

**ESTUDOS ELETROQUÍMICOS DO
2-[*p*-NITROFENIL(HIDROXI)METIL] ACRILATO DE METILA - UM
FÁRMACO ANTITUMORAL E SUA REATIVIDADE FRENTE A
GSH, dsDNA E OXIGÊNIO**

Antonio Albuquerque de Souza

**Fevereiro de 2007
Maceió/AL**



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

**ESTUDOS ELETROQUÍMICOS DO
2-[*p*-NITROFENIL(HIDROXI)METIL] ACRILATO DE METILA - UM
FÁRMACO ANTITUMORAL E SUA REATIVIDADE FRENTE A
GSH, dsDNA E OXIGÊNIO**

Antonio Albuquerque de Souza

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

Orientadora: Profa. Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino

Co-Orientadora: Profa. Dra. Marília O. F. Goulart

Maceió - AL

Fevereiro de 2007

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

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

- S729e Souza, Antonio Albuquerque de.
Estudos eletroquímicos do 2[p-nitrofenil (hidroxi)metil] acrilato de metila :
um fármaco antitumoral e sua reatividade frente a GSH, dsDNA e oxigênio /
Antonio Albuquerque de Souza, 2007.
99 f. : il. tabs., grafs.
- Orientadora: Fabiane Caxico de Abreu Galdino.
Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal
de Alagoas. Centro de Ciências Exatas. Instituto de Química. Maceió, 2007.
- Bibliografia: f. 98-99.
1. Eletroquímica. 2. Glutaciona (GSH). 3. dsDNA. 4. Farmacoeletróquímica.
I. Título.

CDU: 544.6



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

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

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

Membros da Comissão Julgadora de Defesa de Dissertação de Mestrado de Antônio Albuquerque de Souza, intitulada: "*Estudos Eletroquímicos do 2[p-Nitrofenil (Hidroxi) Metil] Acrilato de Metila – Um Fármaco Antitumoral e sua Reatividade frente a GSH, dsDNA e O₂*", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 22 de fevereiro de 2007, às 08:30 horas na sala da Pós – Graduação do PPGQB.

COMISSÃO JULGADORA

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

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

Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota
IQ/UNICAMP

Prof. Dr. Josealdo Tonholo
IQB/UFAL

A Deus

*Se você fez presente em todos os momentos, firmes ou trêmulos.
E, passo a passo pude sentir a sua mão na minha,
transmitindo-me a segurança necessária para enfrentar meu
caminho e seguir...
A sua presença é qualquer coisa como a luz e a vida,
e eu sinto que em meu gesto existe o seu gesto e a minha voz, a
sua voz.*

Vinícius de Moraes

À minha mãe Divani, que de maneira especial nunca deixou de expressar seu apoio, contribuindo intensamente para minha plena formação.

Agradeço

À Prof^a. Marília Goulart e Fabiane Caxico, por me permitirem fazer parte do grupo, e por todos os ensinamentos, incentivo, e o grande apoio que tenho recebido;

À Janesmar Camilo, que me deu a oportunidade de fazer parte do grupo de eletroquímica, sendo também responsável por esse momento.

Agradecimentos

ao meu pai e meus irmãos, que estiveram presentes nos momentos decisivos e importantes da minha vida;

à professora Dr. Wanda P. Almeida, que nos presenteou com as amostras que resultaram neste trabalho;

ao Écio Sales, que além da grande amizade que espero preservar, me permitiu continuar esse trabalho tão gratificante;

ao Paulo, pela grande ajuda na organização das figuras e sumário;

aos grandes amigos que me acompanharam na graduação, Alan John, Wanessa e Katiana, pelo grande apoio e a convivência tão gratificante;

aos amigos e colegas de trabalho Sandra Mary, Alane, Danielle, Paulo, Cícero, Phabyanno, Francne e Aline pelos bons momentos desfrutados;

à todos do Grupo de Eletroquímica, pela boa convivência, até o presente momento.

aos amigos que se fizeram presentes agora, assim como em todos os outros momentos tão necessários;

a CAPES, pela bolsa concedida durante o desenvolvimento desse trabalho,

a FAPEAL, CAPES E CNPq pelo apoio financeiro ao grupo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. NEOPLASIAS	3
1.2. COMPOSTOS NITROAROMÁTICOS.....	6
1.3. GLUTATIONA E O AMBIENTE CELULAR REDOX	11
1.4. BIOSSENSOR DE DNA.....	15
1.5. ADUTOS DE BAYLIS-HILLMAN	19
2. OBJETIVOS	23
3. EXPERIMENTAL	24
3.1. PRODUTOS QUÍMICOS E SOLVENTES.....	24
3.2. INSTRUMENTOS	25
3.3. PREPARO DAS SOLUÇÕES TAMPÃO	25
3.4. ESTUDOS ELETROQUÍMICOS.....	26
3.4.1. ELETRODOS E CELAS.....	26
3.4.2. TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS	27
3.4.3. ELETRÓLISE	27
3.5. ESTUDOS EM PRESENÇA DE GLUTATIONA	31
3.5.1. ELETRÓLISE EM POTENCIAL CONTROLADO	31

3.6. ESTUDOS VOLTAMÉTRICOS DE 2 EM BIOSENSOR DE dsDNA	32
3.6.1. PREPARAÇÃO DO GEL DE dsDNA.....	32
3.6.2. PREPARAÇÃO DO BIOSENSOR DE dsDNA.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1. ESTUDOS EM MEIO APRÓTICO	35
4.1.1. VOLTAMETRIA CÍCLICA.....	35
4.1.2. VOLTAMETRIAS DE PULSO DIFERENCIAL E ONDA QUADRADA.....	41
4.2. ESTUDOS EM MEIO PRÓTICO	42
4.2.1. ESTUDOS EM MEIO NEUTRO	43
4.2.1.1. VOLTAMETRIA CÍCLICA.....	43
4.2.1.2. VOLTAMETRIAS DE PULSO DIFERENCIAL E ONDA QUADRADA.....	46
4.2.2. ESTUDO EM MEIO ALCALINO	49
4.2.3. ELETRÓLISE EM POTENCIAL CONTROLADO	51
4.3. ESTUDO ELETROQUÍMICO DE 2 EM BIOSENSOR DE dsDNA.....	54
4.4. COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DE 2 EM PRESENÇA DE GLUTATIONA... 57	
4.4.1. MEIO FOSFATO.....	57
4.4.2. MEIO BICARBONATO.....	62
4.4.3. ELETRÓLISE EM PRESENÇA DE GSH.....	63
4.4.4. COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DE 2 EM PRESENÇA DE O ₂	64
4.4.5. ESTUDO DA REATIVIDADE QUÍMICA DE 2 COM GLUTATIONA.....	66
4.5. ESTUDOS DA ESTABILIDADE DO ÂNION RADICAL NITRO.....	67
5. CONCLUSÕES	77
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
7. TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS	85
8. PREMIAÇÕES EM CONGRESSOS	87
9. ANEXOS	88

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Geração de espécies oxigenadas reativas após redução do grupo nitro e desintoxificação, pelo emprego de catalase e superóxido-dismutase (S.O.D.).2
- Figura 2. O modelo dos três estágios da carcinogênese e o efeito nos níveis de carcinogênese vs níveis de radicais livres em vários estágios dos processos carcinogênicos (A) [Adaptado de VALKO et al., 2006]..... 4
- Figura 3. Secção transversal de um tumor sólido, mostrando a diminuição da concentração de oxigênio em relação à distância capilar [Adaptado de OLIVEIRA; ALVES, 2002]..... 5
- Figura 4. Liberação de espécies ativas após redução em células hipóxicas de (a) um nitroaromático e (b) um nitroimidazol [Adaptado de JAFFAR et al., 2001]. 9
- Figura 5. Esquema da redução de nitrocompostos aromáticos. [Adaptado de Tocher, 1997]..... 10
- Figura 6. Interconversão de glutathiona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutathiona peroxidase (GSH-Px), glutathiona oxidase (GO) e glutathiona redutases (GR) [ROVER JÚNIOR et al., 2000]..... 13
- Figura 7. Representação esquemática da dupla fita de DNA. Ligações de hidrogênio entre as nucleobases..... 16
- Figura 8. Voltamograma de pulso diferencial obtido com eletrodo de carbono vítreo modificado com DNA ($60 \mu\text{g mL}^{-1}$) em uma solução de tampão acetato 0,1 M, pH 4,5: 1° voltamograma do ssDNA (linha vermelha) e dsDNA (linha preta), 40° voltamograma do dsDNA (linha pontilhada) [DICULESCU et al., 2005]... 18
- Figura 9. Reação de Baylis-Hillman [CLAYDEN, 2005]..... 20
- Figura 10. Reação tipo adição de Michael a enzimas polimerases envolvidas nos processos de divisão celular [CLAYDEN, 2005]. 21
- Figura 11. Espectro de massa de massa do produto da redução de 2..... 29
- Figura 12. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 250,13 MHz) do produto de redução de 2. 30
- Figura 13. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,90 MHz) do produto de redução de 2. 30

Figura 14. Representação da cela eletroquímica utilizada em biossensor de DNA.	33
Figura 15. Voltametria cíclica em meio aprótico DMF/TBAP 0,1 mol L ⁻¹ , carbono vítreo, [1] = [2] = 2 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ . ν = 0,100 V s ⁻¹ . A: composto 1. B: composto 2.	36
Figura 16. Esquema representativo da provável redução de 2 em DMF/TBAP.....	38
Figura 17. Voltamogramas cíclicos de 2 (2 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹) em meio aprótico DMF+TBAP 0,1 molL ⁻¹ , carbono vítreo. A: ν = 0,035 V s ⁻¹ ; B: ν = 0,100 V s ⁻¹ ; C: ν = 1,000 V s ⁻¹ , em varreduras sucessivas.....	39
Figura 18. Provável mecanismo para a decomposição da hidroxilamina em meio aprótico.....	39
Figura 19. Voltametria de pulso diferencial de 2 (2 x 10 ⁻³ mmol L ⁻¹) em meio aprótico DMF / TBAP 0,1 mol L ⁻¹ , carbono vítreo, ν = 0,005 V s ⁻¹ e a = 0,050 V.....	41
Figura 20. Voltametria de onda quadrada de 2 (2 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹) em meio aprótico DMF / TBAP 0,1 mol L ⁻¹ , carbono vítreo, f = 30 Hz.	42
Figura 21. Voltametria cíclica de 2 (1 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹) em meio prótico tamponado (etanol + tampão fosfato: 1/9, 0,1 mol L ⁻¹), carbono vítreo. A: ν = 0,035 V s ⁻¹ . B: ν = 0,100 V s ⁻¹ . C: Varreduras sucessivas a ν = 0,100 V s ⁻¹ . D: I_{pc1} vs $\nu^{1/2}$. E: I_{pc1} vs ν . F: E_{pc1} vs log ν	44
Figura 22. Redução do grupo nitro em meio prótico.	45
Figura 23. Voltametria cíclica de 2 (1 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹) em meio prótico tamponado (etanol+tampão fosfato: 1/9, 0,1 mol L ⁻¹ Varredura), carbono vítreo. A: sucessiva a ν = 0,100 V s ⁻¹ . B e C: E_{ap} .=-0,9 V, por 120 s.	46
Figura 24. Voltamogramas de 2 (1 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹) em meio prótico (etanol + tampão fosfato:1/9, 0,1 mol L ⁻¹), carbono vítreo. A: Pulso diferencial, ν = 0,005 V s ⁻¹ . B: Onda quadrada, f = 30 Hz.	47
Figura 25. Voltametria de onda quadrada de 2 (1,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹) em meio prótico tamponado (etanol + tampão fosfato: (1:9) 0,1 mol L ⁻¹), carbono vítreo. A: E_{ap} .= - 0,8 V / Direção: Redução, f = 10 Hz. B: E_{ap} .= -0,8 V / Direção:	

Oxidação, $f = 10$ Hz. C: $E_{ap.} = -0,8$ V / Direção: Redução, $f = 80$ Hz. D: $E_{ap.} = -0,8$ V / Direção: Oxidação, $f = 80$ Hz.....	48
Figura 26. Voltamogramas cíclicos de 2 ($2,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹) em meio prótico, DMF/tampão fosfato + NaOH (1:9), pH 9,4, 0,1 mol L ⁻¹ . A: $v = 0,035$ V s ⁻¹ . B: varreduras sucessivas, $v = 0,035$ V s ⁻¹	50
Figura 27. Voltamogramas cíclicos de 2 ($1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹) em meio prótico, etanol/bicarbonato + NaOH (1:9), pH 9,4. A: $v = 0,100$ V s ⁻¹ . B: varredura sucessiva, $v = 0,100$ V s ⁻¹	50
Figura 28. A: Eletrólise de 2 em $E_{ap} = -0,950$ V. B: Voltametria cíclica, antes e após a eletrólise, $v = 0,100$ V s ⁻¹ . C: Voltametria cíclica do produto de eletrólise, $v = 0,100$ V s ⁻¹ . D: Espectro no UV-Vis durante a eletrólise. E: espectro no UV-Vis, em EtOH + tampão fosfato (2:8), pH 6,9, do produto isolado.....	52
Figura 29. Provável mecanismo para formação do dímero, após redução do grupo nitro a hidroxilamina.....	53
Figura 30. Voltamograma de pulso diferencial do eletrodo de carbono vítreo limpo e modificado com dsDNA, tampão acetato, pH 4,5, após ciclagem entre 0 e 1,4 V. $v = 0,005$ V s ⁻¹ e $a = 0,050$ V.....	55
Figura 31. Voltamograma de pulso diferencial de 2 em um biossensor de dsDNA, tampão acetato, pH 4,5. A: Voltamograma obtido antes da redução. B: Voltamograma obtido após redução.....	56
Figura 32. Voltametria cíclica de 2 em presença de GSH. A: meio prótico (etanol + tampão fosfato + NaOH (1:9) $v = 0,035$ V s ⁻¹ . B: meio prótico (DMF/tampão fosfato + NaOH (1:9), $v = 0,035$ V s ⁻¹	58
Figura 33. Voltamogramas Cíclicos da redução de 2 em presença de GSH, varreduras sucessivas, meio prótico (DMF + tampão fosfato+NaOH (1:9). Eletrodo de carbono vítreo, $v = 0,035$ V s ⁻¹	59
Figura 34. Voltamogramas cíclicos de 2 em meio prótico (etanol + tampão fosfato + NaOH (1:9) em presença de GSSG. Eletrodo de carbono vítreo. A: $v = 0,035$ V s ⁻¹ . B: Varreduras sucessivas, $v = 0,035$ V s ⁻¹	60

