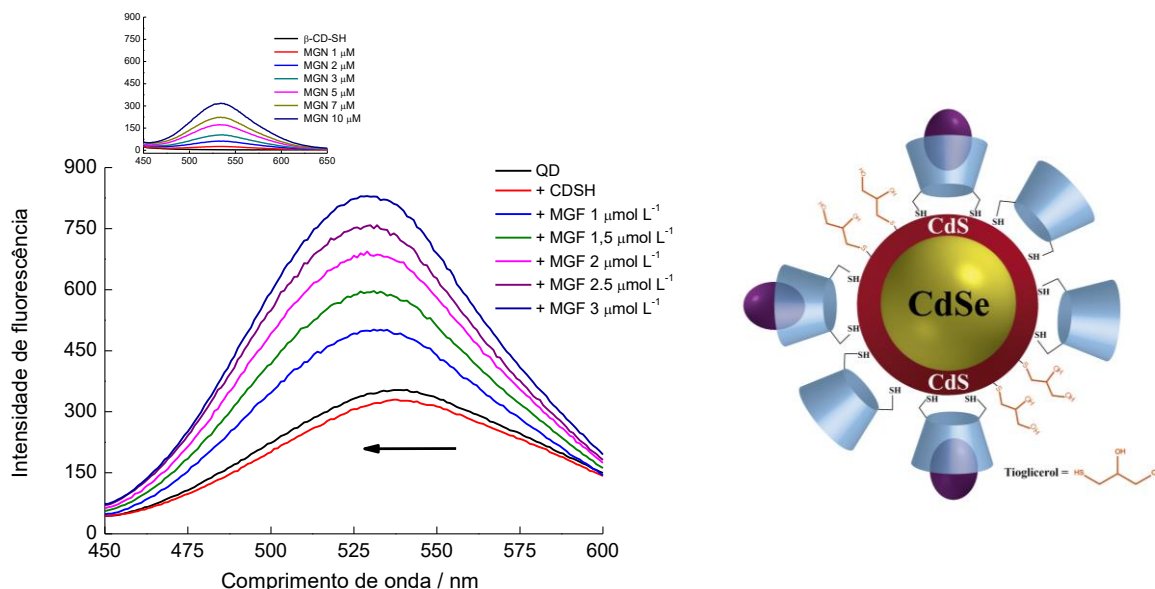
Fonte: Autora, 2018.

Os pontos quânticos utilizados no estudo são dispersos em meio aquoso com auxílio de tioglicerol. A concentração de CdSe foi determinada pela relação da absorção com o tamanho do nanocrystal, descrita por Yu e colaboradores em 2003, pelas equações empíricas 14 e 15 detalhada na metodologia.

4.5.1 PQs associados à β -CDSH em solução

O estudo de fluorescência revelou que CdSe/CdS exibe uma alta luminescência de 450-600 nm quando excitado em 350 nm, e um significativo aumento da intensidade de fluorescência foi observado com adição de β -CD tiolada, ao meio. Esse comportamento é semelhante ao observado para outros ligantes de tiol (GIROLAMO et al., 2008; AGUILERA-SIGALAT et al., 2011). A intensidade de fluorescência aumentou com a adição de mangiferina à solução (Figura 59). A intensidade foi oito vezes maior usando a mesma concentração de MGF quando comparado com MGF na presença de ciclodextrina sem PQ (DE LIMA FRANCA et al., 2016).

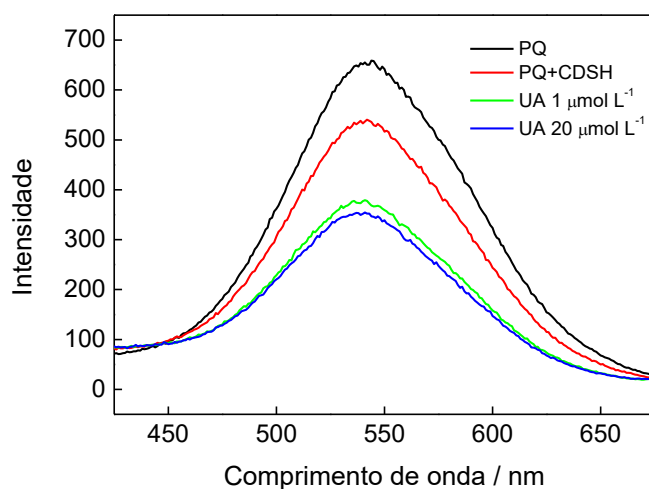
Figura 59 - À esquerda, espectros de emissão do sistema PQs-CDHS em tampão fosfato p H7,0 com 5% etanol, na ausência e presença de mangiferina nas concentrações de 1 – 3 $\mu\text{mol L}^{-1}$. À direita, representação esquemática do PQ conjugado em solução.



Fonte: (DE LIMA FRANCA et al., 2016) e autora, 2018.

O mesmo experimento foi reproduzido para o ácido úsnico (Figura 60), pois já se sabe que o mesmo tem uma porção da molécula que se encaixa na cavidade da ciclodextrina (CAVALCANTI et al., 2011; SUWANDI et al., 2015).

Figura 60 - Espectros de emissão do sistema PQs-CDHS em tampão fosfato p H7,0 com 5% etanol, na ausência e presença de UA nas concentrações de 1 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

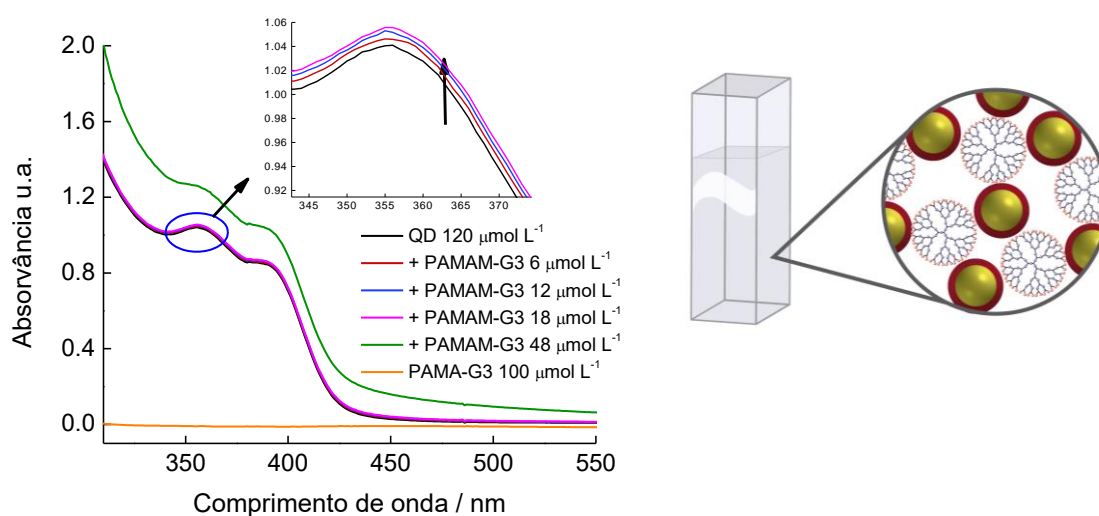


Fonte: Autora, 2018.

4.5.2 PQs associados à PAMAMG3 em solução

O espectro de absorção da Figura 61 traz o perfil de absorção do CdSe/CdS a $120 \mu\text{mol L}^{-1}$ em ausência e presença de PAMAM-G3. Podemos notar que em baixas concentrações de PAMAM no meio, há um aumento discreto da absorção do espectro, este efeito hiperacrômico não se atribui a contribuição pela absorção do PAMAM, pois este, não absorve na região analisada.

Figura 61 - Espectro de absorção no UV-vis do PQ com PAMAM-G3 em solução.



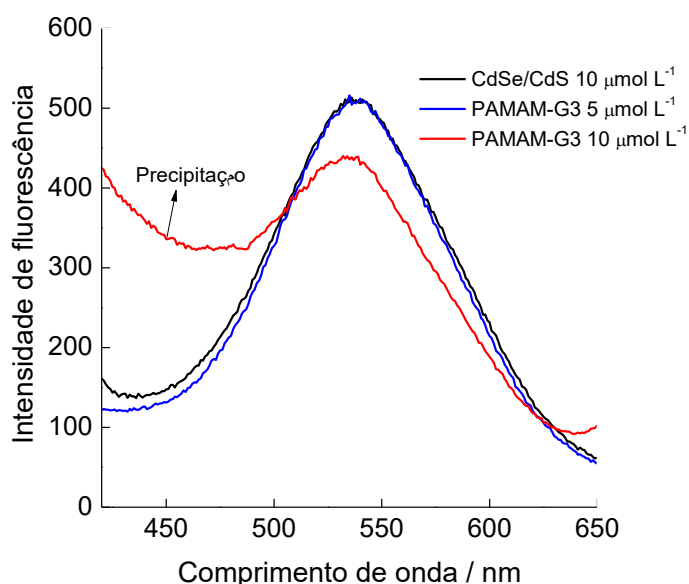
Fonte: Autora, 2018.

Com o aumento da concentração de PAMAM pode-se verificar turbidez da solução acarretando em mudanças no espectro, um resultado parecido foi obtido por fluorescência, o qual será detalhado e justificado mais adiante. Desse modo, não foi possível realizar o ensaio de interação com dendrímeros via UV-vis.

A fim de avaliar a interação do PQ com os dendrímeros foi realizada leitura da fluorescência deste na ausência e presença de PAMAMG3 (Figura 62). Conforme mostra o espectro, não há significativa mudança com adição de PAMAM-G3 à 0,5 de razão molar com relação aos PQs (HIGUCHI et al., 2011), e com o aumento da concentração o espectro diminuiu a intensidade de fluorescência por apresentar turbidez da solução. Sabe-se que os PQs precipitam em metanol, solvente que

estabiliza os PAMAMs, para tanto, os mesmos foram rotaevaporados e resuspensos em água Milli-Q para a realização do experimento.

Figura 62 - Espectro de emissão de CdSe/CdS ($\lambda_{ex.} = 355 \text{ nm}$) na ausência e presença de 5 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PAMAM-G3, água destilada.



Fonte: Autora, 2018.

Uma hipótese para justificar a turbidez durante a análise é a presença do Tioglicerol na superfície dos PQs, assim, segue alternativas: (i) a utilização dos PQs com grupos carboxila para promover a ligação direta com os PAMAMs, a baixas concentrações; (ii) a síntese de PAMAM com PQ na estruturação, visto que o grupo terminal amina pode se ligar em sua superfície, sendo necessária uma reação de fase orgânica e aquosa (POTAPKIN et al., 2016); (iii) ou uso de uma molécula espaçadora, já que o PQ utilizado apresenta diâmetro similar ao PAMAM-G3, 2,4 nm e 3,6 nm respectivamente.

4.6 Caracterização dos eletrodos quimicamente modificados

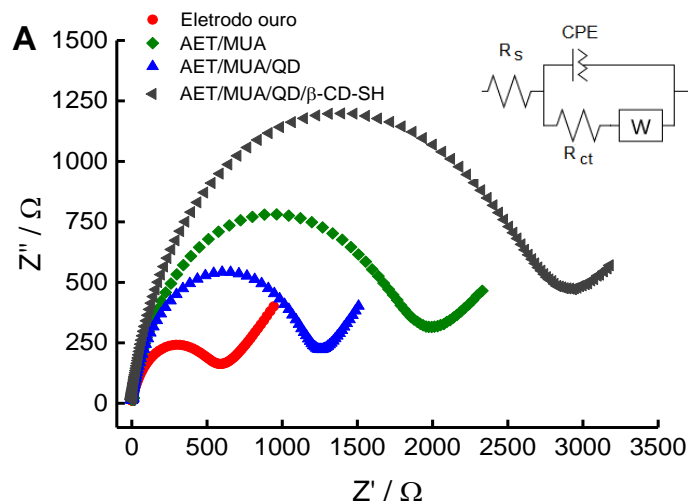
4.6.1 Espectrometria de Impedância Eletroquímica (EIE)

Para caracterizar as modificações realizadas nos eletrodos, foram realizados experimentos de espectrometria de impedância eletroquímica (EIE) e para um dos casos em paralelo com VC.

As interações na interface eletrodo-solução foram modeladas a partir dos dados obtidos no ensaio de EIE, cujo circuito equivalente está representado no inset da Figura 63, o qual nos auxilia na explicação dos espectros de impedância das plataformas estruturadas, pois o mesmo também foi empregado para a modelagem, através do FIT linear para a Figura 64A. Este modelo caracteriza-se por possuir um resistor em série ao conjunto que envolve um resistor em paralelo com um elemento de fase constante (CPE) que em série com um elemento de Warburg, onde o valor da resistência atribuído ao primeiro elemento relaciona-se com a queda ôhmica do eletrólito enquanto os outros representam a resistência a transferência de carga e a capacitância da dupla camada elétrica respectivamente. Associando a variação dos valores relacionados aos elementos do circuito com a composição do eletrólito é possível verificar se o eletrodo é sensível a determinado componente.

O comportamento observado no digrama de Nyquist (parte imaginária $-Z''$ vs. parte real Z') é o resultado das sucessivas alterações do eletrodo, Figura 63. O ponto onde o arco intersecciona o eixo $-Z''=0$ em altas frequências corresponde a queda ôhmica da solução. Na região de baixas frequências, mais baixas o arco tende a tocar na origem, ou manter uma progressão que encontre a origem, este ponto, o diâmetro do semicírculo, corresponde à resistência à transferência de carga (R_{ct}). A parte linear é o elemento difusional, um processo regido não apenas por transferência eletrônica, mas pela difusão das espécies eletroativas até a superfície, o elemento que caracteriza esse processo é a impedância de Warburg que no diagrama de Nyquist é representada por uma reta com inclinação de 45° .