Figura 35. Provável mecanismo para a formação de adutos com GSH após redução do grupo nitro em meio fosfato.	61
Figura 36. Voltamograma cíclico de 2 em meio prótico (etanol/bicarbonato + NaOH (2:8) pH 9,6). Eletrodo de carbono vítreo. A: em presença de GSH. B: em presença de GSSG, $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$	62
Figura 37. Formação de adutos com GSH/GS ⁻ após redução do grupo nitro [JULIÃO et al., 2006].	63
Figura 38. Voltametria cíclica de 2, A: antes (----) e após (___) eletrólise realizada em tampão fosfato + NaOH, em presença de GSH. B: Espectro no UV-Vis do produto final de eletrólise (mistura de 2 + derivado nitroso).	64
Figura 39. Voltamograma cíclico de 2 (1 mmol L ⁻¹), em solução saturada com oxigênio, EtOH + tampão fosfato + NaOH (1:9), pH 9,4.	65
Figura 40. Espectros no UV-Vis em tampão fosfato (etanol/tampão fosfato + NaOH (1:9), pH aparente 9,4. A: espectro de 2 (1 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹). B. espectro para GSH (1 x 10 ⁻⁴ x 10 ⁻¹). C: espectro de 2 + GSH na razão de 1:1.	67
Figura 41. Mecanismo proposto para o decaimento do ânion radical nitro.	68
Figura 42. Corrente de pico normalizada obtida para meio aprótico (DMF + TBAP 0,1 mol L ⁻¹). B: Dependência da razão i_{pa}/i_{pc} em relação à velocidade de varredura.	68
Figura 43. A: Corrente de pico normalizado obtida em meio misto (DMF/tampão PBS + NaOH (1:9), pH 9,1. B: Dependência da razão i_{pa}/i_{pc} sobre a velocidade de varredura.	69
Figura 44. A: Corrente de pico normalizado obtida em meio misto [Etanol + bicarbonato + NaOH (2:8)], pH 9,6. B: Dependência da razão i_{pa}/i_{pc} em relação à velocidade de varredura.	70
Figura 45. Dependência entre a razão i_{pa}/i_{pc} e a concentração do nitrocomposto.	70
Figura 46. Curva teórica, para reações de desproporcionamento, para determinar o parâmetro ω	71
Figura 47. Curva ω vs τ , para meio fosfato (DMF + PBS + NaOH (1:9) pH 9,1.	72

Figura 48. Curva ω vs τ , para meio fosfato (Etanol/ NaHCO_3 + NaOH (2:8) pH 9,3.	73
Figura 49. Corrente de pico normalizado obtida para 2 em presença e ausência de GSH, meio misto (DMF + tampão PBS + NaOH (1:9), pH 9,1).	74
Figura 50. Correntes de pico normalizado obtida em meio misto (etanol/bicarbonato + NaOH (2:8), pH 9,6.	75
Figura 51. Dependência da razão I_{pa}/I_{pc} sobre a velocidade de varredura.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade citotóxica dos compostos 1 e 2 frente a células tumorais humanas [KOHN et al., 2006].	22
Tabela 2. Parâmetros voltamétricos de 2. Efeito da velocidade de varredura. Eletrodo de Carbono Vítreo, E_p vs. Ag AgCl Cl ⁻ 0,1 mol L ⁻¹ Cl ⁻	37

LISTA DE ABREVIATURAS

DMF	N,N-Dimetilformamida
TBAP	Perclorato de Tetrabutilamônio
ΔE_p	Diferença de potencial.
<i>E_{ap}</i>	Potencial aplicado
<i>E_{pc}</i>	Potencial de pico catódico.
<i>E_{pa}</i>	Potencial de pico anódico.
<i>E_{p/2}</i>	Potencial a meia altura da onda.
<i>E_{ap}</i>	Potencial aplicado.
<i>I</i>	Corrente.
<i>I_{pc}</i>	Corrente de pico catódica.
<i>I_{pa}</i>	Corrente de pico anódica.
n	Número de elétrons.
UV-Vis	Ultravioleta-visível.
λ	Comprimento de onda
v	Velocidade de varredura de potencial.
$v^{1/2}$	Raiz quadrada da velocidade de varredura.
DNA	Ácido Desoxirribonucléico.
dsDNA	Ácido Desoxirribonucléico em fita dupla (ou dupla hélice).
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio.
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13.
d	duplete.
s	simpleto.
sl	simpleto largo.
J	Constante de Acoplamento.
EM	Espectro de Massa.
A	Oxidante ou acceptor de elétrons.
ERO	Espécies reativas de oxigênio.
ERN	Espécies reativas de nitrogênio.
S.O.D.	Superóxido-dismutase.

CAT	Catalase.
GPx	Glutathione peroxidase.
GST	Glutathione S-transferase.
GR	Glutathione reductase.
GSH	Glutathione reduced.
GSSG	Glutathione oxidized.

RESUMO

No presente trabalho, foram realizados estudos eletroquímicos de compostos que apresentam expressiva atividade antiproliferativa, conhecidos como adutos de Baylis-Hillman. As técnicas utilizadas foram: voltametria cíclica, de pulso diferencial e de onda quadrada e eletrólise a potencial controlado.

Os estudos eletroquímicos revelaram um comportamento padrão para o composto nitroaromático 2-[*p*-nitrofenil(hidroxi)] acrilato de metila (**2**). Em meio aprótico (DMF + TBAP, 0,1 mol L⁻¹), o composto **2** apresentou três ondas de redução, sendo as duas primeiras referentes à redução do grupo nitro e, assim como no composto padrão não nitrado, 2-[fenil(hidroxi)] acrilato de metila (**1**), a onda adicional, em potencial mais negativo, relaciona-se à redução do grupo acrilato. Em meio prótico, tampão fosfato pH 6,9, uma única onda catódica relativa à formação da hidroxilamina é observada. Nos estudos em meio aquoso alcalino (EtOH + fosfato, DMF + fosfato ou EtOH + bicarbonato de sódio + NaOH, pH ~ 9), observou-se a formação de intermediário radicalar estável, o ânion radical nitro. Eletrólises em potencial controlado, em meio prótico neutro, levaram à formação e isolamento de um dímero, após redução do grupo nitro, em processo de 4e⁻/4 H⁺.

Estudos eletroquímicos realizados em biossensor de dsDNA, sugerem que um dos alvos para ação biológica de **2** é o DNA. A lesão ao DNA, refletida pela presença de picos diagnósticos de oxidação das bases guanina e adenina, mensuráveis eletroquimicamente, é observada apenas após redução do grupo nitro (farmacóforo) a intermediários reativos, reforçando a necessidade de biorredução do grupo para posterior atividade biológica. Os estudos eletroquímicos e espectrofotométricos, em presença de GSH e GSSG, revelaram que os produtos de redução do grupo nitro interagem com os endobióticos, de maneira diferente. Para o meio fosfato + NaOH, pH 9,4, a adição de GSH promoveu o aumento na intensidade de corrente para o primeiro processo eletródico, bem como a perda de reversibilidade. Já a segunda onda de redução, relativa à formação da hidroxilamina, não foi observada no voltamograma. De acordo com as funções ácidas da GSH, aliada ao ineficiente efeito tamponante desse meio, a glutatona atua como doador de prótons, favorecendo a formação do derivado nitroso. Por outro lado, em tampão bicarbonato + NaOH, onde se tem um eficiente efeito tamponante e a glutatona se encontra na forma desprotonada, as alterações voltamétricas são mais discretas, com aumento da reversibilidade do processo referente à formação do ânion radical nitro. Em potenciais mais negativos, a onda relativa à geração da hidroxilamina desaparece, o que evidencia a interação de GSH com os produtos de redução estendida do grupo nitro. A possibilidade de catálise, em presença de oxigênio, não foi evidenciada para **2**.

Os resultados obtidos fornecem subsídios úteis para a compreensão do mecanismo de ação antitumoral de **2**, que pode ser considerado um agente biorredutivo, com função adicional seqüestradora de glutatona.

ABSTRACT

The present work presents electrochemical studies of Baylis-Hillman adducts, that show significant anti-tumoral activity. Electrochemical techniques used were Cyclic Voltammetry, Differential Pulse Voltammetry, Square Wave Voltammetry and Controlled Potential Electrolysis.

The reduction behaviour of methyl 2-[*p*-nitrophenyl(hydroxy) methyl] acrylate (**2**) in aprotic medium (DMF + TBAP, 0.1 mol L⁻¹) was typical of nitroaromatics, with three reduction waves, the first two related to the reduction of the nitro function. The third wave refers to the reduction of the acrylate group, similarly to the observed behavior of the pattern compound, the 2-[phenyl(hydroxy)methyl] acrylate (**1**).

In protic medium (phosphate buffer, pH 6.9), compound **2** shows one reduction wave related to the generation of the derived hydroxylamine. In alkaline buffer (EtOH + phosphate, DMF + phosphate or EtOH + bicarbonate + NaOH, pH ~9), the electron transfer led to the formation of the stable nitro radical anion. Controlled potential electrolysis, in neutral protic medium, in 4 e⁻/4H⁺ process, furnished a dimer, after the nitro group reduction.

Electrochemical studies performed on a dsDNA biosensor suggest that one of the targets for the biological action of **2** is the DNA. The DNA damage, verified by the presence of the oxidation peaks of the nucleobases guanine and adenine, is observed only, after the nitro group reduction (pharmacophore) to reactive intermediates, which reinforce the importance of the bioreduction for the biological action.

The electrochemical and spectrophotometric studies, in the presence of GSH and GSSG, revealed that the reduction products of the nitro group interact with the endobiotics, in a different way. For phosphate + NaOH, pH 9.4, the addition of GSH to the solution of **2**, led to the increase of current intensity for the first reduction wave that turns irreversible. The second reduction wave, relative to the hydroxylamine production, is no more observed in the voltammogram. Due to the acid nature of GSH, together with the inefficient buffering effect of the medium, glutathione acts as a protons donor, leading to a stable nitroso derivative. On the other hand, in bicarbonate + NaOH buffer, the pH is kept and glutathione is present in its dissociated form. Voltammetric changes are minimum, with a slight increase in the reversibility of the process concerning formation of nitro anion radical. At more negative potentials, the wave related to the production of hydroxylamine disappears, showing that GSH interacts with products of posterior reduction of the nitro group.

The possible catalysis in the presence of O₂ was not evidenced.

These electrochemical results help in the understanding of the anticancer activity of **2** that can be considered a hypoxia targeted bioreductive agent with a glutathione depleting function.

1. INTRODUÇÃO

Muitos dos processos fisiológicos mais relevantes se baseiam em cadeias oxirredutivas, que envolvem diversas reações catalisadas por enzimas. Uma série de similaridades entre as reações biológicas e as eletroquímicas, no que se refere aos processos de transferência de elétrons: natureza heterogênea (interface eletrodo-solução, enzima-solução); são observadas. Há necessidade de mimetizar as condições biológicas. Isto tem gerado discussões, pois o ambiente celular é muito complexo e pode ser lipofílico ou hidrofílico. Nesse sentido, estudos eletroquímicos devem ser realizados tanto em meio aprótico, assemelhando-se aos processos que ocorrem nos sistemas lipofílicos quanto em meio aquoso, assemelhando-se então à maioria dos fluidos biológicos. Há, ainda, estudos em meio misto e meio micelar. Os métodos eletroquímicos fornecem grande quantidade de informações a respeito dos mecanismos de transferência de elétrons, que ocorrem em meio biológico [DE ABREU et al., 2002].

Os parâmetros eletroquímicos normalmente obtidos e empregados, especialmente em voltametria cíclica, o método mais usado, são os potenciais de oxidação (E_{pa}) e redução (E_{pc}) ou $E_{redox} (E_{pc} + E_{pa})/2$ (para sistemas reversíveis) ou $E_{pc} - E_{pa}/2$ (para os processos irreversíveis), a magnitude da função corrente ($I_p/v^{1/2} \times C$) e a razão entre as correntes de pico catódico e anódico I_{pa}/I_{pc} . O potencial E_{redox} ou parâmetro similar, $E_{1/2}$, em polarografia, fornece uma medida quantitativa da facilidade de redução de um oxidante ou aceptor de elétrons, A, onde quanto mais anódico o potencial do par (A/A^{\bullet}), mais poderoso o oxidante. Similarmente, para valores de potencial (E) mais catódicos de (A^{\bullet}/A^{2-}), melhor agente redutor [DE ABREU et al., 2002].

Informações sobre parâmetros eletroquímicos constituem ferramentas das mais relevantes em Química Medicinal [DE ABREU et al., 2002].

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

Um deles é relacionado ao duo Transferência de Elétrons-Estresse Oxidativo (TE-EO). O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, com predomínio dos oxidantes, com dano conseqüente aos endobióticos. A geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) por cicladores redox (agentes que sofrem reações redox reversivelmente) ocorre via transferência de elétrons a classes de substâncias que contém “eletróforos”, como quinonas (ou precursores fenólicos), complexos metálicos (ou complexantes), nitrocompostos aromáticos (ou suas formas reduzidas) e iminas conjugadas (ou íons imínio) [KOVACIC; OSUNA, 2000], entre outras, que após sofrerem reações redox, estão aptas a transferir elétrons ao oxigênio, gerando o ânion-radical superóxido e uma cascata de outras espécies reativas (Figura 1).

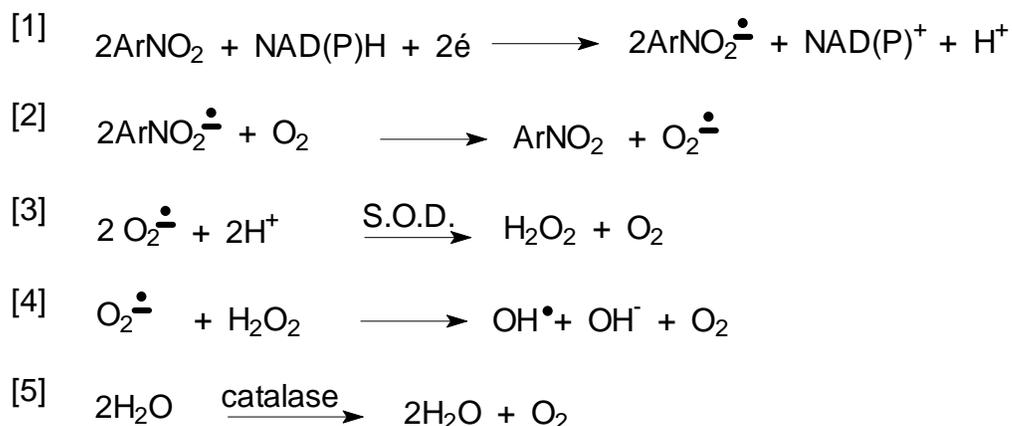


Figura 1. Geração de espécies oxigenadas reativas após redução do grupo nitro e desintoxificação, pelo emprego de catalase e superóxido-dismutase (S.O.D.).

A alquilação após processos biorredox é o segundo dos mecanismos principais e descreve o efeito de compostos, que expressam seu modo de ação farmacológica como agentes alquilantes, mas o fazem após redução ou oxidação *in vivo*. A grande maioria dos agentes alquilantes empregados clinicamente são pró-fármacos e se comportam como armadilhas eletrofílicas para nucleófilos moleculares ou endobióticos, após redução ou oxidação catalisada ou não por enzimas [RAJSKI; WILLIAMS, 1998]. Os dois mecanismos, TE-EO ou alquilação bio-redox, não são mutuamente exclusivos e podem ocorrer simultaneamente. A

predominância de um sobre o outro depende do conteúdo de oxigênio dos sistemas biológicos envolvidos.

Nesse contexto, um fator importante está relacionado à concentração de oxigênio na célula. Alguns tecidos, por exemplo, tumores sólidos, apresentam regiões com baixa concentração de oxigênio (hipóxia). A concentração de O₂ influencia profundamente o resultado das reações eletroquímicas biológicas [GOULART et al., 2006].

Os fármacos ativados em situações de hipóxia apresentam amplas aplicações, principalmente, por suplantarem a resistência de células tumorais hipóxicas à radioterapia. As propriedades-chave de tais fármacos incluem propriedades redox apropriadas para ativação por redutases biológicas (tipicamente flavoproteínas) e para reação com oxigênio de tal modo que níveis normais de oxigênio possam inibir ou reverter o processo de redução.

De modo geral, o câncer é a doença-alvo para a maioria dos fármacos, protótipos e pró-fármacos. É a área onde a maioria dos estudos de correlação entre parâmetros eletroquímicos e atividade biológica foi e é realizada.

1.1. NEOPLASIAS

A carcinogênese é um processo que envolve múltiplas etapas. Uma célula saudável passa por um estado pré-canceroso até atingir o estágio de câncer. Geralmente, o câncer é descrito como sendo uma doença da diferenciação celular ou doença de origem celular. Seu processo de desenvolvimento é caracterizado pela ação cumulativa de múltiplos eventos ocorrendo em uma única célula e pode ser descrito em três estágios: iniciação, promoção e progressão (Figura 2). Espécies reativas de oxigênio (ERO) podem atuar em todos estes estágios [VALKO et al., 2006].

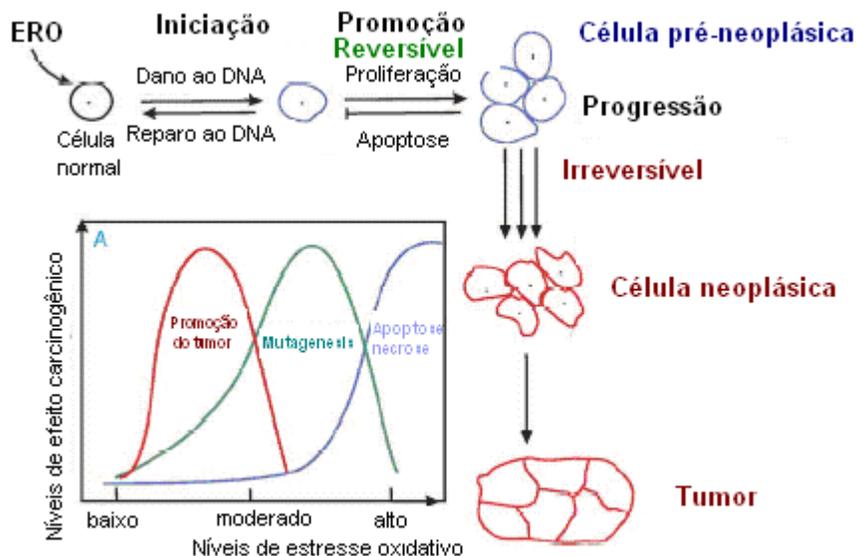


Figura 2. O modelo dos três estágios da carcinogênese e o efeito nos níveis de carcinogênese vs níveis de radicais livres em vários estágios dos processos carcinogênicos (A) [Adaptado de VALKO et al., 2006].

Na iniciação, espécies reativas de oxigênio (ERO) são responsáveis pelo dano oxidativo às bases do DNA, tendo como resultado uma alteração celular reversível. Nesse processo, o dano oxidativo ao DNA resulta na formação do aduto 8-oxoguanina, que pode ser o responsável pela transformação do tumor de benigno para maligno.

A promoção corresponde ao estágio onde ocorre à proliferação das células inicialmente alteradas e/ou inibição da morte celular programada (apoptose).

O último estágio do processo carcinogênico, a progressão, envolve mudanças celulares e moleculares que ocorrem a partir de um estágio pré-neoplásico a neoplásico. Este estágio é irreversível e caracterizado por um acúmulo adicional do dano genético, resultando na transição de célula benigna para maligna, com conseqüente desenvolvimento do tumor [VALKO et al., 2006].

Os tumores sólidos, que apresentam divisão celular relativamente lenta, tais como o carcinoma de pulmão, cólon e mama, constituem mais de 90% de todos os tipos de câncer do homem. Estes tipos de neoplasias, em geral, respondem pouco aos agentes quimioterápicos existentes e o tratamento curativo, utilizando

qualquer uma das modalidades terapêuticas ou mesmo a combinação das diversas modalidades, é extremamente difícil [KENNEDY et al. 1980].

O abastecimento sanguíneo do tumor é realizado, inicialmente, através da vascularização existente na região. Durante o crescimento do tumor, vasos sanguíneos pré-existent são obstruídos ou comprimidos. Posteriormente, novos vasos sanguíneos começam a surgir (neovascularização) e estes se ramificam excessivamente, são tortuosos e seguem em direções imprevisíveis. Adicionalmente, algumas áreas do tumor são bem irrigadas, outras têm pouca ou nenhuma vascularização, o que faz com que o aporte de oxigênio e nutrientes para algumas regiões do tumor seja muito menos eficiente do que nos tecidos normais. As células localizadas próximas aos vasos sanguíneos (periferia do tumor) são células bem oxigenadas. As células localizadas no centro do tumor e, portanto, distantes de vascularização, são células anóxicas e necróticas. Finalmente, as células localizadas entre estas duas regiões são conhecidas como células em hipóxia, pois estão localizadas em uma região de baixa concentração de oxigênio (Figura 3), [OLIVEIRA; ALVES, 2002].

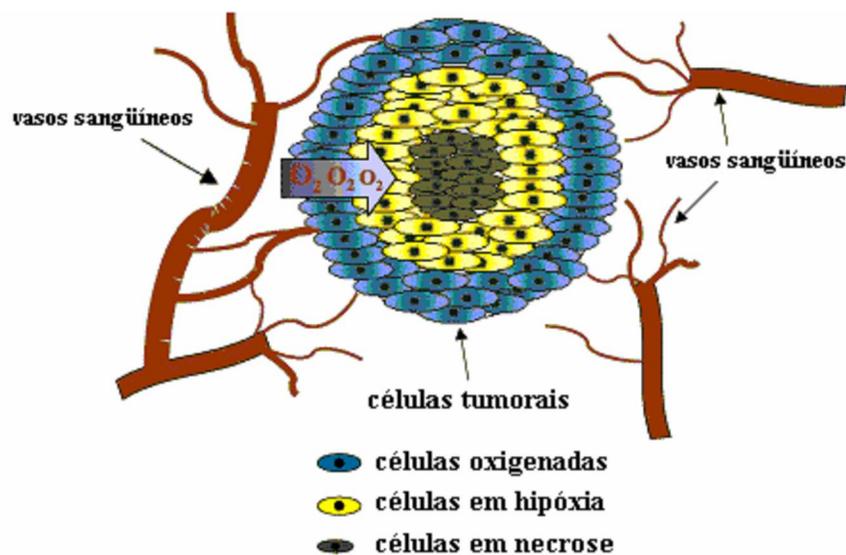


Figura 3. Secção transversal de um tumor sólido, mostrando a diminuição da concentração de oxigênio em relação à distância capilar [Adaptado de OLIVEIRA; ALVES, 2002].

A presença de regiões em hipóxia em tumores é a maior limitação da eficiência da radioterapia e de muitos agentes quimioterápicos [PARVEEN et al., 1999]. A maior sensibilidade aos efeitos da radiação ionizante observada em células com oxigenação normal, deve-se ao fato dos radicais gerados na radiação reagirem rapidamente com o O₂ molecular, originando radicais altamente reativos, tais como os radicais peroxila (ROO•), hidroxila (HO•), e superóxido (que causam dano ao DNA da célula tumoral) [KOVACIC; OSUNA, 2000]. Deste modo, células hipóxicas apresentam a capacidade de limitar a cura de tumores sólidos. Nesse sentido, agentes que apresentam ação preferencial frente a células hipóxicas constituem candidatos potenciais na terapia do câncer [HEIMBROOK et al., 1988].

As diferenças fisiológicas na concentração de oxigênio entre células tumorais normais e em hipóxia têm sido exploradas no desenvolvimento de pró-fármacos biologicamente inativos que, após biorredução seletiva em tecidos hipóxicos, liberariam nova substância, dessa feita, na forma ativa (fármaco) [PARVEEN et al., 1999; EVERETT et al., 1999]. Fármacos biorredutíveis apresentam toxicidade seletiva frente a células hipóxicas, característica esta de interesse potencial na terapia do câncer devido à presença dessas regiões em tumores sólidos [MCCLELLAND, 1990].

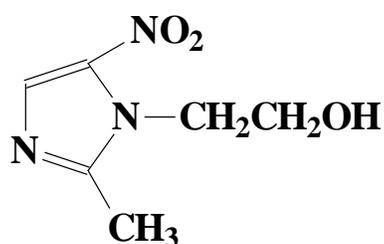
A ativação de pró-fármacos biorredutíveis é decorrente de redução enzimática. Como exemplo, pode-se destacar o sistema enzimático responsável pela ativação biorredutiva de nitrocomposto, as enzimas nitrorredutases, que são responsáveis pela ativação de pró-fármacos biorredutíveis que possuem o grupo nitro [JAFFAR et al., 2001].

1.2. COMPOSTOS NITROAROMÁTICOS

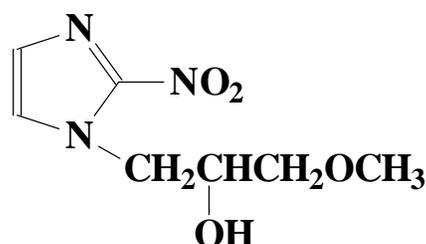
Os compostos nitroaromáticos, especificamente os nitroimidazóis, apresentam toxicidade preferencial a tecidos tumorais hipóxicos. Entre os compostos da classe que são amplamente estudados, pode-se citar como

exemplos o metronidazol (I) e o mesonidazol (II), testados clinicamente como radiosensibilizadores. Mesonidazol e metronidazol são rapidamente reduzidos por radicais gerados na radiação ou através dos sistemas enzimáticos [HEIMBROOK et al., 1988].

As propriedades biológicas de nitroaromáticos estão relacionadas à sua afinidade por elétrons, ou mais precisamente, ao seu potencial de redução. A toxicidade seletiva do grupo nitro frente a células hipóxicas se deve a formação de intermediários altamente reativos após redução metabólica, como o ânion radical nitro ($\text{RNO}_2^{\bullet-}$) e os derivados nitroso (RNO), hidroxilamina (RNHOH) e amina (RNH₂) [ZIEBA-MIZGALA et al., 2005].



Metronidazol I

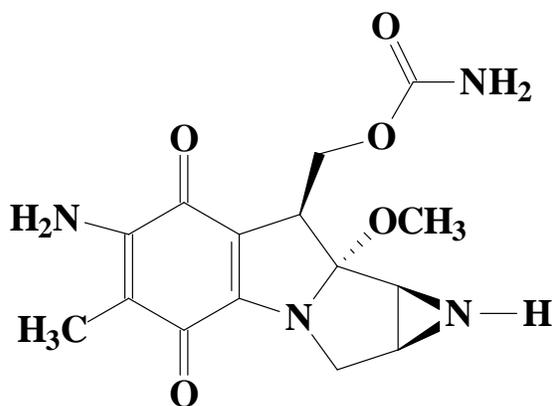
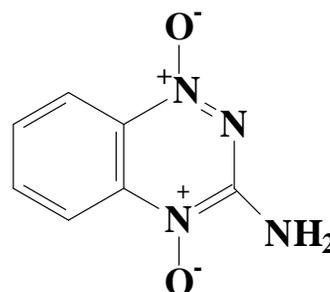


Mesonidazol (II)

A citotoxicidade hipóxica seletiva do derivado hidroxilamínico é atribuída à formação de metabólitos capazes de se ligarem a macromoléculas, como proteínas e o DNA. Estudos também apontam para uma alta reatividade do derivado nitroso, onde a citotoxicidade hipóxica está relacionada à reação desse derivado com a redução dos níveis de tióis intracelulares, como a glutatona [KOVACIC; OSUNA, 2000]. Sugere-se que a redução nos níveis de compostos tiólicos possa induzir à morte celular via mecanismo ligado a apoptose e ao aumento do estresse oxidativo (EO) [BREZDEN et al., 1994; BERUBE et al., 1991].