Figura 63 - Diagrama de Nyquist obtido para as diferentes modificações no eletrodo de ouro. Inset: circuito equivalente.



Fonte: DE LIMA FRANCA et al., 2016.

Os espectros de EIE mostraram que as mudanças na resistência à transferência de carga para o eletrodo Au, o eletrodo AET/MUA, o eletrodo contendo AET/MUA/PQ's e o eletrodo contendo MUA/MSPQ's/β-CD-SH são 554, 1850, 1170 e 2680 Ω, respectivamente, e a resistência à solução é 1411, 1560, 1314, e 1943 Ω, respectivamente. Vê-se que o PQ's de CdSe/CdS com propriedades semicondutoras pode aumentar a condutividade do eletrodo modificado com AET/MUA e que a condutividade diminui quando os pontos quânticos são funcionalizados com β-CD-SH. Para tanto, deve-se levar em consideração que o 1-tioglicerol que recobre a superfície do PQ não está carregado no pH estudado, favorecendo a ligação dos grupos tióis da CDSH à espaços vazios existentes na superfície de CdSe, isso também pode ser observado pela diminuição da R_{ct} , caso o PQ estivesse carregado negativamente a R_{ct} aumentaria, pois a sonda utilizada no estudo é aniônica.

A modificação do eletrodo de ouro proposto como um sensor tem maior resistência à difusão da solução, possivelmente porque a difusão das espécies eletroativas em solução pode ocorrer somente na interface.

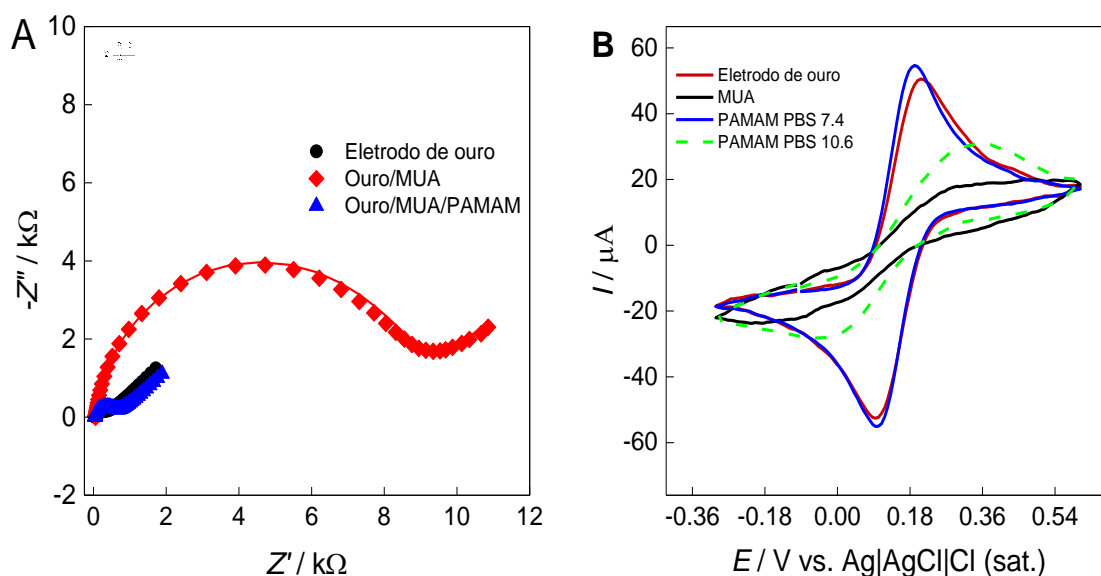
Este eletrodo modificado foi utilizado para determinação de constante de associação para mangiferina com valor de $1,1 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$ (DE LIMA FRANCA et al., 2016). Entretanto, não foi possível determinar K para o ácido úsnico, pois o mesmo

apresenta potencial de oxidação próximo de 0,7 V, era esperado que com a modificação houvesse redução do potencial, de modo que a ciclodextrina presente no eletrodo facilitasse esse processo, isso não foi observado. Assim o pico não foi observado devido também a janela limite de potencial do eletrodo de ouro, já que vai até 0,8 V, potencial de oxidação do ouro (dados não mostrados). Uma alternativa para a determinação da constante de associação para o ácido úsnico utilizando essa plataforma eletródica seria fazer uso da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica, técnica não destrutiva e o aumento da concentração do analito seria acompanhado pelo aumento da resistência a transferência de carga.

A Figura 64 mostra os espectros de impedância que assim como a Figura 63 ajudam a elucidar o mecanismo da interface eletrodo-solução, onde o diâmetro do semicírculo em frequências mais altas corresponde à resistência à transferência de carga (R_{ct}) e a parte linear em frequências mais baixas a resistência à difusão da solução (R_s). Os espectros EIS mostraram que as mudanças na resistência à transferência de carga para o próprio eletrodo Au, o eletrodo MUA, o eletrodo contendo MUA-PAMAM são 366, 862,5 e 620,8 Ω e a resistência da solução 46,3, 53,2 e 40,9 Ω , respectivamente de acordo com o modelo [R_s ([$R_{ct}Z_w$] CPE)].

A baixa R_{ct} tanto no eletrodo de ouro limpo como após a imobilização com PAMAM é explicada por este estar carregado positivamente e interagir com a sonda facilitando o processo redox de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ íons. Assim, vê-se que a reação do eletrodo foi controlada apenas por difusão ao longo de todas as frequências.

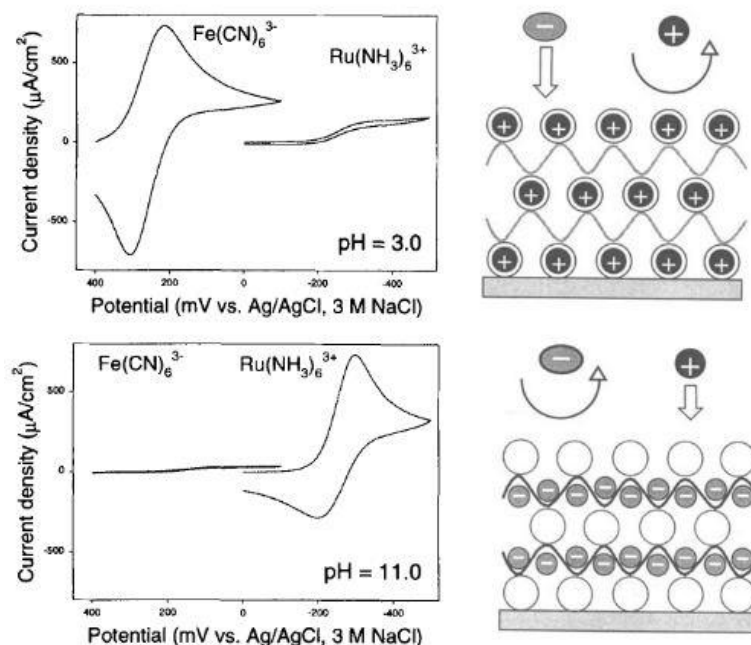
Figura 64 - A) Diagrama de Nyquist (Z'' vs. Z') de EIS e B) voltamogramas de VC, para eletrodo de ouro modificado com MUA, e PAMAM-G2, no potencial de +0,22 V vs. Ag|AgCl|Cl⁻ e amplitude de 5 mV em 10 mmol L⁻¹ PBS pH 7,4 contendo 2,5 mmol L⁻¹ [Fe(CN)₆]^{3/4-}.



Fonte: Autora, 2018.

A Figura 64B mostra o voltamograma usado para caracterização adicional do eletrodo modificado. O comportamento do eletrodo de ouro limpo é semelhante ao modificado com o PAMAM, observando o sinal redox da sonda, enquanto que a etapa com a MUA não mostra esse resultado do processo, semelhante ao EIS. Para confirmação de que há interação dos grupos terminais do PAMAM com a sonda foi realizada a varredura em pH 10,6, no qual as aminas terminais se mostram com carga negativa, mesma carga da sonda, dificultando a oxi-redução da sonda. Esta foi a alternativa de escolha para comprovar que o PAMAM estava imobilizado na superfície, outra forma seria utilizar o hexaminorutênio $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+/3+}$ como sonda eletroquímica catiônica, para ambas as análises. A Figura 65, traz as clássicas sondas redox eletroquímicas, o $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ e o $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+/3+}$, sonda aniônica e catiônica respectivamente (DAVID E. BERGBREITER, YUELONG LIU, MERLIN L. BRUENING, 1999).

Figura 65 - Perfil voltamétrico da permeoseletividade e dependência do pH das sondas eletroquímicas catiônica e aniônica, para o composto PAMAM aminado.



Fonte: (DAVID E. BERGBREITER, YUELONG LIU, MERLIN L. BRUENING, 1999).

Este eletrodo foi produzido com o intuito de obter a constante de associação do analito com o PAMAM imobilizado no eletrodo, tendo em vista que o pico de oxidação do ácido úsnico não foi observado com o aumento da concentração para a técnica de VC (dados não mostrados), pois há dois fatores envolvidos neste estudo; primeiro, o potencial do analito é próximo do potencial de oxidação do ouro (0,8 V); e segundo a amina, grupo terminal do PAMAM oxida em torno de 0,9 com altos valores de corrente, pois encontra-se imobilizado.

Mediante o exposto, a metodologia de modificação pode ser utilizada para analitos que sofrem redução, como já reportado na literatura, ou mesmo, oxidação em baixo potenciais (CANDIDO, 2017). Tornando possível a determinação da constante por VC ou mesmo VPD, com as devidas adaptações da equação. A técnica de EIE pode ser empregada como alternativa as técnicas clássicas, para este eletrodo modificado com PAMAM, haja vista o leque de modelos matemáticos adaptados para estudos eletroquímicos, contribuindo na elucidação de mecanismo de interação entre ele e a molécula eletroativa. Vale ressaltar que compostos com potencial próximo OCP também não são indicados para o estudo, foi o caso da MGF que quando

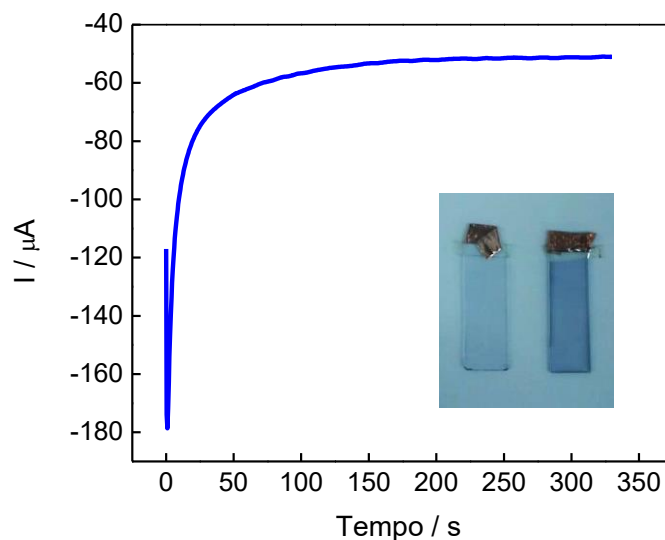
conjugada com PAMAM apresenta potencial de oxidação próximo ao OCP 0,23 V, exibindo um diagrama de Niquist atípico, pois não mais se trata de um sistema estacionário e sim sob perturbação da oxidação da espécie envolvida.

4.6.2 Análise espectroscópica por ITO

Inicialmente foi eletrodepositado sobre a superfície do ITO nanocristais de Au para simular o eletrodo de ouro utilizando na metodologia de SAM com PQs e PAMAM-G3, para assim investigar o comportamento da absorção eletrônica mediante as consecutivas modificações camada a camada. Sendo esta, também, uma forma de caracterizar o sistema de montagem da SAM anteriormente utilizado.

A cronoamperometria foi a técnica eleita para a eletrodeposição de nanocristais de Au no ITO, a Figura 66 exibiu o perfil do cronoamperograma obtido, juntamente com a imagem do ITO, sobre uma superfície branca, limpo e após a eletrodeposição dos nanocristais, apresentando coloração violeta e aparência homogênea. Segundo Sakai e colaboradores (2009), ao aplicar o potencial de -0,3 V para a eletrodeposição por 300 s se obtém nanocristais de ouro cujo tamanho de partícula é de 39 ± 13 nm de diâmetro, 32 ± 15 nm de altura e aproximadamente 400 partículas por μm^2 .

Figura 66 - Cronoamperograma da eletrodeposição de nanocristais de ouro no ITO no potencial de redução de -0,3 V e foto do ITO sem e com a deposição dos nanocristais.



Fonte: Autora, 2018.