De modo geral, os fármacos biorredutíveis não são tão numerosos, correspondendo então a três classes principais, os nitroaromáticos (I e II),

compostos que possuem a função quinona (**III**) e N-óxidos (**IV**), todas detentores de comprovada atividade anti-cancerígena seletiva a células hipóxicas após redução biológica [NAUGHTON, 2001; MONGE et al. 1995].

Mitomicina C (**III**)Tirapazamina (**IV**)

Do ponto de vista biológico, a ativação redutiva representa um elegante caminho para fármacos que têm como alvo células com limitada concentração de oxigênio. Entre os compostos que apresentam a mais extensa aplicação na clínica se encontram os nitroaromáticos, que têm sido empregados no tratamento de infecções anaeróbicas, no tratamento do câncer como citotoxinas a células hipóxicas e como radiosensibilizadores [SQUELLA et al., 2005; MILLER et al., 2001], no tratamento de doenças causadas por protozoários parasíticos, como a doença de Chagas [BOLLO et al., 2005; MAYA et al., 2002].

A ativação de nitroaromáticos pode acontecer por uma redução enzimática direta seguida de reação com oxigênio, gerando espécies reativas de oxigênio ou, alternativamente, em baixa concentração de oxigênio, por geração, após extensa redução, de espécies eletrofílicas (iminoquinometanos). Mais detalhadamente, nitrocompostos após sofrerem redução em condições de hipóxia, com formação da hidroxilamina (4 elétrons) ou amina (6 elétrons), via intermediário nitroso (2 e⁻), liberam um fármaco ativo que pode ser um intermediário alquilante (Figura 4), capaz de se ligar ao DNA ou a outras biomoléculas [JAFFAR et al., 2001], como

tióis [RADI & BELAL, 1997] e ácidos nucleicos, resultando assim em um efeito tóxico potencial.

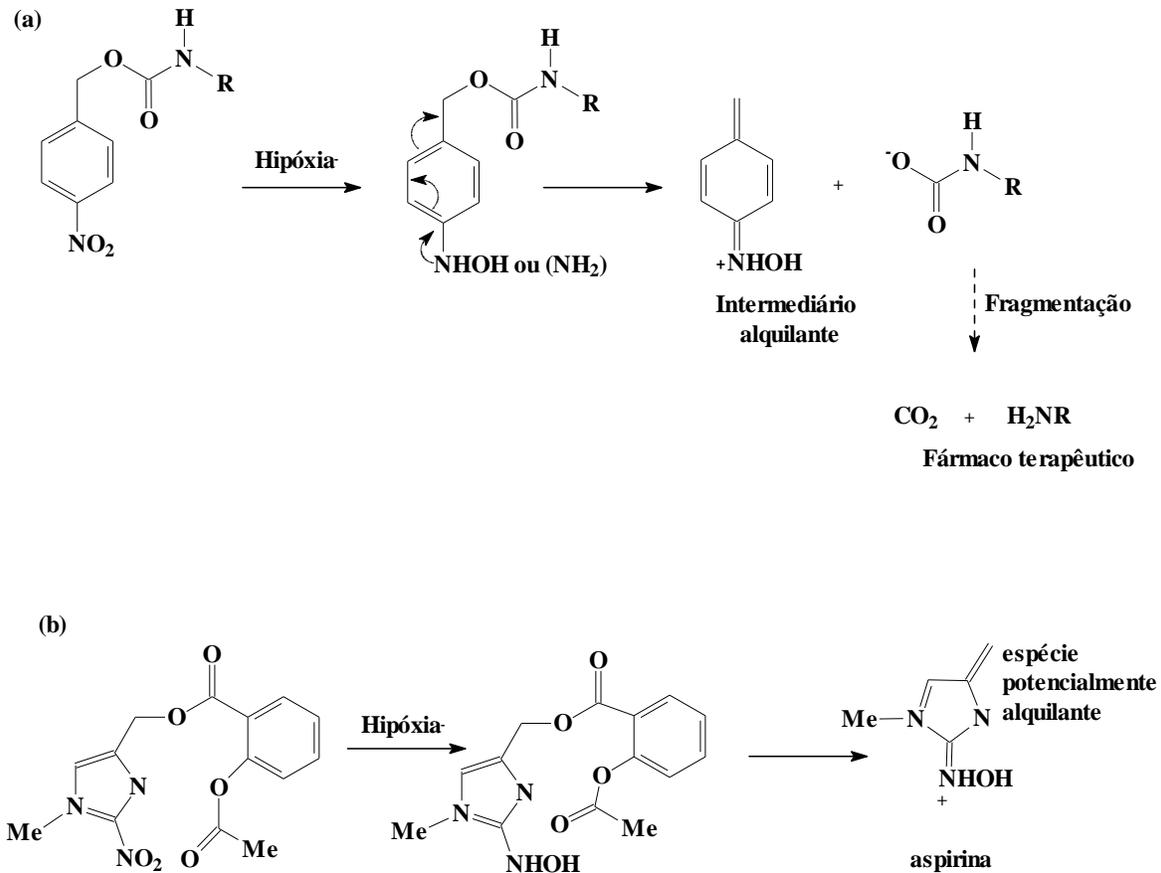


Figura 4. Liberação de espécies ativas após redução em células hipóxicas de (a) um nitroaromático e (b) um nitroimidazol [Adaptado de JAFFAR et al., 2001].

A redução do grupo nitro é essencial para a maioria das atividades biológicas (Figura 5) [TOCHER, 1997]. É válido ressaltar, de acordo com a Figura 5, que somente os organismos que possuem mecanismo redox com suficiente potencial de redução para reduzir o grupo nitro, produzirão espécies biologicamente ativas a partir desta classe de compostos [SQUELLA et al., 2005].

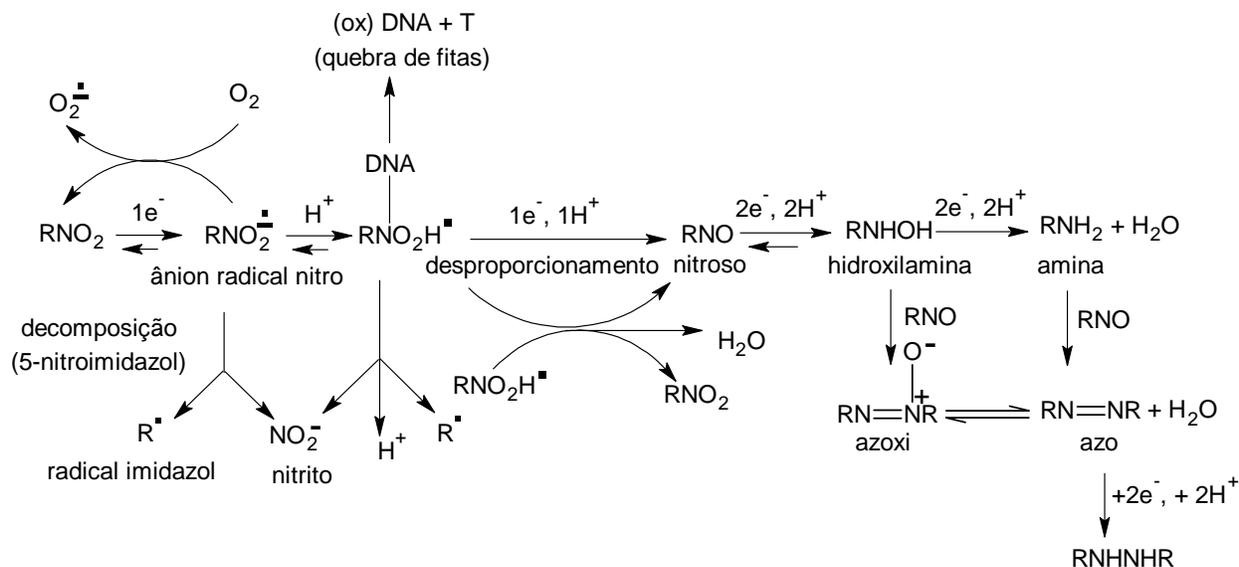


Figura 5. Esquema da redução de nitrocompostos aromáticos. [Adaptado de Tocher, 1997].

A redução eletroquímica de nitroaromáticos tem sido amplamente estudada em meio prótico e aprótico. As técnicas eletroquímicas são usadas para estudar a formação, estabilidade e reatividade do produto da redução monoelétrônica do grupo nitro, o ânion nitro radical, em diferentes meios. Estudos eletroquímicos têm revelado que o mecanismo de redução é complexo e dependente do meio reacional.

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

$$\text{Log (velocidade de redução)} = \text{constante} + (\text{dependência redox} \times E_p) \quad (1)$$

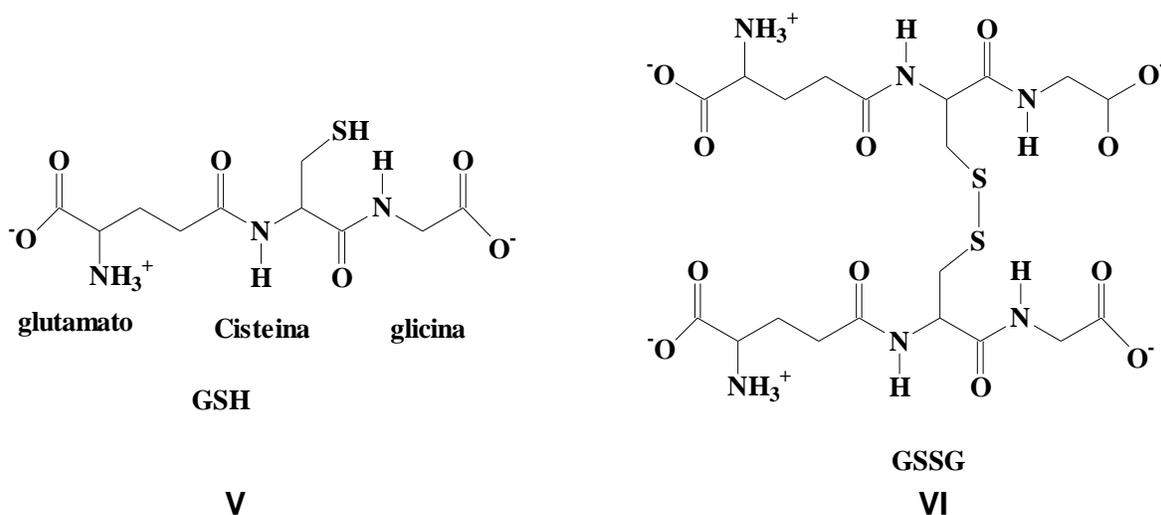
1.3. GLUTATIONA E O AMBIENTE CELULAR REDOX

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) é parte integrante dos processos metabólicos normais. É sabido que tais espécies desempenham um papel duplo nos sistemas biológicos, podendo ser tanto benéficas quanto danosas. Entre as importantes funções biológicas inerentes a estas espécies, pode-se citar a fagocitose, fenômeno no qual espécies radiculares são produzidas para eliminar o agente agressor. No entanto, quando sua produção acarreta danos celulares, o próprio organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. O mecanismo de defesa envolve os sistemas enzimáticos e não enzimáticos da célula. O sistema enzimático é representado por enzimas antioxidantes como: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx). Como sistema não enzimático, destacam-se: glutaciona (**GSH**), tocoferóis, ascorbato, ácido úrico e β -carotenos [VALKO et al., 2004; BUETTNER, 1993].

A glutaciona, um tripeptídeo (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina), é o maior tiol não protéico envolvido no sistema de defesa antioxidante da célula [SAKHI et al., 2006]. A síntese de GSH se dá a partir de cisteína, glutamato e glicina, através de processos catalisados pelas enzimas citosólicas γ -glutamilcisteina sintetase e glutaciona sintetase [SIES, H., 1999].

Glutaciona se encontra em abundância no citosol, núcleo e mitocôndria, sendo o maior antioxidante solúvel nesses compartimentos celulares. Em condições metabólicas normais, o equilíbrio existente entre as formas reduzida (**V**) e oxidada da GSH, glutaciona dissulfeto (**VI**), sendo a primeira presente em maior concentração, é responsável pela manutenção do potencial redox nas células, na desintoxicação de vários compostos citotóxicos, seqüestradora de radicais e antioxidante, entre outras atividades [FERNÁNDEZ-CHECA, 2003; MASELLA et al., 2005; RUSSO et al., 1986]. Na sua forma reduzida, glutaciona possui 4

grupamentos ácidos dissociáveis (2 grupos carboxílicos, 1 grupo tiol e um grupo amônio) [PLANCHON et al., 2004], enquanto a forma oxidada mantém 6 deles (4 grupos carboxílicos e 2 grupos amônio), com perda da função tiólica.



Em condições redoxes normais, a maior porção de GSH se encontra na forma reduzida. A GSH também está ligada a várias proteínas e atua como coenzima das várias enzimas envolvidas na defesa celular. Assim, glutathione pode seqüestrar radicais livres diretamente ou pode atuar como substrato para as enzimas glutathione peroxidase (GPx) e glutathione S-transferase (GST) durante a desintoxicação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), hidroperóxidos lipídicos (ROOH) e compostos eletrofílicos [MASELLA et al., 2005]. Glutathione peroxidase é um dos meios de controle do organismo dos níveis de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos utilizando GSH [MASELLA et al., 2005; ROVER JÚNIOR et al., 2000]. Nas reações catalisadas por glutathione peroxidase, GSH é direta ou indiretamente oxidada ao dissulfeto (GSSG) [GRIFFITH, 1999]. Outra enzima que apresenta ação conjunta com a glutathione peroxidase é a glutathione redutase (GR). Esta última não atua diretamente na remoção de espécies radicalares, porém é responsável pela regeneração da glutathione a sua forma reduzida (GSH) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutathione (Figura 6) [ROVER JÚNIOR, 200].

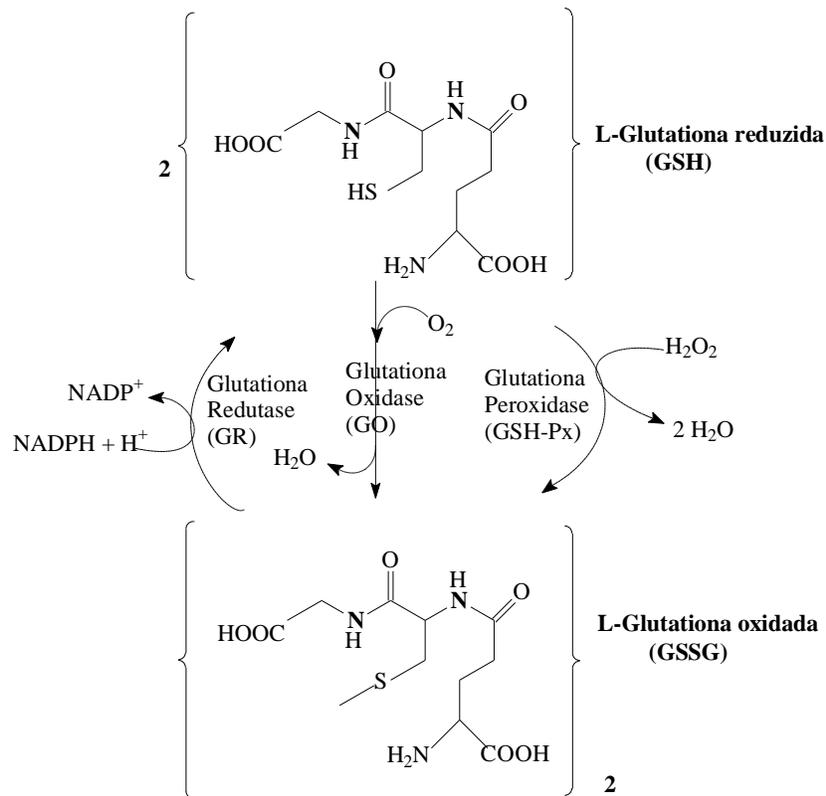


Figura 6. Interconversão de glutathiona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutathiona peroxidase (GSH-Px), glutathiona oxidase (GO) e glutathiona redutases (GR) [ROVER JÚNIOR et al., 2000].

A concentração total de GSH e GSSG, expressa em termos da razão GSH/GSSG, determina o ambiente redox da célula [SCHAFER; BUETTNER, 2001]. Em condições fisiológicas, o estado redox intracelular de tióis é altamente reduzido. Desta forma, GSH apresenta papel central na manutenção da integridade funcional de um sistema fisiologicamente ativo [HADDAD; HARB; 2005]. Agentes endógenos e exógenos, que induzem a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON), podem afetar a homeostase redox por regularem a atividade de enzimas antioxidantes, principalmente glutathiona peroxidase (GPx), e enzimas envolvidas na reciclagem e biossíntese de glutathiona [HADDAD; HARB; 2005].

O estresse oxidativo resulta na formação excessiva de GSSG em relação à GSH, tendo como conseqüência uma mudança no estado redox da célula, tornando-o mais positivos. Mudanças no ambiente redox celular podem alterar a transdução de sinais, síntese de DNA e RNA, síntese de proteínas e ativação enzimática [SCHAFER; BUETTNER, 2001].

Estudos relatam que os níveis de glutathiona (GSH) em células cancerosas são maiores do que os correspondentes em células normais [RUSSO et al., 1986]. Altas concentrações de tióis (ambiente redox mais reduzido) podem estimular a proliferação de algumas células tumorais. No entanto, a morte celular é induzida por um estado redox mais oxidado (tióis em sua forma oxidada). Assim, o ambiente redox (concentração de tióis) da célula pode determinar a proliferação, diferenciação ou morte celular [SCHAFER; BUETTNER, 2001]. Dessa forma, compostos que inibem ou estimulam a síntese de glutathiona podem ser de interesse especial na quimioterapia do câncer [GRIFFITH; MEISTER, 1979; WILLIAMSON et al., 1982].

As propriedades citotóxicas de nitroaromáticos foram investigadas em presença de aminotióis, como glutathiona e cisteamina. Esses estudos sugeriram que os tióis podem atuar na proteção contra radicais, como um agente oxidante, ou um agente redutor, ou das três formas dependendo das condições. Nesse sentido, a reatividade de aminotióis frente a intermediários de redução a partir de nitroaromáticos gerados eletroquimicamente *in situ*, é estudada através da análise da resposta voltamétrica após adição de endo/xenobióticos [TOCHER; EDWARDS, 1995].

A redução nos níveis de glutathiona intracelular, após interação com os produtos de redução de nitroimidazóis, foi relatada, sendo este efeito seletivamente observado em células hipóxicas. Uma característica interessante é que a glutathiona apresenta alta afinidade por intermediários gerados após redução de nitrocompostos, onde as reações entre estes resultam na formação de adutos covalentes com GSH [MCCLELLAND, 1990].

Esclarecer o mecanismo de interação entre o ânion radical nitro ($\text{RNO}_2^{\cdot-}$), produto da redução monoeletrônica de nitroaromáticos com aceptores biológicos

de elétrons, como tióis e ácidos nucleicos é de crucial relevância para elucidar o mecanismo de ação *in vivo* de nitrocompostos. O mecanismo que caracteriza a interação com tióis é complexo e o efeito da adição de tiol sobre a estabilidade do ânion radical nitro depende do fármaco, da natureza do tiol, da concentração do eletrólito suporte e da superfície eletródica [NÚÑEZ-VERGARA et al., 1997; JULIÃO et al., 2006].

1.4. BIOSSENSOR DE dsDNA

Os ácidos desoxirribonucleicos desempenham importante papel nos processos biológicos. O DNA é a biomolécula responsável pela determinação das características hereditárias, pois é transportador da informação genética, além de instruir a síntese de proteínas e enzimas através dos processos de replicação e transcrição da informação genética celular [RAUF et al., 2005]. A molécula de DNA consiste em duas cadeias antiparalelas de polinucleotídeos formados por unidades monoméricas de nucleotídeos. Cada nucleotídeo é formado por três tipos de componentes químicos: um grupo fosfato, que corresponde a uma pentose (desoxirribose), e quatro diferentes bases nitrogenadas. O esqueleto do DNA é representado pelo polímero açúcar-fosfato (desoxirribose-fosfato). As bases púricas, adenina (A) e guanina (G), e as bases pirimídicas, citosina (C) e timina (T), codificam a informação genética como uma função de suas ordens consecutivas na cadeia. A dupla hélice de DNA é resultante das ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas, A-T e G-C, presentes nas duas fitas de nucleotídeos que constituem a biomacromolécula (Figura 7) [DICULESCU et al., 2005].

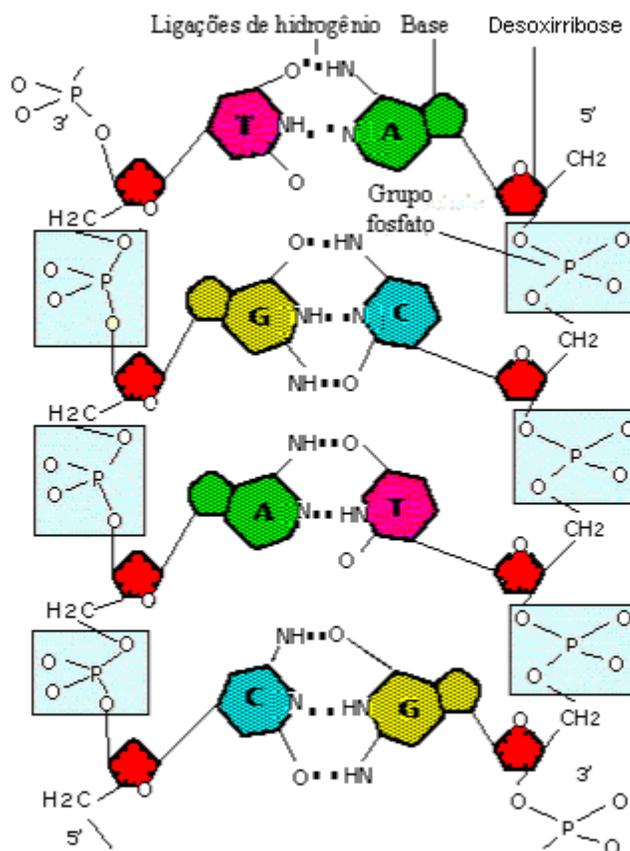


Figura 7. Representação esquemática da dupla fita de DNA. Ligações de hidrogênio entre as nucleobases.

Muitos dos testes para a detecção de câncer são freqüentemente baseados em sistemas para determinação de agentes que causam dano ao DNA. É estabelecido que algum dano irreversível ao DNA possa resultar em doenças hereditárias, que apresentam conseqüências letais, mutagênicas ou carcinogênicas para a célula. Devido a grande variedade de compostos que atuam por esse caminho, o sucesso na determinação de ações mutagênicas requer o desenvolvimento de métodos simples e sensitivos para determinação da reatividade potencial desses agentes com macromoléculas biológicas. Entre os agentes químicos carcinogênicos que são reativos *per se*, agentes alquilantes constituem um grupo com conhecida reatividade química [SÉQUARIS; VALENTA, 1987]. Desta forma, um dos alvos biológicos mais relevantes para mecanismo de

ação de fármacos é o DNA. Muitos compostos se ligam e interagem com o DNA, causando mudanças na estrutura do DNA e seqüência de bases, provocando perturbações na replicação do DNA [BRETT; CHIORCEA, 2003].

O estudo das interações de fármacos com o DNA é de crucial relevância para o desenvolvimento racional de fármacos. As interações de fármacos com o DNA englobam três possibilidades: a primeira destas se dá através do controle de fatores de transcrição e polimerases, onde fármacos interagem com proteínas que se ligam ao DNA. A segunda ocorre através da ligação com RNA, que pode ocorrer com o DNA de dupla fita, formando uma tripla hélice, ou por expor uma fita simples de DNA, formando híbridos que podem interferir na atividade de transcrição. A última interação consiste na ligação direta de moléculas pequenas a dupla hélice do DNA. No ultimo caso, as interações podem ser de natureza eletrostática devido às cargas negativas do açúcar-fosfato (geralmente não específicas), intercalação entre os pares de bases e ligações covalentes [RAUF et al., 2005, HELI et al., 2005].

Diante da necessidade de se entender o mecanismo de ação biológica de fármacos, como as interações do DNA com moléculas pequenas ou íons, análises da seqüência de genes, bem como na determinação do dano oxidativo ao DNA, foram desenvolvidos biossensores eletroquímicos de DNA [BRETT; CHIORCEA, 2003]. Um biossensor eletroquímico de DNA consiste em um dispositivo cujo elemento de reconhecimento biológico é o DNA fita dupla (dsDNA) ou DNA fita simples (ssDNA), imobilizado sobre um transdutor eletroquímico (eletrodo), que permite mensurar processos onde ocorrem ligações específicas com o DNA [MOUSTY, 2004; BRETT; CHIORCEA, 2003].

A oxidação eletroquímica do DNA em eletrodo de carbono vítreo usando voltametria de pulso diferencial mostra dois picos de oxidação referente às bases guanina e adenina (Figura 8). Uma maior dificuldade de oxidação das bases referentes ao DNA fita dupla é observada em relação ao DNA fita simples (ssDNA), o que se deve a maior flexibilidade dessa fita, onde as bases expostas são passíveis de oxidação (ssDNA) [DICULESCU et al., 2005].

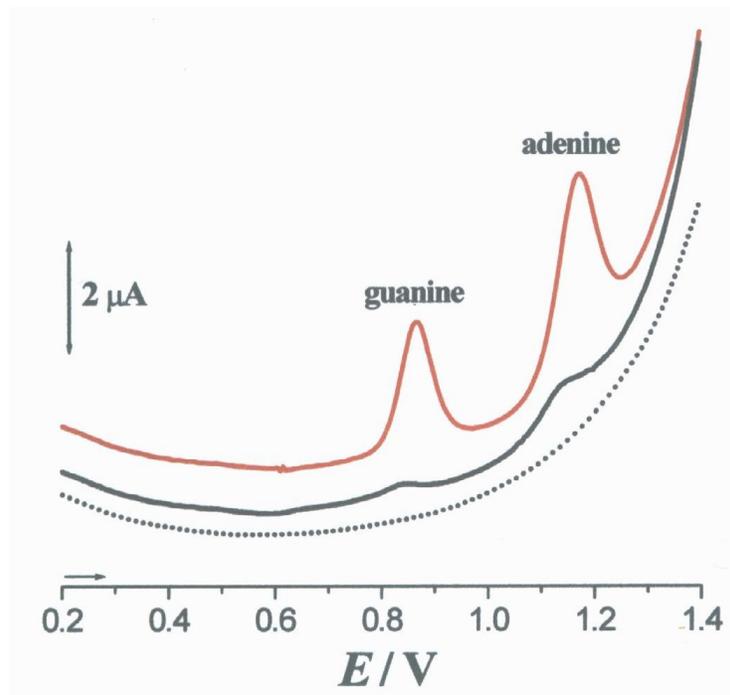


Figura 8. Voltamograma de pulso diferencial obtido com eletrodo de carbono vítreo modificado com DNA ($60 \mu\text{g mL}^{-1}$) em uma solução de tampão acetato $0,1 \text{ M}$, $\text{pH } 4,5$: 1° voltamograma do ssDNA (linha vermelha) e dsDNA (linha preta), 40° voltamograma do dsDNA (linha pontilhada) [DICULESCU et al., 2005].