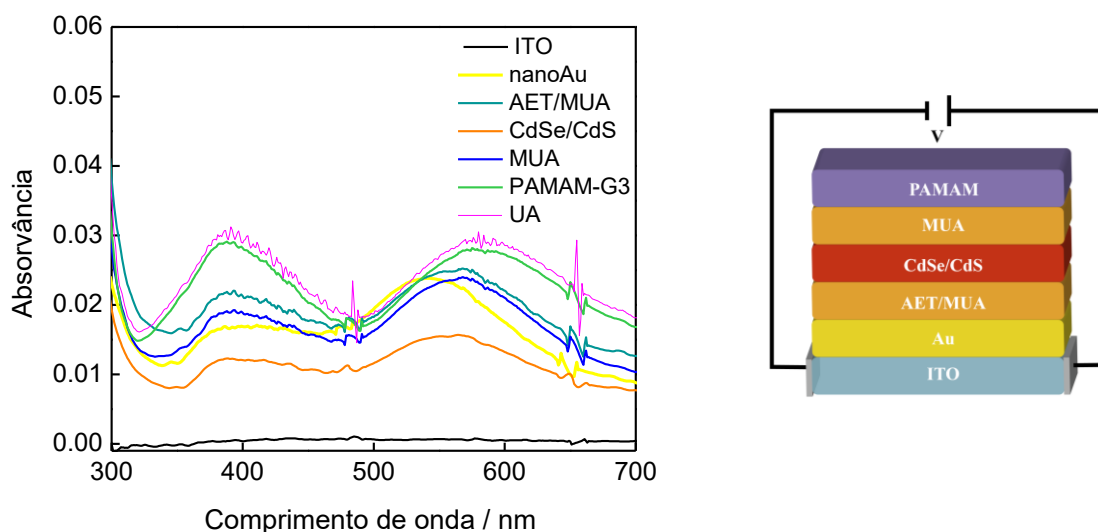
A formação das nanopartículas envolve a redução de Au^{3+} para Au^0 pela ação do ácido sulfúrico como agente redutor. Os íons Au^{3+} são introduzidos ao meio reacional a partir do ácido tetracloroáurico, que é a forma ácida do cloreto de ouro (III) (MELO JR. et al., 2012).

No espectro da Figura 67 a bandas de absorção em 385 é provavelmente atribuída a franjas residuais de interferência do filme no ITO, devido ao cancelamento incompleto das franjas que resultam de múltiplas reflexões no interior do filme. A banda em 542 nm corresponde as nanopartículas de ouro depositadas no ITO, semelhante ao descrito na literatura para o mesmo potencial de redução (SAKAI et al., 2009). A absorção do ITO limpo sem modificação foi subtraída de cada espectro de absorção.

As bandas em 385 e 542 sofreram alteração com a sequência de imobilizações moleculares. Com a ligação do AET aos nanocristais e a MUA ao AET, observa-se aumento na absorção da 1ª banda e constância da 2ª com deslocamento batocrômico para 559 nm, com a adição dos PQs há hipocromismo e o λ se mantém, já com a MUA, usada como um crosslink para o PAMAM, o espectro se apresenta bem similar a etapa de AET-MUA com absorção um pouco menor e deslocamento batocrômico da segunda banda para 562 nm. O ITO com o PAMAM apresentou tanto efeito

hipercrômico em ambas as bandas como um deslocamento batocrômico da segunda banda para 580 nm, o aumento mais pronunciado da primeira banda se deve em parte ao PAMAM absorver em torno de 300nm conferindo um perfil alargado de banda.

Figura 67 - Espectro no UV-vis do ITO limpo, após deposição de nano Au e as imobilizações consecutivas com AET/MUA/CdSe-CdS/MUA/PAMAMG3/UA. À direita, um esquema da heteroestrutura montada no ITO.



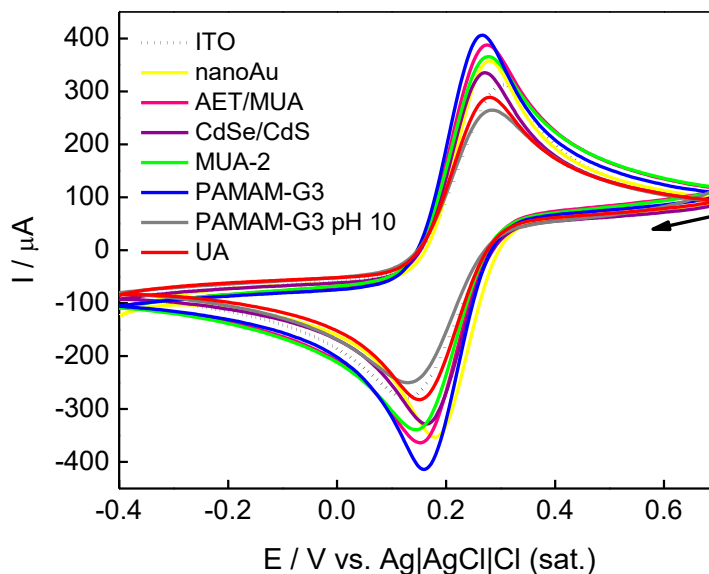
Fonte: Autora, 2018.

Com o intuito de avaliar a área eletroativa do ITO, a cada etapa de modificação, o mesmo foi imerso em solução usando o $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ como probe para estudar a adsorção das moléculas envolvidas, pois a transferência de elétrons desta sonda é altamente sensível a taxa de cobertura superfície de Au (YÁÑEZ, 2006). As mudanças no perfil voltamétrico da sonda, mesmo que discretas estão de acordo com as modificações promovidas na superfície do eletrodo de ITO. Onde partindo do ITO antes e após a eletrodeposição de nanocristais de Au observa-se um aumento de área e aproximação do E_{pc} e E_{pa} da sonda, associado ao aumento da condutividade promovida pela nanoAu na superfície, como previsto (WANG et al., 2009). Nas fases seguintes de modificação as alterações de área e ΔE , estão descritas na Tabela 12.

O PAMAM-G3 apresenta grupos aminas terminais ($-\text{NH}_2$) que em pH neutro se apresenta com carga positiva ($-\text{NH}_3^+$), em sua forma protonada, um ácido conjugado, condição semelhante ao tóxico de EIE. Assim, foi verificado em pH básico também e se observou a redução da condução, pois desta forma não há afinidade com a sonda.

Por último o ITO foi imerso em solução de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de UA e se mostrou também menos condutor.

Figura 68 - Voltamograma cíclico do ITO em sistema $[\text{Fe(III)(CN)}_6^{3-}/\text{Fe(II)(CN)}_6^{4-}]$ sem e com as imobilizações nanoAu-AET-MUA-CdSe/CdS-MUA-PAMAMG3-UA.



Fonte: Autora, 2018.

Vale ressaltar que por se tratar de um ITO e que as etapas de simulação da SAM de eletrodo de ouro partiram dos nanocristais a este depositados, justifica as discretas variações envolvidas no perfil voltamétrico da sonda redox. Haja vista, a eletrodeposição formar uma camada fina e translúcida onde parte do ITO pode interagir com o meio.

Tabela 12 - Valores de ΔE_p e área dos voltamogramas correspondentes em cada etapas de modificação do ITO em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

| Fase de Modificação | Área (10^4) | $\Delta E_p / \text{V}$ |
|----------------------------|---------------------------------|---|
| ITO | 1,29 | 0,173 |
| Nano Au | 1,41 | 0,092 |
| AET-MUA | 1,6 | 0,13 |
| CdSe/CdS | 1,36 | 0,099 |
| MUA-2 | 1,56 | 0,132 |
| PAMAM-G3 pH 7 | 1,64 | 0,107 |
| PAMAM-G3 pH 10 | 1,14 | 0,155 |
| UA | 1,18 | 0,13 |

Fonte: Autora, 2018.

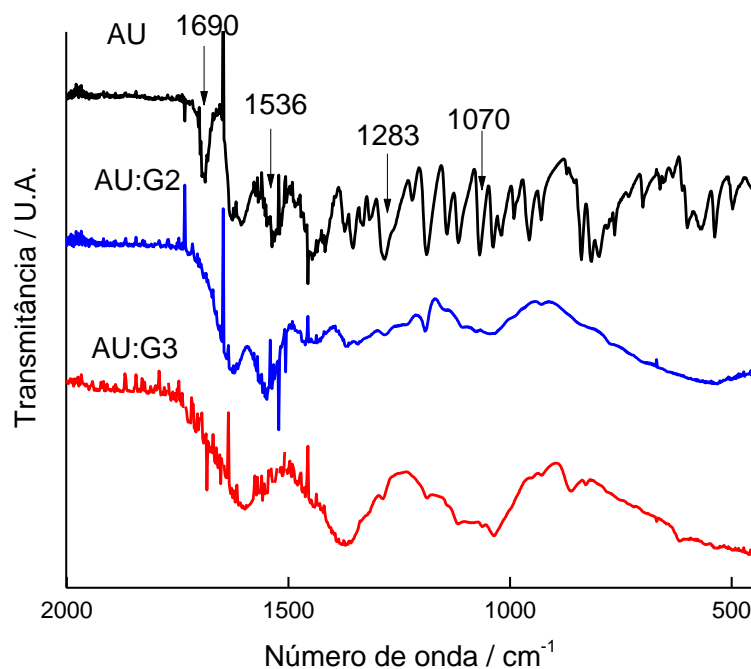
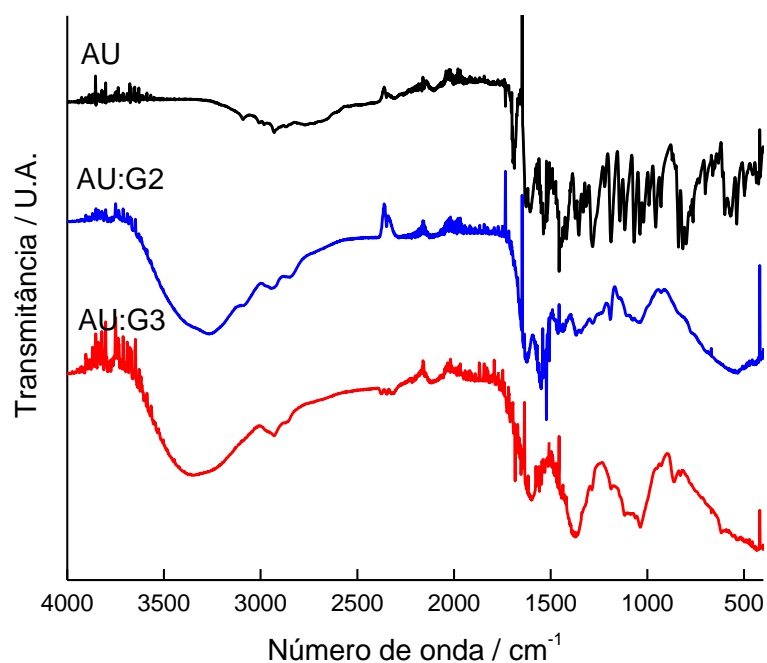
Um estudo complementar ao realizado, cujo meio pode ser substituído por tampão fosfato, pode ser feito para corroborar com os dados apresentados, evidenciando a oxidação do grupo amina em torno de 0,9 V e a amostra testada próximo de 0,6 V, após imobilização das mesmas. Sendo esta, uma nova proposta de sensor, com o qual pode ser construída uma curva de calibração para os compostos estudados via amperometria, técnica eletroquímica mais sensível, comumente empregada para detecção eletroanalítica em potencial fixo. Por fim, seus resultados podem ser comparados com os eletrodos proposto neste trabalho e assim ter um vasto padrão comparativo quanto aos tipos de imobilização envolvidas a carga de carreadores envolvida nas modificações propostas e seus LDs.

4.7 Caracterização dos complexos com PAMAM

4.7.1 Análise dos espectros obtidos por ATR-FTIR

Os espectros de ácido úsnico livre e complexado com PAMAM geração 2 e 3 são mostrados na Figura 69. O ácido úsnico livre tem uma banda em 1690 cm^{-1} que corresponde ao grupo cetona conjugado a um anel aromático, a banda em 1536 é referente a carbonila não conjugada e não aromática. As banda 1283 e 1070 cm^{-1} são atribuídas aos modos assimétrico e simétrico de $\nu(\text{COC})$ aril alquil éter (NUNES et al., 2010).

Figura 69 - Espectro de ATR-FTIR do AU e seus complexos com PAMAM-G2 e G3 na estequiometria de 1:16, 1:32. A) faixa de 4000 a 400 cm^{-1} e B) faixa de 1800 a 400 cm^{-1} .



Fonte: Autora, 2018.

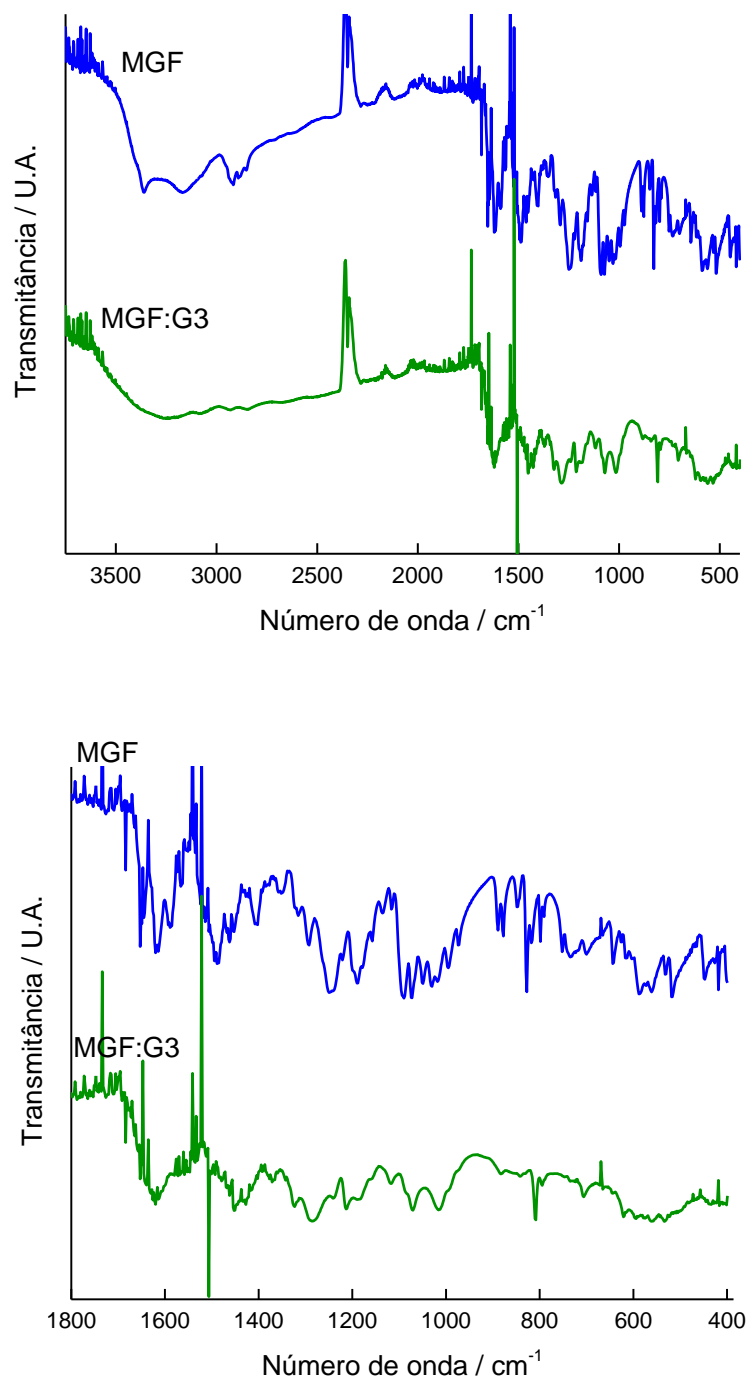
O espectro de infravermelho da MGF está representado na Figura 70 para a MGF, as bandas de absorção em 3367 e 2923 cm^{-1} , são do grupo hidroxilo e estiramento assimétrico C-H, um grupo carbonilo conjugado a aromático pode ser observado em 1650 cm^{-1} em conjunto com sinais de núcleo aromático (1619, 1487 (C=C), 1407 cm^{-1}). Bandas em 1255 e 1093 cm^{-1} são atribuídas a alongamento –C-O e –C-O-C, respectivamente.