Estudos da interação de substâncias com a dupla hélice de DNA, utilizando-se um biossensor voltamétrico de DNA, foram realizados com fármacos pertencentes a diferentes classes químicas (quinonas, nitroaromáticos, acridinas). As interações com a dupla hélice foram observadas através de diferentes metodologias. Em alguns casos a interação com o DNA foi observada apenas deixando o biossensor em contato com a solução do analito e, realizando-se posterior varredura anódica, enquanto que, em outras situações, a interação foi observada após posterior ativação do fármaco, redução, por exemplo, havendo formação de intermediários reativos [WANG et al., 1998; BRETT et al., 2002; DE ABREU et al., 2002]. Assim, biossensores de DNA podem ser empregados tanto para obtenção de interações específicas de certos fármacos com algumas bases de DNA, como também para elucidar o mecanismo de interação. Os testes diagnósticos das possíveis interações de fármacos com o DNA são feitos através

da comparação da resposta voltamétrica obtida com o fármaco em biossensor de DNA e os picos individuais referentes a cada base (Figura 7). Um exemplo de intercalação com o DNA é o estudo da redução da adriamicina intercalada na dupla hélice, onde após transferência de elétrons a partir da guanina para o grupo quinona presente na molécula, o dano ao DNA resulta na formação do aduto 8-oxoguanina, mensurado eletroquimicamente [BRETT et al., 2002].

1.5. ADUTOS DE BAYLIS-HILLMAN

A reação de Baylis-Hillman, conhecida desde 1972, pode ser definida como uma reação que resulta na formação de uma ligação carbono-carbono entre carbonos eletrofílicos sp^2 (geralmente um aldeído) e a posição α de uma olefina contendo um grupo retirador de elétrons, ativada por um catalisador, o 1,4-diazabicyclo [2.2.2.] octano (DABCO) [COELHO; ALMEIDA, 1999]. A reação inicia com a adição conjugada do DABCO (nucleófilo) ao acrilato de etila (Figura 9). Esta resulta na formação do enolato que pode então atacar o acetaldeído em uma reação aldólica. Esta última é acompanhada por eliminações levando então à formação de produtos α,β -insaturados [CLAYDEN, 2005].

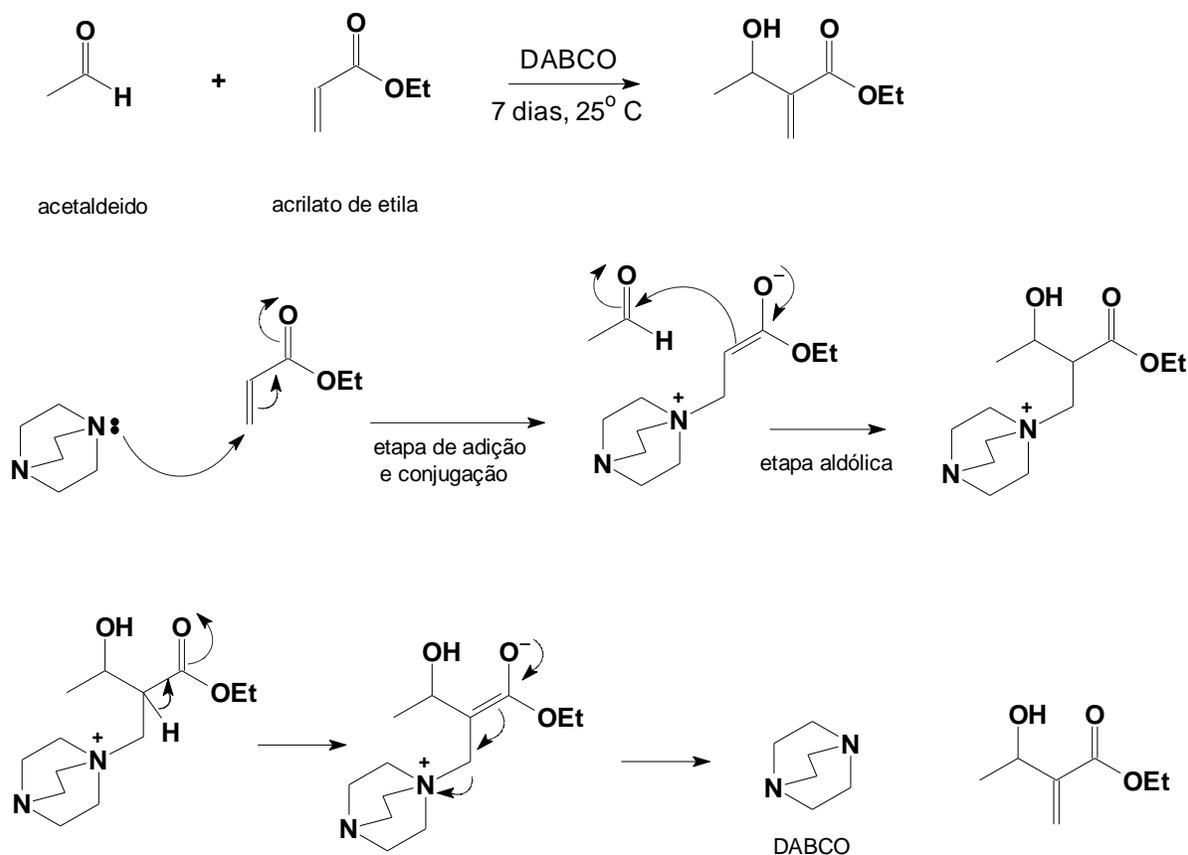


Figura 9. Reação de Baylis-Hillman [CLAYDEN, 2005].

Esta reação vem recebendo considerável atenção por parte dos químicos orgânicos, basicamente por apresentar características fundamentais para a eficiência de um método sintético: é regio, quimio e estereosseletiva; é econômica, requer condições brandas e fornece moléculas polifuncionalizadas que, através de sucessivas interconversões de grupos funcionais, podem permitir o acesso a importantes intermediários sintéticos. A potencialidade desta reação é muito grande, particularmente no que se refere ao controle estereoquímico, podendo levar à formação de pelo menos um centro estereogênico. Estes adutos podem ser utilizados como precursores na síntese de uma variedade de compostos biologicamente ativos e de ocorrência natural [COELHO; ALMEIDA, 1999].

Um interesse particular na síntese desses compostos consiste na eletrofilia apresentada por adutos de Baylis-Hillman, que são aceptores de Michael e,

A atividade antiproliferativa desses compostos foi avaliada *in vitro*, de acordo com o estabelecido pelo Instituto Nacional do Câncer (INC). Análises foram realizadas em DMSO, nas concentrações de 250, 25, 2,5 e 0,25 $\mu\text{g/mL}$, obtendo-se resultados significativos para as linhagens de células usadas: UACC62 (melanoma), MCF7 (mama), NCI460 (pulmão), OVCAR (ovário), PC03 (próstata), HT29 (cólon), 786-0 (renal) e NCI-ADR (células mamárias resistentes a vários quimioterápicos) conforme representado na Tabela 1 [KOHN et al., 2006].

Tabela 1. Atividade citotóxica dos compostos 1 e 2 frente a células tumorais humanas [KOHN et al., 2006].

Composto	IC ₅₀ (μM) para linhagens de células							
	UACC62	MCF7	NCIADR	786-0	NCI460	PC-03	OVCAR	HT29
1	9,5	3,1	3,9	61	40	41	40	27
2	3,8	14	2	7,1	4,3	4,1	3,2	21

O {2-[*p*-Nitrofenil(hidroxi)metil]acrilato de metila} (**2**) apresentou pronunciado efeito antiproliferativo frente a células tumorais humanas, principalmente para linhagens resistentes (NCIADR) a vários quimioterápicos utilizados em clínica (Tabela 1) [KOHN et al., 2006].

A presença de dois grupos farmacofóricos se reveste de interesse especial: a cetona α,β -insaturada, por sofrer com facilidade adição de Michael e o grupo nitro por gerar após redução, ânions radicais ou intermediários que podem causar danos ao DNA [DE ABREU et al., 2002].

2. OBJETIVOS

❖ Realizar o estudo eletroquímico do 2-[*p*-Nitrofenil(hidroxi)metil]acrilato de metila (**2**), tanto em meio prótico quanto em meio aprótico, através das técnicas de voltametria cíclica, pulso diferencial e onda quadrada.

❖ Estabelecer o mecanismo eletródico de redução, em comparação com aqueles obtidos a partir do composto-padrão não nitrado, o 2-Fenil(hidroxi)metil]acrilato de metila (**1**).

❖ Realizar eletrólises em potencial controlado, como auxiliar na elucidação do mecanismo eletródico, bem como isolamento e caracterização dos produtos de redução, em ausência e presença de endobióticos.

❖ Investigar a reatividade dos produtos de redução frente aos endobióticos, DNA e glutathione, para obtenção de informações relevantes para a compreensão do mecanismo biológico de ação.

3. EXPERIMENTAL

3.1. PRODUTOS QUÍMICOS E SOLVENTES

Os adutos de Baylis-Hillman (**1 e 2**) foram sintetizados e cordialmente cedidos pela Profa. Dra. Wanda Pereira Almeida (Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP, Campinas – SP) [KOHN, et al., 2006], em colaboração com o Grupo de Eletroquímica do Instituto de Química da UFAL.

O solvente utilizado para os estudos em meio aprótico, N,N-dimetilformamida (DMF) (Acros Organics), foi destilado imediatamente antes de sua utilização. Como o DMF se decompõe quando destilado sob pressão atmosférica, o caminho mais conveniente para sua purificação é a passagem por uma coluna de alumina ativada; secagem com CuSO_4 anidro (remoção de aminas) e destilação sob pressão reduzida. A forma totalmente anidra do solvente é de difícil obtenção. A presença de N-metilformamida deve ser evitada, pois esta pode agir como doador de próton ou interferir no desenvolvimento da reação [LUND, 1991].

O eletrólito suporte utilizado em meio aprótico, sintetizado pelo grupo de eletroquímica, perclorato de tetrabutilamônio, foi seco a pressão reduzida e à temperatura de 40°.

As glutations reduzida e oxidada, utilizadas nos estudos eletroquímicos, foram obtidas comercialmente, Acros Organics.

O dsDNA utilizado nos estudo em biossensor de DNA, consiste em um sal de sódio Tipo I, altamente polimerizado de calf Thymus (Sigma, Saint Louis), dessecado, estocado a 2-8° C, teor de sódio 6,2 % e água 13%.

Os estudos em meio prótico foram realizados em meio aquoso tamponado, em faixa de pH correspondente a meio ácido, neutro e alcalino. Para o preparo dos tampões foi utilizado: fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Vetec); fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Vetec); bicarbonato de sódio anidro

(NaHCO₃) (Merck); hidróxido de sódio (NaOH) (Merck); ácido acético (HOAc) (Synth) e acetato de sódio (NaOAc) (Synth).

3.2. INSTRUMENTOS

Os estudos eletroquímicos dos adutos de Baylis-Hillman (**1** e **2**) foram realizados nos equipamentos Potenciostato/Galvanostato BAS 100B e Autolab PGSTAT 20, sendo realizado tratamento posterior dos gráficos através do programa Origin 6.0.

Os espectros no UV-Vis foram obtidos em um espectrofotômetro Shimadzu MultiSpec-1501, numa faixa de comprimento de onda de 200 a 800 nm.

Os espectros de massa, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono foram realizados na França – Paris. Obtiveram-se espectros de RMN ¹H em espectrômetro Bruker (250,13 MHz). TMS foi o padrão interno e todas as soluções foram preparadas em CDCl₃. Os espectros de RMN ¹³C foram registrados em espectrômetros Bruker (62,90 MHz), tendo como padrão interno CDCl₃.

3.3. PREPARO DAS SOLUÇÕES TAMPÃO

Para o preparo da solução tampão fosfato pH 6,9 (0,1 mol L⁻¹, força iônica = 0,157 mol L⁻¹) foram misturadas 30,5 mL de solução 0,2 mol L⁻¹ de Na₂HPO₄ e 19,5 mL de solução 0,2 mol L⁻¹ de NaH₂PO₄ em balão de 100 mL, preparadas com água padrão Milli-Q, completando-se o volume para 100 mL.

Soluções tampão fosfato pH 9,4 foram preparadas através da adição de NaOH 10 % (v/v) à solução 0,2 mol L⁻¹ de NaH₂PO₄ e Na₂HPO₄ até atingir o valor desejado. Misturou-se 47,35 mL de solução 0,2 mol L⁻¹ de Na₂HPO₄ e 2,65 mL de solução 0,2 mol L⁻¹ de NaH₂PO₄ (0,1 mol L⁻¹, força iônica = 0,200) e o pH foi corrigido para 9,4 com a adição de solução 10 % (v/v) de NaOH.

Para o preparo da solução tampão bicarbonato, foi utilizada uma solução de NaHCO_3 ($0,200 \text{ mol L}^{-1}$), adicionando-se solução 10 % de NaOH até atingir o pH 9,3 (força iônica = $0,2 \text{ mol L}^{-1}$).

A solução tampão acetato ($0,075 \text{ mol L}^{-1}$, força iônica = $0,200 \text{ mol L}^{-1}$) foi preparada através da mistura das soluções de ácido acético (HOAc) $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e acetato de sódio (NaOAc) $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, preparadas com água padrão Milli-Q, obtendo-se um pH final de 4,5, faixa ideal para estudos em biossensor de DNA.

A solução tampão usada nos estudos em biossensor de DNA foi preparada com água padrão Milli-Q fervida, para eliminação da possível presença de microorganismos que possam causar algum dano à molécula de DNA, sendo todas as vidrarias utilizadas previamente lavadas com essa água.

3.4. ESTUDOS ELETROQUÍMICOS

Todos os estudos voltamétricos em meio aprótico foram realizados utilizando-se dimetilformamida como solvente e perclorato de tetrabutilamônio como eletrólito suporte, enquanto que em meio prótico, utilizou-se tampão fosfato, bicarbonato e acetato. Para eliminar o oxigênio presente na cela eletroquímica, borbulhou-se, nitrogênio gasoso, por cerca de 5 a 10 minutos.

3.4.1. ELETRODOS E CELAS

Para os estudos voltamétricos, utilizou-se um sistema de três eletrodos em cela vidro 5 mL. Como eletrodo de trabalho foi utilizado carbono vítreo (BAS, 3 mm de diâmetro, área $7,065 \text{ mm}^2$), fio de platina, como eletrodo auxiliar, Ag/AgCl, Cl^- ($0,100 \text{ mol L}^{-1}$), calomelano saturado (ECS), como eletrodos de referência, respectivamente.

Eletrólises em potencial controlado foram realizadas em cela de vidro Pyrex (100 mL), mantendo-se ânodo e cátodo separados em todo o experimento.

Utilizou-se como eletrodo de trabalho feltro de carbono com dimensões de 2,0 cm x 2,5 cm x 0,5 cm. O eletrodo auxiliar constituiu de um espiral de platina isolado em um tubo de vidro contendo eletrólito suporte e fechado em sua extremidade inferior por um disco de vidro poroso. O eletrodo de referência utilizado foi o mesmo das voltametrias Ag/AgCl, Cl⁻ (0,100 mol L⁻¹).

3.4.2. TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS

As técnicas empregadas para os estudos eletroquímicos foram: voltametria cíclica (VC), voltametria de pulso diferencial (VPD) e voltametria de onda quadrada (VOQ).

Nos estudos em meio aprótico, foi utilizada uma concentração de substrato igual a $2,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, enquanto que em meio prótico, as análises foram realizadas nas concentrações de 1,00 e $2,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹.

Os estudos em valores de pH correspondentes a meio neutro, foram realizados em meio aquoso-etanólico tamponado, EtOH + tampão fosfato (1:9) pH 6,9. Já para os estudos em meio alcalino, pH 9,4 e 9,6, utilizaram-se meio aquoso tamponado e meio misto tamponado. Os estudos em tampão fosfato foram realizados em uma mistura de EtOH + tampão fosfato (1:9) e DMF + tampão fosfato (1:9). Em meio bicarbonato, utilizou-se a mistura EtOH + tampão bicarbonato (2:8).

3.4.3. ELETRÓLISE

Eletrólises em potencial controlado foram realizadas em meio neutro, pH 6,9, em solução EtOH + tampão fosfato (2:8). O oxigênio foi removido por desaeração com nitrogênio durante 15 minutos. Em seguida, iniciou-se a pré-eletrólise dessa solução em $E_{ap} = -1,0$ V, até a corrente atingir aproximadamente 1% do valor inicial. O composto **2** (0,05 g – $2,64 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) foi dissolvido em um volume de etanol previamente reservado e adicionado à solução pré-eletrolisada,

procedendo-se, assim, à eletrólise em $E_{ap} = - 0,950$ V até a corrente atingir valores residuais. Todo o processo foi acompanhado por voltametria cíclica e espectroscopia no UV-Vis.

Ao final do processo, ao ser atingida a corrente residual, anotou-se a carga final. Assim, foi calculada a carga residual, multiplicando o tempo de eletrólise pela corrente residual.

$$Q_{res} = I_{res} \times t \quad (2)$$

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

$$n = Q_{liq} \times MM/m \times F \quad (3)$$

onde n é o número de elétrons, Q_{liq} a carga líquida (Coulombs), MM a massa molecular do substrato ($g \cdot mol^{-1}$), m a massa do substrato (g) e F a constante de Faraday ($96.485 C \cdot mol^{-1}$).

Após o término da eletrólise, retirou-se o compartimento anódico para assim evitar possíveis contaminações do produto, que foi reservado em geladeira. Foi observada a formação de um sólido pastoso no recipiente contendo o produto da eletrólise, sendo então removida cuidadosamente a solução contendo o produto. Após esse procedimento, a solução foi transferida para um funil de separação, onde o produto foi extraído com clorofórmio. À fase orgânica, que continha o produto da eletrólise, adicionou-se sulfato de sódio anidro como agente dessecante, que foi filtrada posteriormente e o solvente evaporado. Obteve-se uma massa de 35 mg de produto, um sólido castanho escuro.

A elucidação estrutural do produto de eletrólise foi feita através dos espectros de massa e ressonância magnética de 1H e ^{13}C :

EM (m/z (%)): 190 (100), 225 (40), 411 (40) M^+ : 444 (66) (Figura 10).

RMN 1H (250,13 MHz, $CDCl_3$): δ 8,2 (d, 1H, Arom., $J_{H-H} = 8,59$ Hz), 8,1 (d, 1H, Arom., $J = 8,48$ Hz), 7,48-7,37 (m, 2H, Arom.), 6,29 e 5,8 (2s, 2H, CH_2), 5,52 (d,

2H, CH, $J_{H-H} = 6,28$ Hz), 3,64 (s, 3H, CH₃), 3,37 (sl, 1H, NH), 2,52 (s, 2H, OH) (Figura 11).

RMN ¹³C (62,90 MHz, CDCl₃): δ 166,7 (CO), 72,94 (CH), 52,011 (CH₂), 29,7 (CH₃) (Figura 12).

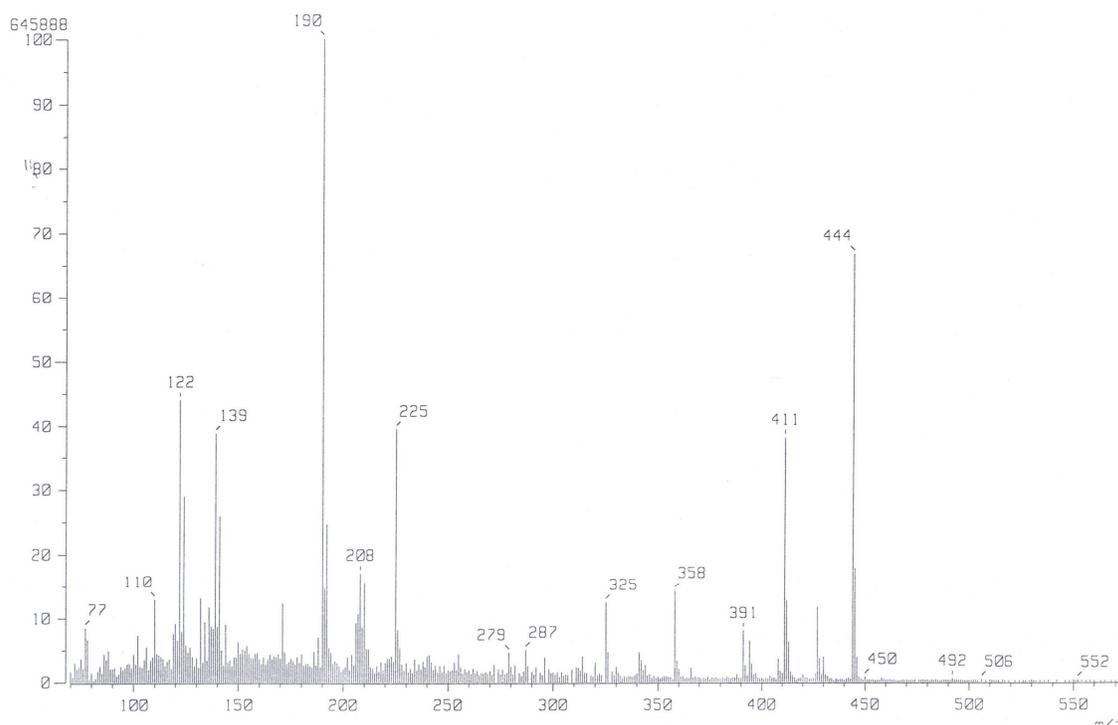


Figura 11. Espectro de massa de massa do produto da redução de **2**.

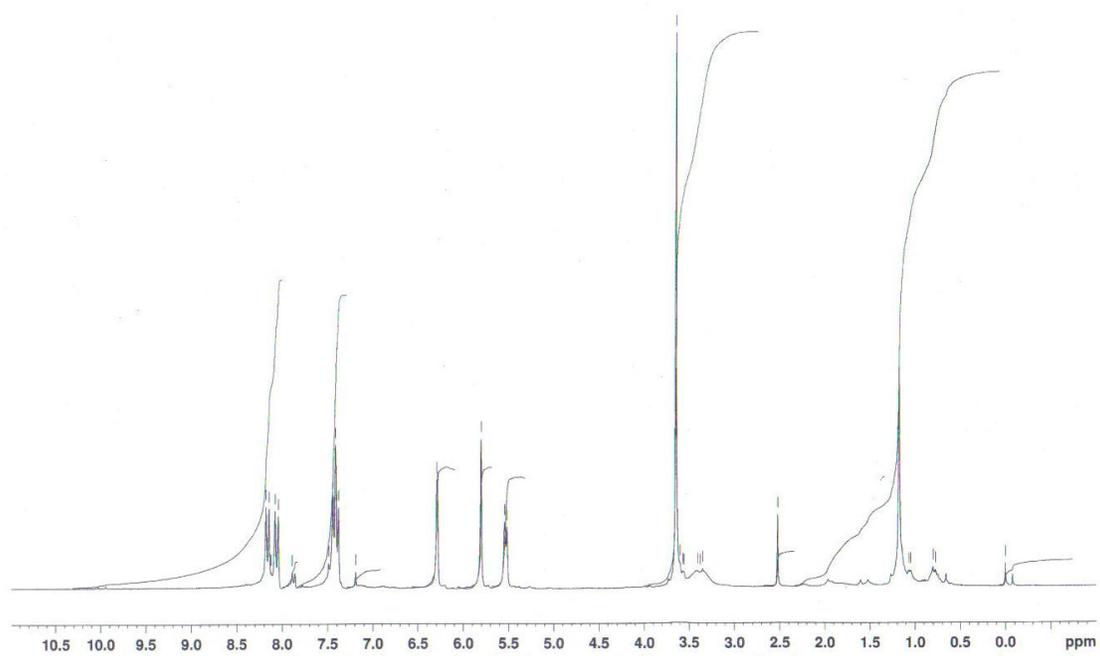


Figura 12. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 250,13 MHz) do produto de redução de 2.

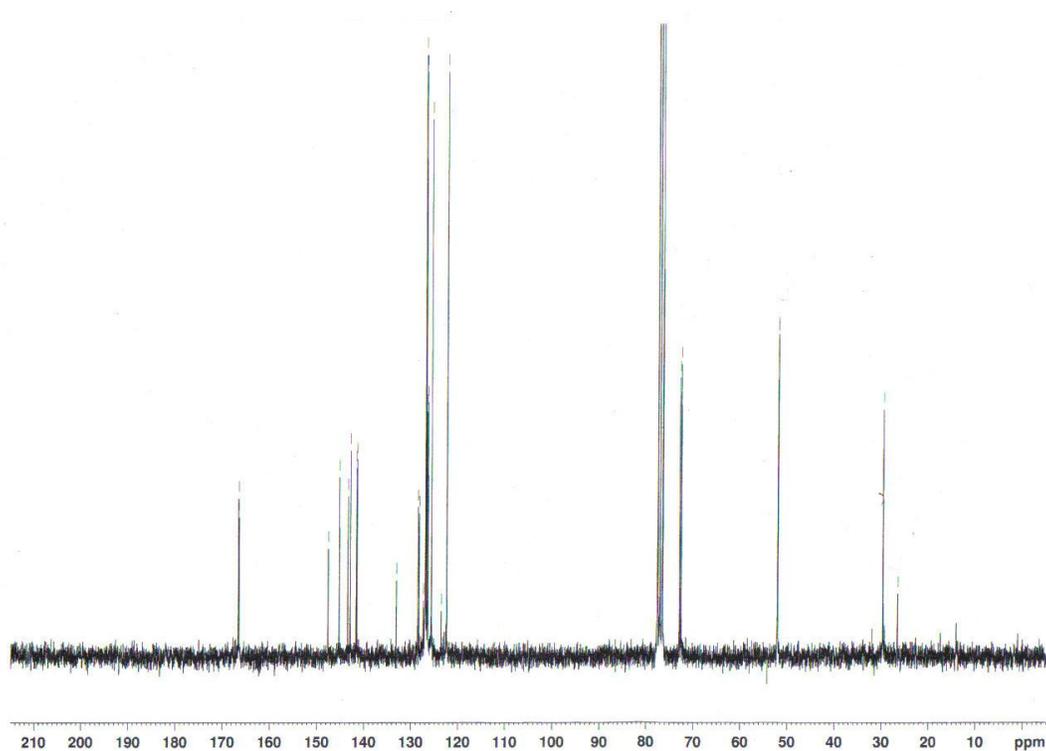


Figura 13. Espectro de RMN ¹³C (CDCl₃, 62,90 MHz) do produto de redução de 2.

3.5. ESTUDOS EM PRESENÇA DE GLUTATIONA

Estudos em presença de glutatona, nas formas reduzida e oxidada, foram realizados através de voltametria cíclica nos seguintes meios tamponados: DMF + fosfato + NaOH (1:9), pH 9,1; EtOH + tampão fosfato + NaOH (1:9), pH 9,4; EtOH + bicarbonato + NaOH (2:8), pH 9,6, respectivamente. Após adição de GSH e de GSSG através da pesagem de massas das mesmas e adição direta a cela eletroquímica, houve variação de pH em relação ao tampão fosfato, onde a força iônica não foi suficiente para evitar o efeito dos grupos ácidos da GSH ($pK_{a_{COOH}}$ 2.126, $pK_{a_{COOH}}$ 3.512, $pK_{a_{SH}}$ 8.736, $pK_{a_{NH_3^+}}$ 9.655) e GSSG ($pK_{a_{COOH}}$ 3.15, $pK_{a_{COOH}}$ 4.03, $pK_{a_{NH_3^+}}$ 8.57, $pK_{a_{NH_3^+}}$ 9.54) [ISON et al., 2006]. Por outro lado, não houve alteração do pH em relação ao tampão bicarbonato. Para o meio EtOH + tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (1:9), o pH inicial 9,4 variou para 8,8 e 7,7 após adição de GSH, 1 x 10⁻³ mol L⁻¹ e 4 x 10⁻³ mol L⁻¹, respectivamente. Já quando GSSG (1 mol L⁻¹) foi adicionada o pH variou para 7,6.