A região de 1650 à 1550 para o complexo não exhibe os picos definidos referente a MGF, devido haver o estiramento C=O de amida em 1654 e em 1552 pico atribuído a amida secundária HNC=O. No espectro do complexo ocorreu desaparecimento das bandas em 1488 e 1407 cm^{-1} de absorção da MGF e deslocamento de 1255 e 824, para 1280 e 811 cm^{-1} respectivamente. Vê-se no complexo a presença da banda em 3250 de estiramento N-H em amina primária, com supressão dos picos em 3355 e 3160 cm^{-1} da MGF livre.

Tanto para AU como para MGF, foi preparado os complexos com PAMAM de geração 1 e 0, e para ambos os compostos o rendimento se apresentou muito baixo, de modo que não foi possível realizar caracterização por FT-IR. Lembrando que, por se tratar de reagentes muito caros a síntese partia de um mínimo ótimo.

A técnica de RMN-H pode ser útil para elucidar os mecanismos de complexação. Dados de H^1 estão disponíveis no anexo II, para MGF com PAMAM-G2. Entretanto, devido à baixa concentração faz-se necessário maior tempo de acumulação e RMN de 600Hz.

Figura 70 - Espectro de ATR-FTIR da MGF e seu complexo com PAMAM-G3 na razão 1:32. A) faixa de 4000 a 400 cm^{-1} e B) faixa de 1800 a 400 cm^{-1} .



Fonte: Autora, 2018.

Para os complexos de interação com os PAMAMs das várias gerações optou-se por realizar, inicialmente um estudo de interação no UV-vis, para avaliar a

viabilidade da preparação destes complexos. Entretanto, até então, não foi possível determinar com exatidão a estequiometria para os estudos com PAMAM, devido a dependência de resultados de RMN H¹ 2D, por variação em razão molar entre as amostras e o PAMAM. Por se tratar de um estudo muito robusto optou-se por ser realizado posteriormente na continuação do projeto.

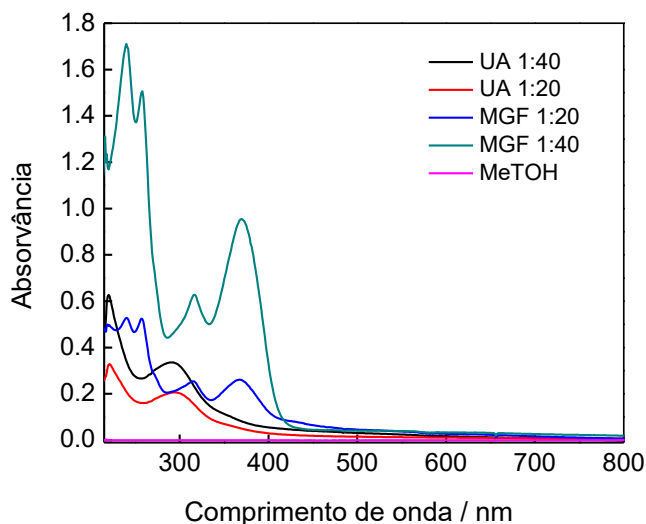
Em experimentos de RMN H¹, preliminares, do complexo MGF:PAMAM-G2 e MGF:PAMAM-G3 (ver anexo II), pode-se notar mudanças nos deslocamentos químicos dos hidrogênios da MGF. Porém, como os PAMAMs apresentam alto peso molecular (G2-3256,18 e G3-3908,84 g/mol), somado a baixa massa em mg obtida no processo de complexação, para melhor resolução dos espectros obtidos há a necessidade de um tempo considerável de acumulação (overnight).

4.7.2 Estimativa da estequiometria de conjugação dos complexos com PAMAM no UV-vis

Os complexos de AU e MGF com PAMAMG3 nas razões 1:20 e 1:40 foram solubilizados em metanol, e analisado o perfil por espectrofotometria UV-vis (Figura 71), para calcular uma estimativa de quantas moléculas interagem no complexo com PAMAMG3 a partir das equações obtidas pelas curvas analíticas de MGF e UA livres (Figura 72 e Figura 73) em metanol e dividir pela concentração de partida do PAMAM. Dada a maior afinidade dos compostos pelo meio, em relação ao PAMAM

Pode-se observar mudanças nas bandas de absorção destes compostos, como deslocamentos e supressões, já relatados como evidência de complexação para outras substâncias com dendrímeros (CANDIDO et al., 2018; DEVARAKONDA et al., 2007). Quanto aos espectros do UA apresenta um deslocamento da banda de 287 para 293 nm e os espectros para MGF desloca de 365nm para 367 no 1:20 e 370 nm no 1:40.

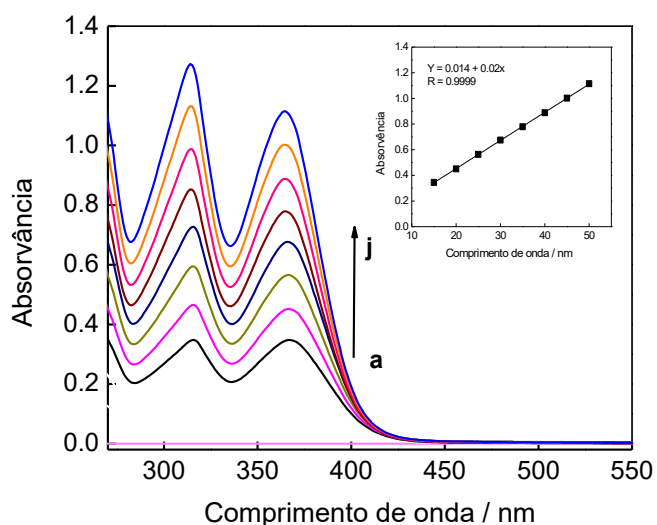
Figura 71 - Espectros no UV-vis dos complexos AU-PAMAMG3 e MGF-PAMAMG3 em metanol na razão 1:20 e 1:40.



Fonte: Autora, 2018.

A partir da curva analítica com valores de absorvância da MGF em metanol no comprimento de onda de 365 nm (Figura 72), foi possível realizar a análise da regressão linear que demonstrou um coeficiente de correlação muito próximo a 1,0 $R = 0,9999$, demonstrando que há correlação entre as variáveis dos eixos, apresentando coeficiente angular de 0,02 e coeficiente linear de 0,014.

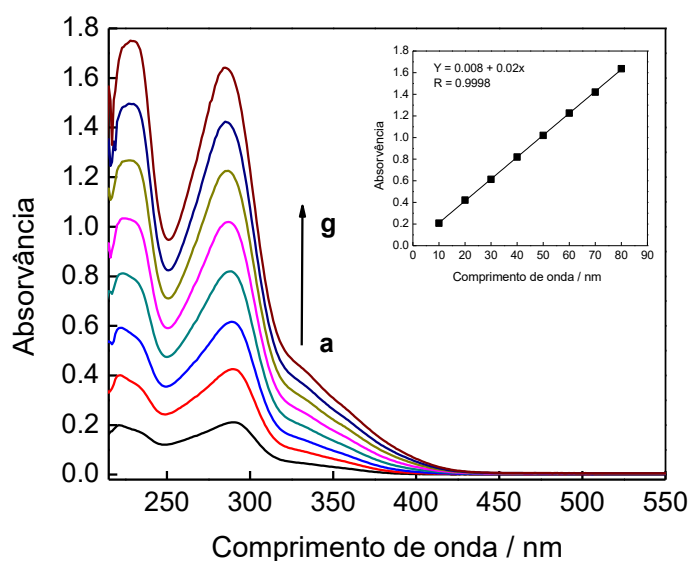
Figura 72 - Espectro no UV-vis de MGF em metanol de 15 a 50 μmolL^{-1} . Inset: curva analítica da concentração de MGF vs absorvância para a banda em 365 nm.



Fonte: Autora, 2018.

Assim como, com a MGF, foi construída uma curva para o UA no comprimento de onda de 287 nm (Figura 73), a regressão linear demonstrou um coeficiente de correlação $R=0,9998$, um coeficiente angular de 0,02 e coeficiente linear de 0,008, dados que possibilitaram o cálculo do número de moléculas complexadas.

Figura 73 - Espectro no UV-vis de UA em metanol de 10 a 80 μmolL^{-1} . Inset: curva analítica da concentração de UA vs absorvência para a banda em 287 nm.



Fonte: Autora, 2018.

A partir da equação da reta obtida da curva de calibração, tanto para UA como para MGF, calculou-se o número de moléculas incorporadas em cada dendrímero PAMAM nos complexos formados, conforme Tabela 13. Com base no número de moléculas de MGF e UA que foi associado com cada molécula de dendrímero, sendo uma evidência contundente da complexação entre os compostos (DEVARAKONDA et al., 2007).

Tabela 13 - Número de moléculas incorporadas pelo PAMAMG3.

| Complexo | Razão | Nº de moléculas incorporadas |
|--------------------|--------------|-------------------------------------|
| PAMAMG3-UA | 1:20 | 11 |
| | 1:40 | 7 |
| PAMAMG3-MGF | 1:20 | 6 |
| | 1:40 | 14 |

Fonte: Autora, 2018.

As moléculas de UA apresentaram um padrão diferente do de MGF, entre as razões estudadas, a maior proporção mostrou menor número de moléculas encapsuladas/conjugadas. Outros fatores também devem ser levados em consideração, como exposto anteriormente, a densidade de cargas envolvidas, pode estar ligada diretamente na eficiência de complexação. De modo que, fazer um estudo de proporção de agente encapsulado por complexo formado via variação do pH é um trabalho a ser considerado para melhor explicação do rendimento obtido.

Já a MGF, mostrou uma relação direta entre as concentrações de partida e o número de moléculas obtidas no complexo formado com 14 moléculas associadas a um PAMAMG3. Sabendo-se que ambas as moléculas apresentam natureza hidrofóbica, o uso de PAMAM como carreador se mostra vantajoso e promissor, possibilitando biodisponibilizar no meio aquoso 14 moléculas por unidade.

4.8 Interação com DNA eletroquímico em eletrodo de carbono vítreo

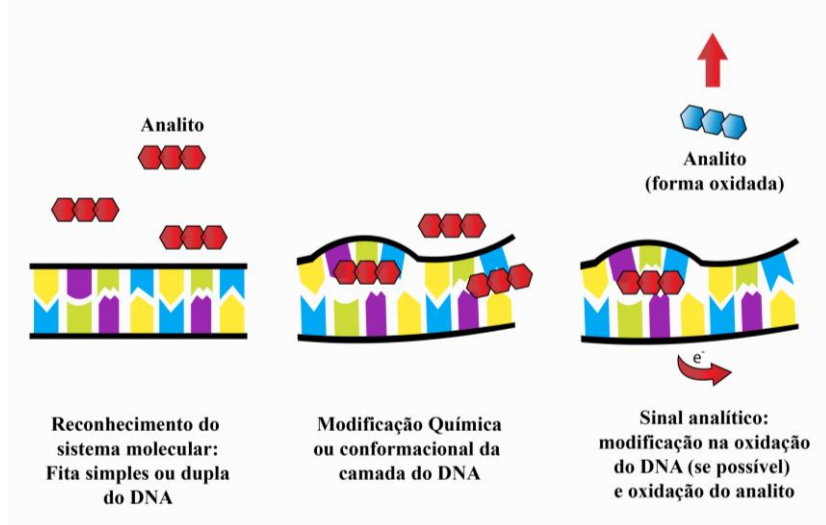
Estudos de interação dos compostos naturais supracitados com CT-DNA no UV-vis e outras técnicas já estão descritos na literatura. Tanto para UA como MGF e BLP, esta última não causa dano nem interage com o DNA, porém UA e MGF interagem supramolecularmente e esta pode ser uma via de mecanismo de ação terapêutica (TAJIK; TAHER; BEITOLLAHI, 2014)

Os dados apresentados a seguir foram submetidos a correção de linha de base com software GPES.

4.8.1 Biossensor eletroquímico de dsDNA

Baseado na Figura 74, representação do modo de operação do biossensor de DNA, o analito em solução entra entre as fitas do dsDNA adsorvido na superfície de carbono, modifica sua conformação, o que leva à exposição de suas bases, passíveis de oxidação anódica.

Figura 74 - Esquema das etapas do biossensor eletroquímico de dsDNA.

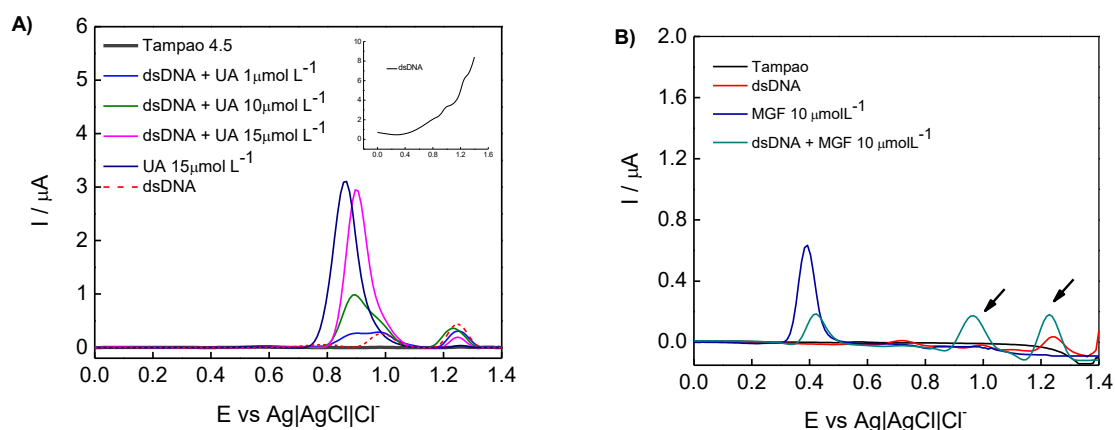


Fonte: Adaptado de ABREU et al., 2011.

A varredura anódica do biossensor de dsDNA após 10 min em contato com as soluções das amostras, exibiu um perfil semelhante a varredura sem amostra, onde não houve mudança significativa no comportamento voltamétrico das nucleobases para o UA. Na Figura 75A o UA exibe $E_{pa} = 0,86 \text{ V}$ em eletrodo de carbono vítreo limpo, quando em contato com filme de dsDNA adsorvido na superfície do eletrodo, este valor desloca para potencial mais positivo nas concentrações testadas. Devido ao sinal de oxidação do UA ser muito próximo ao E_{pa} da guanina ($0,99 \text{ V}$) vê-se uma sobreposição, já a adenina com $E_{pa} = 1,25 \text{ V}$ não sofre mudanças significativas quanto ao perfil de oxidação. Com isso, pode-se inferir que o UA interage com o DNA sem exposição dos sítios ativos para oxidação da base Adenina e parcialmente o da guanina, onde há um aumento I_{pa} para o potencial correspondente a esta, mesmo que comprometido com a sobreposição de UA, e este último por romper a barreira física do biofilme adsorvido demonstra uma afinidade pela molécula. A pequena ΔI_{pa} de UA entre a superfície limpa e modificada é uma evidência de interação. O inseto do

voltamograma para UA, mostra o perfil do biossensor de dsDNA sem ao ajuste de linha de base.

Figura 75 - Voltamogramas na VPD para biofilme de dsDNA em eletrodo de CV em ausência e presença A) de 1, 10 e 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de UA e 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de UA em eletrodo limpo. B) de 1, 10 e 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MGF e 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MGF em tampão acetato pH 4,5, 20% etanol, $v=10\text{mV s}^{-1}$.



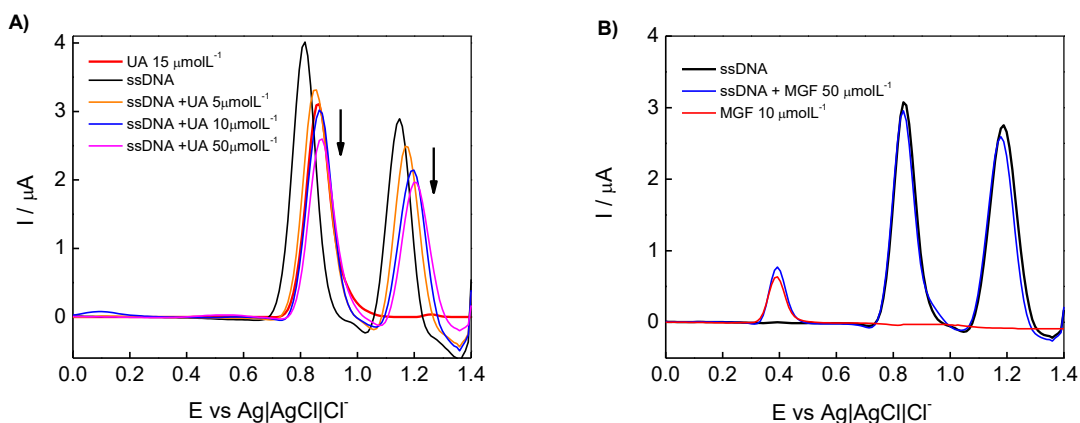
Fonte: Autora, 2018.

Para MGF (Figura 75B), há discreta oxidação das bases quando em contato com o biossensor por 10min. Assim como UA, também ultrapassou o biofilme com sinal em potencial mais positivo de 0,39 para 0,42 V. Haja vista o sinal anódico de MGF não estar comprometido pela oxidação das bases, foram realizados estudos com dsDNA em solução exibidos mais adiante.

4.8.2 Estudo do ssDNA em solução

Quanto aos estudos de interação dos compostos com a solução de ssDNA, os sinais característicos da oxidação das bases guanina em +0,9 V e adenina em +1,2 V em tampão 4,5 foram intensos e bem definidos (Figura 76). Com a adição dos compostos foi observada a redução dos sinais de oxidação das bases que se deu de forma mais intensa para o UA.

Figura 76 - Voltamogramas na VPD do ssDNA em solução na ausência e presença A) de 1, 5, 10 e 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de UA e 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de UA em tampão sem ssDNA, B) de 1, 5, 10 e 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MGF e 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MGF em tampão sem ssDNA. Tampão acetato pH 4,5, 20% etanol, $v=10\text{mV s}^{-1}$.



Fonte: Autora, 2018.

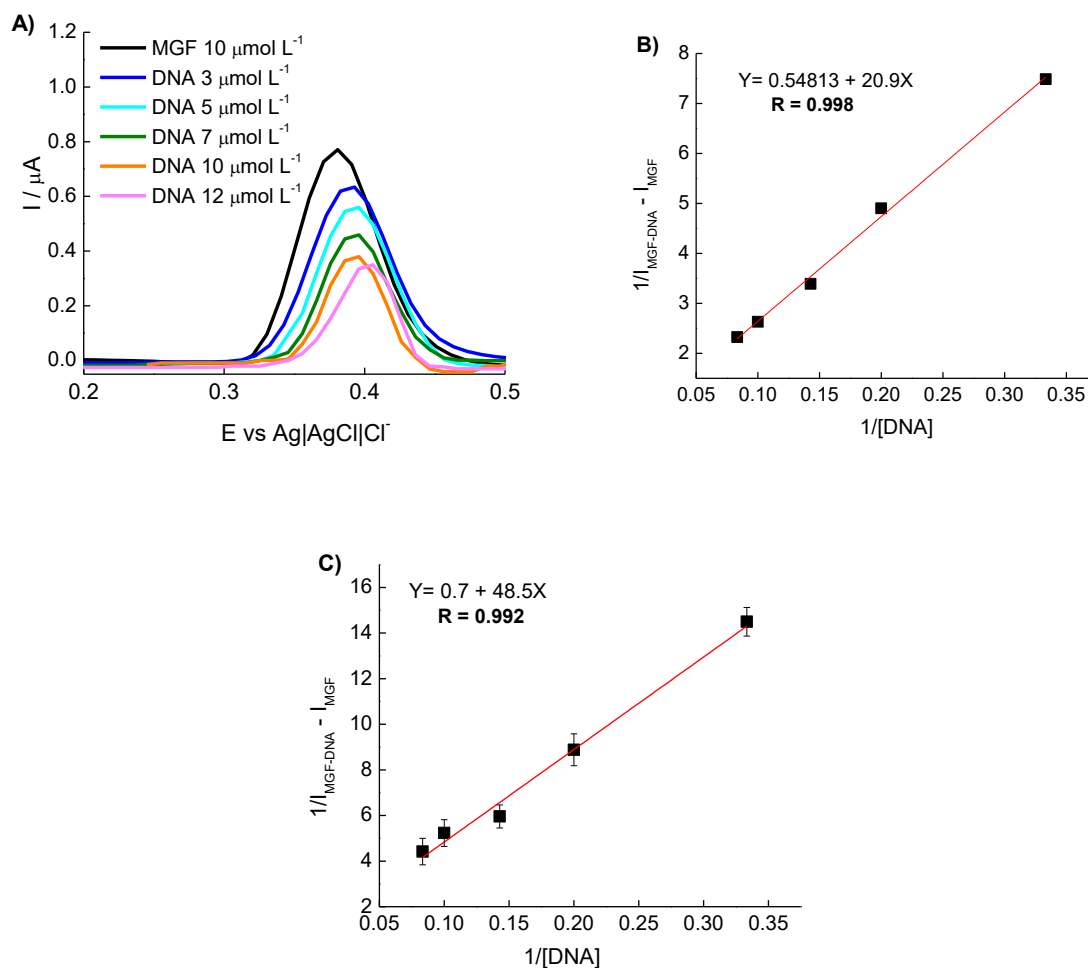
De acordo com os resultados, UA interage significativamente com ssDNA em solução, indisponibilizando parte dos sítios de oxidação das bases com deslocamento de potencial para valores mais positivos (Figura 76A), diferentemente de MGF que a uma concentração equivalente a máxima de UA exibiu uma redução de corrente bem inferior (Figura 76B).

4.8.3 Constante de interação com dsDNA em solução

Com base na interação de MGF demonstrada em biossensor de dsDNA, esta também foi avaliada em dsDNA em solução com determinação de constante de ligação empregando a equação 27, descrita na metodologia, uma adaptação de Benesi-Hildebrand para análises em VPD de sistemas irreversíveis.

A Figura 77A torna clara a interação entre as moléculas, nas condições do experimento. Sob pH 4,5 a MGF encontra-se neutra e DNA carregado negativamente, motivo pelo qual este pH foi escolhido, a priori porque em teoria poderia ser observada maior interação, comprovada pelo valor de constante de ligação K de $2,6 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ (Figura 77B).

Figura 77 - A) Voltamograma de pulso diferencial da MGF a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ na ausência e presença de dsDNA de 3 - $12 \mu\text{mol L}^{-1}$. B) Curva analítica para determinar a K entre MGF e DNA. Tampão 4,5, 10% etanol.



Fonte: Autora, 2018.

Em pH fisiológico Figura 77C, menor ΔI_{pa} foi evidenciada e conseqüentemente menor valor de K, para as concentrações elegidas de DNA, como esperado. A constante de ligação foi de $1,2 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$. As constantes estão concordantes com a literatura, haja vista MGF interagir com como intercalante de DNA (RADI et al., 2010; RADI et al., 2014; TAJIK et al., 2014)

5 CONCLUSÃO

De posse dos dados apresentados no trabalho, podemos concluir que eletrodo modificado com PQ/CDSH tem melhor resposta frente ao UA que uma modificação CDSH sem o semiconductor.

PQs modificados com CDSH em solução aumenta a fluorescência de MGF e UA se comporta como um quenching, havendo diminuição da fluorescência do PQ.

O processo de interação com PAMAM imobilizado não pode ser acompanhado via VC ou VPD por oxidação, já a interação entre o PQ CdSe/CdS e PAMAM, no ITO se mostrou promissora, dada a dupla detecção.

Por eletroquímica, a imobilização tanto de PQ/CDSH como MUA/PAMAM no eletrodo foram caracterizadas por EIE com obtenção dos respectivos valores de R_{ct} de cada etapa, os quais estão concordantes com as modificações realizadas.

O UA apresentou interação de 3×10^{11} moléculas por cm^2 de SAM MUA/PAMAM (imobilizada), calculada através de MECQ, cuja massa foi monitorada por 2h.

Os estudos por UV-vis para determinação de constante de interação mostraram que os compostos de escolha para o trabalho interagiram em grau distinto, de modo espontâneo (ΔG negativo) com os PAMAMs de 1ª a 3ª geração, onde foi possível determinar as constantes de interação. Os melhores resultados foram para MGF e PAMAMG3 com K de $5 \times 10^6 \text{ Lmol}^{-1}$; UA e PAMAMG3 $K = 2,58 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}$ numa relação inversamente proporcional a temperatura; e β -LP com PAMAMG exibiu uma $K = 2,7 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}$ à 25°C .

As 3 gerações de PAMAMs reduzem a fluorescência de MGF, dentre as constantes calculadas G2 apresentou o maior valor, e determinação da K_{sv} e K_a . As demais gerações não se enquadraram no modelo de K_{sv} reforçando a forte afinidade de MGF pelo PAMAMG2.

Parte dos complexos formados foram caracterizados por UV-vis, FTIR e RMNH¹. Onde se observou as mudanças nos espectros que evidenciam o complexo

PAMAM:MGF e PAMAM:UA, para a 2^a e 3^a gerações. A resuspensão mostrou uma estimativa de estequiometria numa relação de número de moléculas do carreador e agente encapsulado, para UA altas concentrações desfavorece o processo, já para MGF favorece.

Quanto a interação dos compostos com DNA, o UA reage com ssDNA em solução reduzindo seu sinal analítico, numa relação dependente da concentração e MGF interage com dsDNA tanto imobilizado como em solução com K de $2,6 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$, num estudo em triplicada por VPD.

6 REFERÊNCIAS

ABDERREZAK, A. et al. Dendrimers Bind Antioxidant Polyphenols and cisPlatin Drug. v. 7, n. 3, p. 1–12, 2012.

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

ANDRADE-NETO, V. F. et al. Antimalarial Activity of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) Ethanol Extracts From Wild Plants Collected in Various Localities or Plants Cultivated in Humus Soil. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 634–639, 2004.

ANDRADE, R. G. et al. The antioxidant effect of tannic acid on the in vitro copper-mediated formation of free radicals. **ABB**, v. 437, p. 1–9, 2005.

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

BARD, A. J. et al. **Electrochemical methods - Fundamentals and Applications**. 2ª edição ed. New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto.: John Wiley & Sons, INC, 2001.

BODEWEIN, L. et al. Differences in toxicity of anionic and cationic PAMAM and PPI dendrimers in zebra fish embryos and cancer cell lines. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 305, p. 83–92, 2016.

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

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

BUSTOS, E. et al. Electrochemical Study of β -Cyclodextrin Binding with Ferrocene Tethered onto a. v. 19, n. 5, p. 1010–1016, 2008.

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

CANDIDO, A. C. L. et al. Electrochemical and spectroscopic characterization of the interaction between β -lapachone and PAMAM derivatives immobilized on surface electrodes. **Journal of Solid State Electrochemistry**, 2018.

CANDIDO, A. C. L. Estudo eletroquímico da interação de quinona de interesse biológico e dendrímeros PAMAM DE 2ª E 3ª geração. Dissertação de mestrado.

Universidade Federal De Alagoas, 2017.

CARRILLO, N. et al. Journal of Colloid and Interface Science Enzymatically synthesized polyaniline film deposition studied by simultaneous open circuit potential and electrochemical quartz crystal microbalance measurements. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 369, n. 1, p. 103–110, 2012.

CAVALCANTI, I. M. F. et al. The encapsulation of β -lapachone in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex into liposomes: A physicochemical evaluation and molecular modeling approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 3, p. 332–340, 2011.

CHEN, X. et al. Investigation of the Crystallization Process in 2 nm CdSe Quantum Dots. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 12, p. 4372–4375, 1 mar. 2005.

DABBOUSI, B. O. et al. (CdSe)ZnS Core-Shell Quantum Dots: Synthesis and Characterization of a Size Series of Highly Luminescent Nanocrystallites. In: **The Journal of Physical Chemistry B**. [s.l.] American Chemical Society, 1997. v. 101p. 9463–9475.

DAVID E. BERGBREITER, YUELONG LIU, MERLIN L. BRUENING, M. Z. AND R. M. C. Multilayer Dendrimer-Poly(anhydride) Nanocomposite Film. In: BLITZ, J. P. (Ed.). **Fundamental and Applied Aspects of Chemically Modified Surfaces**. [s.l.] Jonathan P. Blitz, 1999. p. 68–70.

DE ABREU, F. C. et al. Electrochemical activation of β -lapachone in β -cyclodextrin inclusion complexes and reactivity of its reduced form towards oxygen in aqueous solutions. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 608, n. 2, p. 125–132, 2007.

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

DE LIMA FRANCA, C. C. et al. The electrochemical behavior of core-shell CdSe/CdS magic-sized quantum dots linked to cyclodextrin for studies of the encapsulation of bioactive compounds. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 20, n. 9, p. 2533–2540, 2016.

DE VASCONCELLOS, M. C. et al. Electrochemical, spectroscopic and pharmacological approaches toward the understanding of biflorin DNA damage effects. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 765, 2016.

DEVARAKONDA, B. et al. Effect of pH on the solubility and release of furosemide from polyamidoamine (PAMAM) dendrimer complexes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 345, n. 1–2, p. 142–153, dez. 2007.

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

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

FERREIRA, F. D. R. et al. Electrochemical investigations into host-guest interactions of a natural antioxidant compound with β -cyclodextrin. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 2, 2010.

FERREIRA, G. N. M.; SILVA, A. C. DA; TOME, B. Acoustic wave biosensors : physical models and biological applications of quartz crystal microbalance. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 12, p. 689–697, 2009.

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

GRIFFITHS, DAVID J., **Mecânica Quântica**. Pearson Education Ed.2ª.2011.

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

HIGUCHI, Y. et al. Polyamidoamine dendrimer-conjugated quantum dots for efficient labeling of primary cultured mesenchymal stem cells. **Biomaterials**, v. 32, n. 28, p. 6676–6682, 2011.

HSU, H. J. et al. Dendrimer-based nanocarriers: a versatile platform for drug delivery. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 9, n. 1, p. 1–21, 2017.

HUANG, H.; ZHU, J.-J. The electrochemical applications of quantum dots. **The Analyst**, v. 138, n. 20, p. 5855, 2013.

HUANG, J. et al. Development of an amperometric l-lactate biosensor based on l-lactate oxidase immobilized through silica sol-gel film on multi-walled carbon nanotubes/platinum nanoparticle modified glassy carbon electrode. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, n. 7, p. 1070–1075, 2008.

INGÓLFSDÓTTIR, K. Usnic acid. **Phytochemistry**, v. 61, p. 729–736, 2002.

JORGE, S. M. A. et al. Solid State Electrochemical Behavior of Usnic Acid at a Glassy Carbon Electrode. **Analytical Letters**, v. 43, n. 10–11, p. 1713–1722, 2010.

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

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

LIN, H. et al. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* Spectroscopic investigation of interaction between mangiferin and bovine serum albumin. v. 73, p. 936–941, 2009.

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

MÁRQUEZ-MIRANDA, V. et al. Effect of Terminal Groups of Dendrimers in the Complexation with Antisense Oligonucleotides and Cell Uptake. **Nanoscale Research Letters**, v. 11, n. 1, p. 66, 2016.

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

MELO JR., M. A. et al. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1872–1878, 2012.

MONTANARI, M. L. C. et al. Sistemas transportadores de drogas. **Química Nova**, v. 21, n. 4, p. 470–476, jul. 1998.

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

MURRAY, C. B.; KAGAN, C. R.; BAWENDI, M. G. Synthesis and Characterization of Monodisperse Nanocrystals and Close-Packed Nanocrystal Assemblies. **Annu. Rev.Mater**, v.30, p. 545, 2000

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

NETO, M. A. DE F. L. et al. **Composição farmacêutica para tratamento de infecções HPV utilizando extratos de barbatimão** Brasil Organização Mundial da Propriedade Intelectual, , 2012.

NEWKOME, G. R. et al. Micelles. Part 1. Cascade molecules: a new approach to micelles. A [27]-arborol. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 2003–2004, 1985.

NUNES, P. S. et al. Thermal characterization of usnic acid/collagen-based films. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 99, n. 3, p. 1011–1014, 2010.

PANDE, S.; CROOKS, R. M. Analysis of Poly(amidoamine) Dendrimer Structure by UV-Vis Spectroscopy. **Langmuir**, v. 27, n. 15, p. 9609–9613, ago. 2011.

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

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

PINHEIRO, J. E. et al. Estudo da Inibição de Corrosão do aço carbono em ácido clorídrico na presença de mangiferina Study of the Corrosion Inhibition of Carbon Steel in acidic chloride by Mangiferin. **Revista Matéria**, v. 21, n. 1517–7076, p. 1045–1053, 2016.

POTAPKIN, D. V. et al. Fluorescent quantum dot hydrophilization with PAMAM dendrimer. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 18, n. 5, 2016.

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

RADI, A.; WAHDAN, T.; ANWAR, Z. Electrochemical and Spectroscopic Studies on the Interaction of Gatifloxacin, Moxifloxacin and Sparfloxacin with DNA and Their Analytical Applications. **Electroanalysis**, v. 22, p. 2665–2671, 2010.

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

ROBERTS, J. C.; BHALGAT, M. K.; ZERA, R. T. Preliminary biological evaluation of polyamidoamine (PAMAM) Starburst dendrimers*. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 30, p. 53–65, 1996.

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

SADEKAR, S.; GHANDEHARI, H. Transepithelial transport and toxicity of pamam dendrimers: implications for oral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 571–588, 2012.

SAKAI, N. et al. Electrodeposition of gold nanoparticles on ITO: Control of morphology and plasmon resonance-based absorption and scattering. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 628, n. 1–2, p. 7–15, abr. 2009.

SANTOS, C. S. et al. Morphological and Electrochemical Analysis of a Self-Assembled Monolayer of 3-Mercaptopropionic Acid on Gold Electrode. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 5, p. 1677–1691, 2015.

SILVA, A. C. A. et al. Modified phonon confinement model and its application to CdSe/CdS core-shell magic-sized quantum dots synthesized in aqueous solution by a new route. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 117, n. 4, p. 1904–1914, 2013.

SILVA, A. C. A. **Pontos Quânticos Semicondutores Sintetizados via**

Soluções Coloidais Aquosas: Estudos e Aplicações Nanobiológicas. [s.l.] Universidade Federal de Uberlândia, 2014.

SILVA, A. C. A. et al. Sensors and Actuators B: Chemical Highly stable luminescence of CdSe magic-sized quantum dots in HeLa cells. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 191, p. 108–114, 2014.

STANKOVIC, M. et al. Inclusion complexes with cyclodextrin and usnic acid. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 76, n. 1–2, p. 173–182, 2013.

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

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

SUWANDI, J. S. et al. Inducing tissue specific tolerance in autoimmune disease with tolerogenic dendritic cells. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 33, p. 97–103, 2015.

TAJIK, S.; TAHER, M. A.; BEITOLLAHI, H. Mangiferin DNA biosensor using double-stranded DNA modified pencil graphite electrode based on guanine and adenine signals. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 720–721, p. 134–138, abr. 2014.

TIAN, Z. et al. Spectroscopic and molecular modeling methods to study the interaction between naphthalimide-polyamine conjugates and DNA. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 158, p. 1–15, maio 2016.

TOMALIA, D. A. et al. A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. **Polymer Journal**, v. 17, n. 1, p. 117–132, 1985.

TUANTRANONT, A. et al. Analytica Chimica Acta A review of monolithic multichannel quartz crystal microbalance : A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 687, n. 2, p. 114–128, 2011.

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

WANG, J. et al. Electrodeposition of gold nanoparticles on indium/tin oxide electrode for fabrication of a disposable hydrogen peroxide biosensor. **Talanta**, v. 77, n. 4, p. 1454–1459, fev. 2009.

WU, C. C.; LIN, C. H.; WANG, W. S. Development of an enrofloxacin immunosensor based on label-free electrochemical impedance spectroscopy. **Talanta**, v. 79, n. 1, p. 62–67, 2009.

YÁÑEZ, C. Cyclodextrin Modified electrodes and its application to

pharmaceutical analysis. In: NÚÑEZ-VERGARA, J. A. S. S. B. L. J. (Ed.). . **Electroanalytical aspects of biological significance compounds**. Kerala, India: [s.n.]. p. 33–50.

YU, W. W. et al. Experimental Determination of the Extinction Coefficient of CdTe , CdSe , and CdS Nanocrystals. v. 125.

7 PERSPECTIVAS

Tendo em vista que o presente trabalho é um ramo de um projeto maior, parte não foi concluída. Dentre os pontos importantes da sequência metodológicas estão:

- Uso de lipossomas na separação e identificação dos taninos presentes no extrato de barbatimão.
- Empregar bioconjugação de proteínas nos pontos quânticos (CdSe/CdS e CdSe), no desenvolvimento de metodologias diagnósticas e detecção ultra-sensível.
- Imobilização de PAMAM com terminação amina de gerações maiores, 4^a e 5^a, nos pontos quânticos e avaliar estudos em células, pois estudos de microscopia confocal de varredura a laser demonstraram que estes entram mais facilmente nas células por endocitose (SHCHARBIN; KLAJNERT; BRYSEWSKA, 2010).

8 ANEXO I

8.1 Artigos publicados:

1. CANDIDO, ANNA CAROLINE LIMA; DA SILVA, MARILYA PALMEIRA GALDINO; DA SILVA, EMANUELLA G.; DE ABREU, FABIANE CAXICO. Electrochemical and spectroscopic characterization of the interaction between β -lapachone and PAMAM derivatives immobilized on surface electrodes. *Journal of Solid State Electrochemistry*. v.22, p. 1581 - 1590, 2018.

2. KATHERINE LOZANO; FERREIRA, F. R.; SILVA, E. G.; DOS SANTOS, R.C.; GOULART, M. O. F.; SOUZA, S. T.; FONSECA, E. J. S.; YANEZ, C.; SIERRA-ROSALES, P.; DE ABREU, FABIANE CAXICO. Electrochemical and associated techniques for the study of the inclusion complexes of thymol and β -cyclodextrin and its interaction with DNA. *Journal of Solid State Electrochemistry*, v.22, p. 1483 - 1493, 2018.

3. DE LIMA FRANÇA, CAIO CESAR; DA SILVA TERTO, EMANUELLA G.; DIAS-VERMELHO, MARCOS V.; SILVA, ANIELLE CHRISTINE A.; DANTAS, NOELIO O.; DE ABREU, FABIANE CAXICO. The electrochemical behavior of core-shell CdSe/CdS magic-sized quantum dots linked to cyclodextrin for studies of the encapsulation of bioactive compounds. *Journal of Solid State Electrochemistry*, v.20, p. 1 - 8, 2016.

8.2 Capítulo de Livro:

CANDIDO, ACL; SILVA, MPG; SILVA, EG; GALDINO, FCA; AQUINO, TM. Tendências e Progressos da Eletroquímica e Eletroanalítica no Brasil. CAPÍTULO 1: Caracterização eletroquímica da interação entre compostos bioativos e dendrímero pamam imobilizado na superfície do eletrodo de ouro. Editora Atena 2018.

ARTIGOS PUBLICADOS

Journal of Solid State Electrochemistry (2018) 22:1581–1590
<https://doi.org/10.1007/s10008-018-3880-8>

ORIGINAL PAPER



Electrochemical and spectroscopic characterization of the interaction between β -lapachone and PAMAM derivatives immobilized on surface electrodes

Anna Caroline Lima Candido¹ · Marilya Palmeira Galdino da Silva¹ · Emanuella G. da Silva¹ · Fabiane Caxico de Abreu¹

Received: 17 July 2017 / Revised: 21 December 2017 / Accepted: 5 January 2018 / Published online: 22 January 2018
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

The β -lapachone (β LP) is a very promising antitumor drug, but its low solubility in water limits its clinical application. This work reports the study of encapsulation of β LP, a quinone with polyamidoamine dendrimers (PAMAM) immobilized on the surface of the carbon nanotubes and gold electrodes. This polymer can form complexes with bioactive substances, having low toxicity and an excellent drug delivery system. The electrochemical techniques proved to be an important tool for the study of the inclusion complex, and electrochemical measurements were obtained by the cyclic voltammetry technique in a protic medium (sodium sulfate, 0.2 mol L⁻¹ with 5% of the ethanol). To calculate the constant (K) interaction and the number of activation sites (n) between dendrimer and β LP, the working gold electrode was modified with 11-mercaptoundecanoic acid (MUA) and PAMAM (MUA/PAMAM) and the values obtained from them, using the equation adapted from Scatchard-Klotz, were $K = 2.9 \times 10^6$ M⁻¹ and $n = 22.77$, respectively. Observing the generated voltammograms and impedance experiments, we can note a much larger and significant interaction between the quinone with PAMAM and the MUA/PAMAM electrode than with MUA alone or without modification. FTIR and UV-Vis studies were also performed to demonstrate the formation of an inclusion complex among β LP and PAMAM.

Keywords Electrochemistry · Encapsulation · β -Lapachone · Impedance spectroscopy

Introduction

β -Lapachone (β LP; 3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphtho[1,2-b]pyran-5,6-dione; also named as ARQ501 or ARQ761 in clinical form) is a naturally occurring quinone originally isolated from the bark of South American lapacho trees (*Tabebuia avellanae*) [1, 2]. β LP exerts a number of pharmacological actions, including antibacterial, antifungal, antimalarial, antiangiogenic, and anti-inflammatory activities [3–6]. In addition, β LP also exerts significant anticancer activity against some known cancer cell lines, including the breast, lung, hepatoma, osteosarcoma, and pancreatic ones [2]. Although several groups have preventative or therapeutic effects of β LP on various cell types and diseases, the method

for improving their solubility in aqueous medium is still necessary, owing to their valuable pharmacological properties. Previous reports of the association of this quinone with some carriers were found in other studies, such as cyclodextrin, liposomes, and linear polymers, but problems were still encountered between all of them [7–9].

In recent years, polymer-based nanomedicine has received increasing attention because of its ability to improve therapeutic efficacy in cancer treatments [10]. Dendritic scaffold has been found to be a suitable carrier for a variety of drugs, including anticancer, antiviral, antibacterial, antitubercular, and others, with the capacity to improve solubility and bioavailability of poorly soluble drugs [11]. A promising alternative to solubilize β LP in aqueous media is the use of dendrimers, highly branched polymers that have physicochemical properties, such as a high control in their architecture, size, shape, density, and surface groups with many functionalities, which are ideal carriers in biomedical applications, as in drug transport at specific sites in the biological system [12]. Among the available dendrimers, the polyamidoamine

✉ Fabiane Caxico de Abreu
caxico.fabiane@gmail.com

¹ Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL 57072-900, Brazil



Electrochemical and associated techniques for the study of the inclusion complexes of thymol and β -cyclodextrin and its interaction with DNA

Katherine Lozano¹ · Fabricia da Rocha Ferreira¹ · Emanuella G. da Silva¹ · Renata Costa dos Santos¹ · Marília O. F. Goulart¹ · Samuel T. Souza² · Eduardo J. S. Fonseca² · Claudia Yañez³ · Paulina Sierra-Rosales⁴ · Fabiane Caxico de Abreu¹

Received: 15 July 2017 / Revised: 3 September 2017 / Accepted: 10 October 2017
 © Springer-Verlag GmbH Germany 2017

Abstract Thymol, a potent agent for microbial, fungal, and bacterial disease, has low aqueous solubility and it is genotoxic, i.e., is capable of damaging deoxyribonucleic acid (DNA). This possible problem of DNA toxicity needs to be solved to allow the use of different doses of thymol. This study characterized the inclusion compound containing thymol and β -cyclodextrin (β -CD) by measuring the interaction between these two components and the ability of thymol to bind DNA in its free and β -CD complexed form. The encapsulation approach using β -CD is particularly useful when controlled target release is desired, and a compound is insoluble, unstable, or genotoxic. The interaction between thymol and DNA has been studied using electrochemical quartz crystal microbalance (EQCM), atomic force microscopy (AFM), and differential pulse voltammetry (DPV). The characterization of the inclusion complex of thymol and β -CD was analyzed by UV-vis spectrophotometry, cyclic voltammetry, and scanning electrochemical microscopy (SECM). Based on the free β -CD by spectrophotometry method, the association constant of thymol with the β -CD was estimated to be

$2.8 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$. The AFM images revealed that in the presence of small concentrations of thymol, the dsDNA molecules appeared less knotted and bent on the mica surface, showing significant damage to DNA. The SECM and voltammetry results both demonstrated that the interaction of thymol- β -CD complex was smaller than the free compound showing that the encapsulation process may be an advantage leading to a reduction of toxic effects and increase of the bioavailability of the drug.

Keywords Thymol · β -Cyclodextrin · AFM · SECM · EQCM · DPV

Introduction

Thymol is a natural phenol found in various plant species, including the Lamiaceae and Verbenaceae families [1]. Thymol (2 isopropyl-5 methyl phenol, Scheme 1) is a major component of the essential oils extracted from *Thymus vulgaris* (40% oil) and *Lippia sidoides* (66% oil) [2–4]. For centuries, thymol has been used to flavor home remedies, perfume, and insecticide. Medicinally, it is used as a spasmolytic, antibacterial, antifungal, expectorant, antiseptic, anthelmintic, and antitussive [4–6]. These properties are attributed to the presence of phenolic compounds such as thymol, carvacrol, and hydrocarbons [7–9]. Thymol alone is toxic to larvae of *B. microplus* [10] and a potent antioxidant [2, 3], therefore exhibiting larvicidal and repellent properties.

Thyme volatiles, principally thymol and the other phenol compounds, and carvacrol are usually present in human food, beverages, pharmaceuticals, perfumes, and cosmetics [11, 12]. Thymol is present at low levels in human food; however, if the

✉ Fabiane Caxico de Abreu
 caxico.fabiane@gmail.com

¹ Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL 57072-900, Brazil

² Grupo de Óptica e Nanoscopia (GON), Instituto de Física, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL 57072-900, Brazil

³ Centro de Investigación de los Procesos Redox (CIPREx), Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, 8380492 Santiago, Chile

⁴ Programa Institucional de Fomento a la Investigación, Desarrollo e Innovación, Universidad Tecnológica Metropolitana, Ignacio Valdivieso 2409, P.O. Box 8940577, Santiago, San Joaquín, Chile



The electrochemical behavior of core-shell CdSe/CdS magic-sized quantum dots linked to cyclodextrin for studies of the encapsulation of bioactive compounds

Caio Cesar de Lima França¹ · Emanuella G. da Silva Terto¹ ·
Marcos V. Dias-Vermelho² · Anielle Christine A. Silva³ · Naelo O. Dantas³ ·
Fabiane Cavico de Abreu¹

Received: 27 October 2015 / Revised: 26 March 2016 / Accepted: 18 April 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract Semiconductor nanocrystal quantum dots have been the subject of extensive investigations in different areas of science and technology in the past years. In particular, there are few studies of magic-sized quantum dots (MSQDs), even though they exhibit features such as extremely small size, fluorescence quantum efficiency, molar absorptivity greater than traditional QDs, and highly stable luminescence in HeLa cell cultures, thereby enabling monitoring of biological or chemical processes. The present study investigated the electrochemical behavior of free CdSe/CdS MSQDs using glassy carbon electrode and CdSe/CdS MSQDs immobilized on a gold electrode modified with a self-assembled cyclodextrin monolayer. The MSQDs showed two peaks in aprotic medium. The functionalized film modifier was prepared and characterized by means of cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy using ferricyanide ions as a redox probe. The prepared modified electrode exhibited a stable behavior. The proposed method was successfully applied to encapsulation studies of mangiferin, a natural antioxidant compound, and cyclodextrin associated with the quantum dot, and the response was compared with that of the modified electrode without QD. The fluorescence study revealed that CdSe/CdS quantum dots emit blue light when

excited by an optical source of wavelength of 350 nm and a significant increase in fluorescence and absorbance intensity is observed from the core-shell CdSe/CdS MSQDs when quantities of mangiferin are added to the solution containing thiolated cyclodextrin. CdSe/CdS MSQDs are optically and electrochemically sensitive and can be used for the detection and interaction of compounds encapsulated in cyclodextrin.

Keywords CdSe/CdS MSQDs · Electrochemistry · Encapsulation · β -Cyclodextrin · Impedance spectroscopy

Introduction

Quantum dots (QDs) are nanocrystals that exhibit optical properties depending on the quantum confinement of the light. Their photophysical effects have been investigated since the earliest studies following its discovery [1–5]. More specifically, the absorption and emission spectra of CdSe QDs can be tuned from blue to red in the electromagnetic spectrum depending on their size and shape [6]. This makes them a suitable candidate material for use in solid-state devices, such as LED displays or high-density optical memory [7, 8], or chemical and biological sensors [9, 10]. For biological applications, especial attention is devoted to drug delivery/activation and cell imaging. Magic-sized nanocrystals (MSQDs) are ultras-small quantum dots (USQDs) with extraordinary physical properties compared to traditional QDs. These MSQDs have a thermodynamically stable structure, broad emission spectra, fluorescence quantum efficiency and molar absorptivity greater than traditional QDs [11, 12], and highly stable luminescence in uterine cell cultures [13]. They have therefore enabled advances to be made in the study of monitoring of biological or chemical processes and intracellular

✉ Fabiane Cavico de Abreu
cavico.fabiano@gmail.com

¹ Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL 57072-900, Brazil

² Instituto de Física, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL 57072-900, Brazil

³ Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores (LNMB), Instituto de Física, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG 38400-902, Brazil

CAPÍTULO DE LIVRO



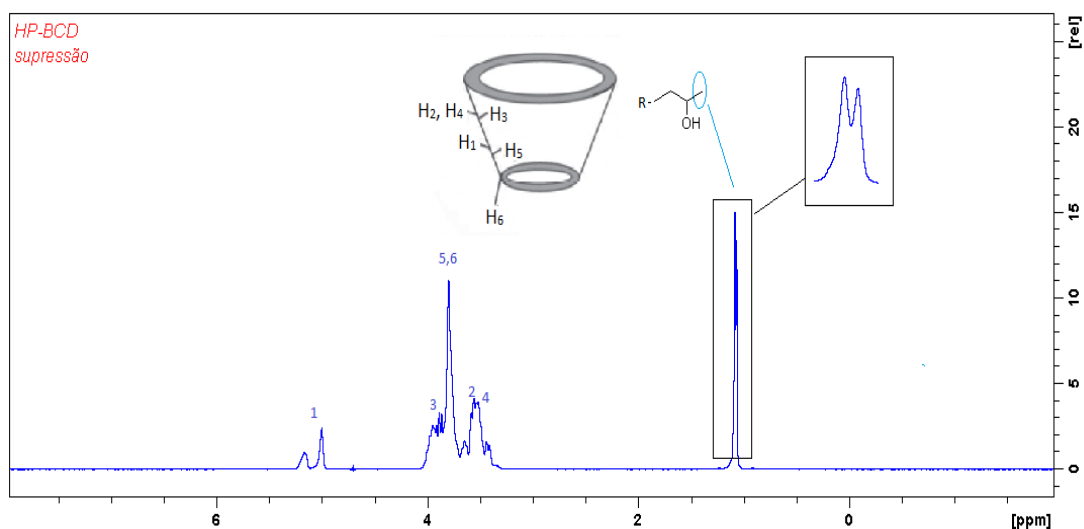
SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO 1 | 1 |
| CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DA INTERAÇÃO ENTRE COMPOSTOS BIOATIVOS E DENDRÍMERO PAMAM IMOBILIZADO NA SUPERFÍCIE DO ELETRODO DE OURO | |
| <ul style="list-style-type: none"> Anna Caroline Lima Candido Marliya Palmeira Galdino da Silva Emanuela Gomes da Silva Fabiane Caxico de Abreu Galdino Thiago Mendonça de Aquino | |
| CAPÍTULO 2 | 18 |
| CARACTERIZAÇÃO MOTT-SCHOTTKY EM CÉLULA FOTOVOLTAICA DE SILÍCIO | |
| <ul style="list-style-type: none"> Francisco Marcone Lima Vanja Fontenele Nunes Antonio Paulo Santos Souza Ana Fabíola Leite Almeida Francisco Nivaldo Aguiar Freire | |
| CAPÍTULO 3 | 26 |
| ELECTRODEPOSITION OF CADMIUM TELLURIDE ON CONDUCTIVE GLASS FOR PHOTOVOLTAIC APPLICATIONS | |
| <ul style="list-style-type: none"> Raquele Lima Moreira Francisco Nivaldo Aguiar Freire Ana Fabíola Leite Almeida Francisco Marcone Lima Paulo Herbert França Maia Júnior Manuel Pedro Fernandes Graça | |
| CAPÍTULO 4 | 36 |
| NANOPARTÍCULAS DE HEXACIANOFERRATO DE RUTÊNIO PARA REAÇÃO DE ELETRO-OXIDAÇÃO DE GLICEROL | |
| <ul style="list-style-type: none"> Deracilde Santana da Silva Viégas Deranilde Santana da Silva Ismael Carlos Braga Alves Isaíde de Araújo Rodrigues Aldalea Lopes Brandes Marques | |
| CAPÍTULO 5 | 53 |
| UTILIZAÇÃO DE POLIACRILAMIDA-CO-DIALILDIMETILAMÔNIO COMO IMOBILIZADOR DE CUO NA REDUÇÃO ELETROQUÍMICA DE CO ₂ | |
| <ul style="list-style-type: none"> Ruan Roberto Henriques Jorge Amim Júnior Ana Lucia Shiguihara Robson Valentim Pereira Kênia Silva Freitas | |

9 ANEXO II

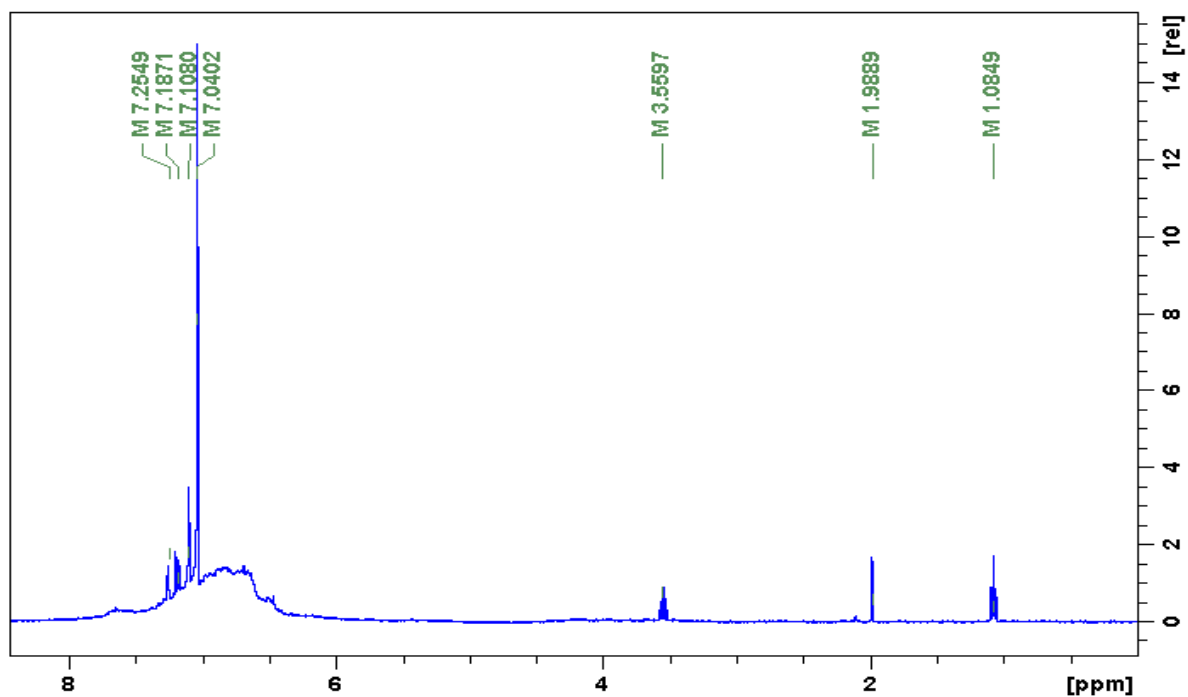
9.1 Espectros e voltamogramas complementares

Figura 78 - Espectro de RMN-¹H da HP-β-CD.



Fonte: autora, 2018.

Figura 79 - Espectro de RMN ¹H do ácido tânico.



Fonte: autora, 2018.

Figura 80 - Espectros de PAMAM G1

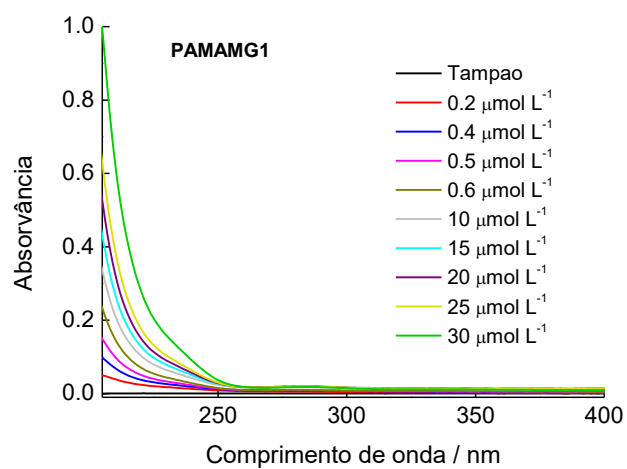


Figura 81 - Espectros de PAMAM G2

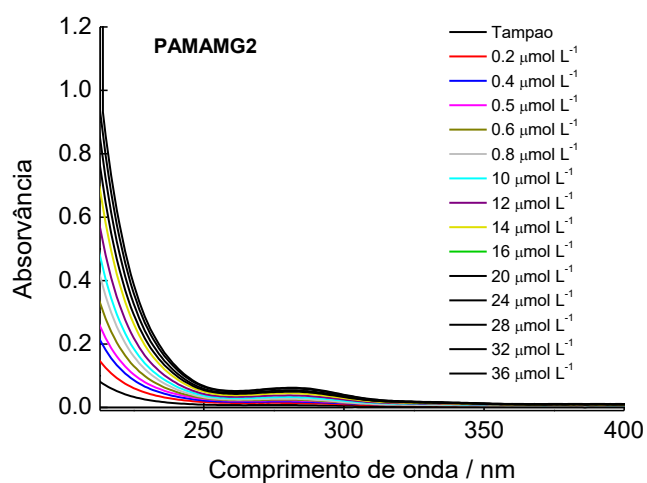
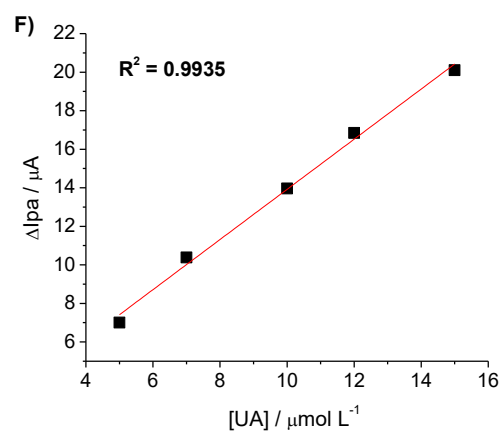
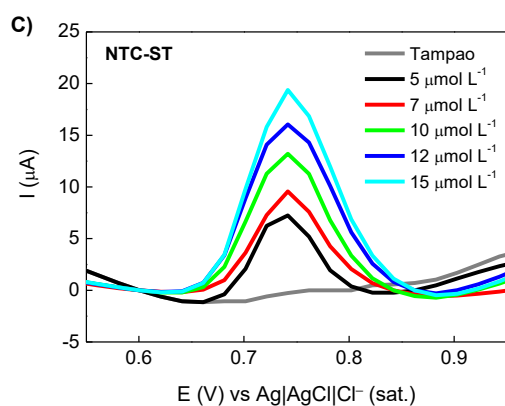
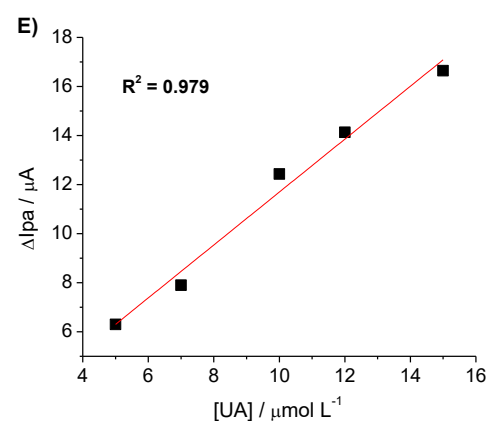
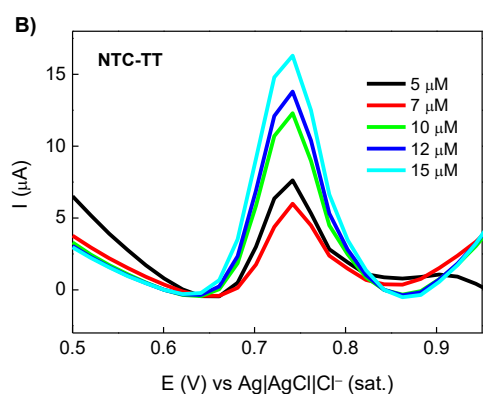
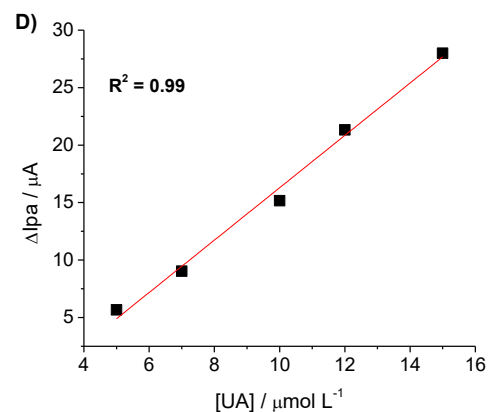
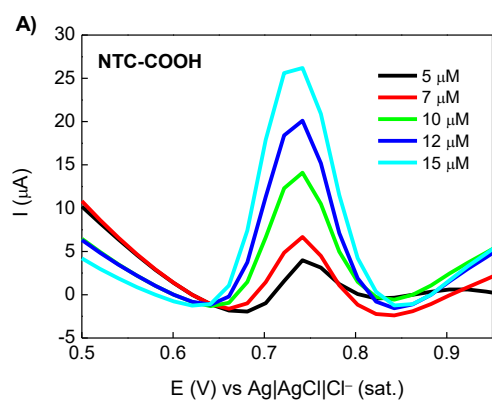
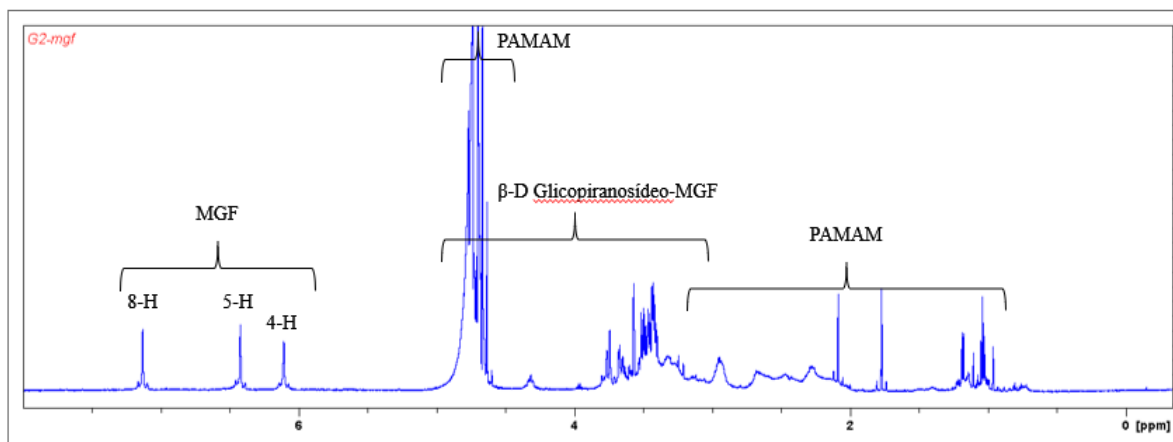


Figura 82 - Voltamogramas de UA em eletrodos modificados com NTCs. A) NTC com grupocarboxila; B) sem tratamento ácido e C) após tratamento com ácido nítrico; D); E) e F) as respectivas curvas.



Fonte: Autora, 2018.

Figura 83 - Espectros de RMN H¹ para PAMAMG2 e MGF.



Fonte: Autora, 2018.

O espectro de RMN H¹ obtido em D₂O, a temperatura de 19 °C, está concordante com a literatura para os deslocamentos químicos tanto do PAMAM como de MGF (GÓMEZ-ZALETA et al., 2006). As devidas atribuições estão identificadas. O complexo com PAMAMG2 foi realizado na proporção de n° de aminas terminais, ou seja, para cada 1 mol de PAMAM foi posto em contato com 16 mol de MGF, este apresentou identificação e resolução, de modo que para o PAMAMG3 e G1, mesmo após um número de scan de 1536, para esses carreadores complexados. Enquanto que para o G2, um número de scan 256 foi suficiente para identificação dos sinais.

Assim, outras razões de complexação devem ser testadas, afim de encontrar a estequiometria de máxima complexação. Com isso, pode-se inferir que não há uma relação direta entre o número de aminas primárias terminais e o dos compostos MGF e AU, pois estes se mostraram muito diluídos para análise de RMN, mesmo após um alto tempo de acumulação, sendo que todos os cálculos tomaram como base uma concentração de PAMAM fixa e igual para todas as gerações, variando a biomolécula.