3.5.1. ELETRÓLISE EM POTENCIAL CONTROLADO

Em presença de GSH, realizou-se eletrólise em cela de vidro Pyrex (80 mL), mantendo-se ânodo e cátodo separados em todo o experimento.

A solução etanol/tampão fosfato + NaOH (2:8), pH 9,4, foi desaerada com nitrogênio durante 15 minutos e se iniciou a pré-eletrólise da solução em $E_{ap} = -1,0$ V até a corrente atingir aproximadamente 1% do valor inicial. O composto **2** (0,02 g – 2,11 x 10⁻³ mol L⁻¹) foi dissolvido em volume de etanol previamente reservado e adicionado a solução pré-eletrolisada. GSH (0,038 g – 3,16 x 10⁻³ mol L⁻¹) foi dissolvida com alíquota da solução pré-eletrolisada e então adicionada à cela, procedendo-se assim à eletrólise em $E_{ap} = -0,9$ V até a corrente atingir valores residuais. Todo o procedimento foi acompanhado por voltametria cíclica e espectroscopia no UV-Vis.

No fim da eletrólise, foi observada uma mudança de coloração da solução, que passou de incolor a amarela clara. O compartimento anódico foi removido

para assim evitar possíveis contaminações do produto, sendo a solução transferida para um funil de separação para extração do produto com clorofórmio. No entanto, não foi possível o isolamento do mesmo, devido à alta polaridade.

3.6. ESTUDOS VOLTAMÉTRICOS DE 2 EM BIOSSENSOR DE dsDNA

O estudo eletroquímico do biossensor foi desenvolvido através da técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD), com o uso de eletrodo de carbono vítreo (BAS, diâmetro de 3 mm) modificado com DNA, como eletrodo de trabalho, platina e Ag|AgCl, Cl^- ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) em um tubo com capilar de Luggin com vycor na extremidade, como eletrodo auxiliar e de referência, respectivamente.

Os experimentos foram realizados em solução tampão acetato (NaOAc e HOAc, $1,0 \text{ mol L}^{-1}$) pH = 4,5.

3.6.1. PREPARAÇÃO DO GEL DE dsDNA

Pesaram-se 18,75 mg de dsDNA, colocados em frasco ependdorff juntamente com 0,5 mL de tampão acetato (3 mg/80 μL). Guardou-se na geladeira por 24 horas.

3.6.2. PREPARAÇÃO DO BIOSSENSOR DE dsDNA

O eletrodo de carbono vítreo foi inserido em cela eletroquímica, posicionado em posição vertical no sentido contrário ao convencional (Figura 14), adicionando-se então o tampão acetato e a várias varreduras numa faixa positiva de potencial de 0 a + 1,4 V. Efetuado esse condicionamento, colocaram-se 50 μL do gel na superfície limpa do eletrodo de carbono vítreo; em seguida deixou-se secar por 24 horas em temperatura ambiente devidamente coberto por papel alumínio.

O biossensor foi imerso na solução tampão acetato (pH = 4,5) e submetido a várias ciclagens na região de potencial de 0 a + 1,4 V, até obtenção de resposta voltamétrica estável.

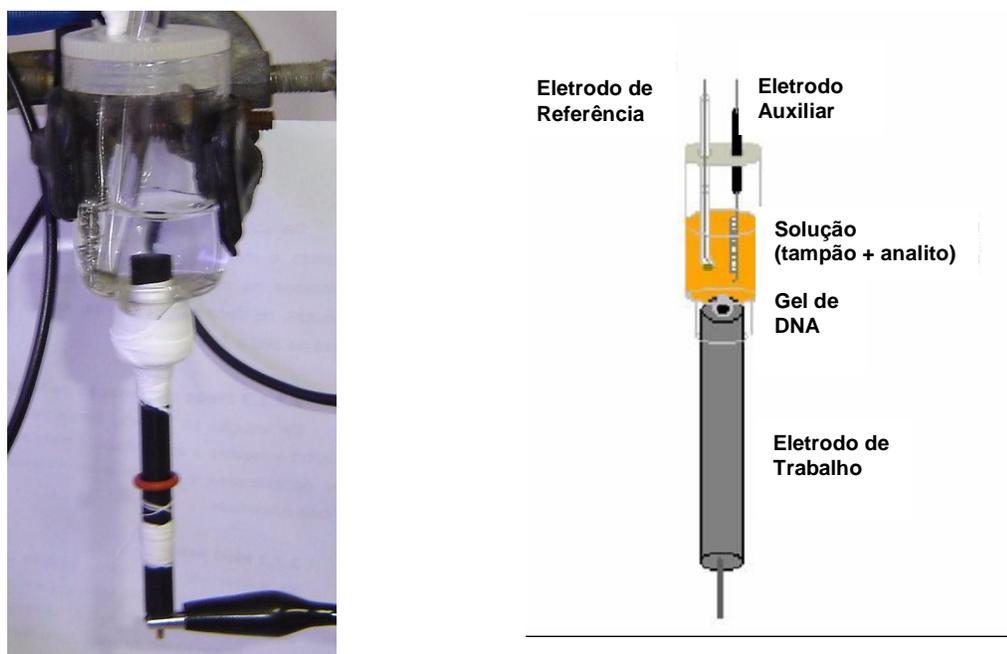


Figura 14. Representação da cela eletroquímica utilizada em biossensor de DNA.

Após ter sido preparado o biossensor de dsDNA, foram adicionados ao gel depositado em superfície eletródica, 20 μL de solução do analito em concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, permanecendo esta em contato com gel durante 24 horas até completa secagem e penetração da substância na matriz de DNA. Decorrido esse tempo, adicionaram-se 10 mL de tampão acetato, pH 4,5, mantendo-se fixo o potencial em -0,7 V durante 120 segundos para redução do grupo nitro, seguido de varredura anódica de 0 a + 1,4 V. As mesmas condições experimentais aplicadas ao biossensor em presença do analito foram aplicadas a um outro biossensor em ausência do analito, denominado de branco. A este biossensor foi adicionado apenas o eletrólito suporte.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De modo geral, o mecanismo de ação de fármacos biorredutíveis, ou agentes antineoplásicos, como já discutido para compostos nitroaromáticos, é dependente de biorredução [RAUF et al., 2005]. A elucidação do mecanismo eletródico, a caracterização dos produtos de redução, a análise das possíveis interações desses produtos com GSH e DNA, são de alta relevância para entender o mecanismo de ação farmacológica [NÚÑEZ-VERGARA et al., 2005].

Devido à natureza do ambiente celular, que pode ser lipofílico ou hidrofílico, aliada às evidências que apontam para o envolvimento de espécies radicalares a partir da redução do grupo nitro no mecanismo de ação biológico, bem como a atuação desse grupo em regiões hipóxicas de tumores, como radiosensibilizador [DE ABREU et al., 2002; BARETY et al., 1983; JAFFAR et al., 2001], no presente trabalho, estudos eletroquímicos de adutos de Baylis-Hillman foram realizados buscando-se caracterizar o mecanismo redox envolvido, prováveis interações com biomoléculas, na tentativa de correlacionar os parâmetros termodinâmico-cinéticos encontrados com atividades biológicas obtidas, após ensaios realizados *in vitro*, que revelaram expressiva atividade antiproliferativa [KOHN et al., 2006]. Esses estudos foram realizados nos meios prótico e aprótico, buscando-se similaridade com as condições biológicas.

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

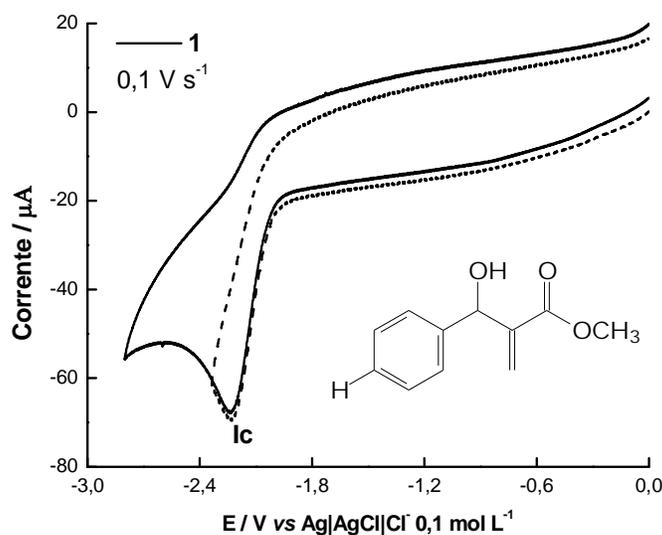
4.1. ESTUDOS EM MEIO APRÓTICO

Estudos eletroquímicos dos adutos de Baylis-Hillman **1** {2-[Fenil(hidroxi) metil] acrilato de metila} e **2** {2-[*p*-Nitrofenil(Hidroxi) metil] acrilato de metila} foram realizados em um eletrodo de carbono vítreo, em DMF/TBAP 0,1 mol L⁻¹, com a utilização das técnicas de voltametria cíclica, pulso diferencial e onda quadrada.

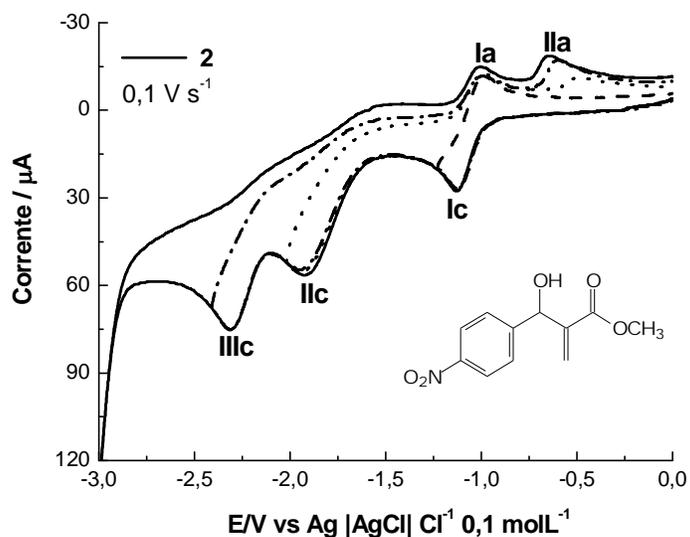
O aduto **1**, que possui apenas o grupo acrilato (cetona α,β -insaturada) como grupo eletroativo, foi estudado por voltametria cíclica. Esse estudo foi realizado no intuito de se observar o potencial referente à redução do grupo funcional acrilato, para que, posteriormente, através da comparação entre os voltamogramas obtidos tanto para o composto **1** quanto para **2**, fosse possível uma melhor caracterização dos picos catódicos referentes aos grupos eletroativos presentes.

4.1.1. VOLTAMETRIA CÍCLICA

Os voltamogramas cíclicos de **1** e **2** obtidos em meio aprótico são representados na Figura 15. É possível observar no voltamograma do aduto **1** (Figura 15A) que o mecanismo eletródico é caracterizado apenas por uma onda catódica denominada Ic. Já para seu derivado que possui tanto a função nitro quanto o grupo acrilato, o mecanismo eletródico é complexo, e os voltamogramas cíclicos obtidos evidenciam a presença de três ondas de redução (Ic, IIc e IIIc) e duas ondas de oxidação (Ia e IIa) de acordo com a Figura 15B.



A



B

Figura 15. Voltametria cíclica em meio aprótico DMF/TBAP 0,1 mol L⁻¹, carbono vítreo (área = 7,065 mm²), [1] = [2] = 2 x 10⁻³ mol L⁻¹. ν = 0,100 V s⁻¹. A: composto 1. B: composto 2.

A redução de **1** apresenta característica de processo irreversível ($E_p - E_{p1/2} = 0,152$ V), não sendo observada em varredura reversa a presença de onda anódica correspondente ao processo catódico, onda Ic ($E_{pc1} = -2,24$ V a 0,100 V s⁻¹)

(Figura 15A). No espectro eletroquímico de **2**, que possui as funções nitro e acrilato como grupos eletroativos, é observado, para $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$, (Figura 15B), que o primeiro processo de redução é caracterizado por um par de ondas monoeletrônicas (I_c e I_a), de natureza difusional (I_p vs $v^{1/2}$) e reversível (E_{pc1} não varia em função da velocidade de varredura, $I_{pa1}/I_{pc1} \sim 1$) (Tabela 4) seguidas de duas ondas catódicas (II_c e III_c), que de acordo com a feição das curvas ciclovoltagemétricas se mostram irreversíveis (Figuras 15B).

Tabela 2. Parâmetros voltamétricos de **2**. Efeito da velocidade de varredura. Eletrodo de Carbono Vítreo, E_p vs. $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{Cl}^- 0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{Cl}^-$.

v (V s ⁻¹)	E_{pc1}/V	E_{pc2}/V	E_{pc3}/V	E_{pa1}/V	E_{pa2}/V	$E_{p1}-E_{p1/2}/V$	$I_{pa1}/I_{pc1}(\mu A)$
0,02	-1,105	-1,850	-2,256	-1,008	-----	0,070	0,84
0,035	-1,113	-1,898	-2,274	-1,002	-----	0,075	0,84
0,050	-1,116	-1,925	-2,301	-0,997	-----	0,080	0,84
0,075	-1,122	-1,937	-2,320	-0,988	-----	0,080	0,84
0,100	-1,127	-1,925	-2,320	-1,000	-0,643	0,080	0,85
0,200	-1,110	-1,838	-2,260	-0,990	-0,640	0,080	0,86
0,300	-1,119	-1,853	-2,291	-0,996	-0,656	0,090	0,86
0,400	-1,130	-1,892	-2,320	-0,987	-0,622	0,100	0,86
0,500	-1,130	-1,802	-2,266	-0,999	-0,671	0,100	0,86
0,075	-1,138	-1,865	-2,322	-0,966	-0,640	0,110	0,86
1	-1,152	-1,907	-2,335	-0,993	-0,607	0,120	0,86

O processo de redução de **2**, em meio aprótico, é característico de composto nitroaromático [NÚÑEZ-VERGARA et al., 2005], com uma onda adicional em potenciais mais negativos. No meio estudado, a redução do nitroaromático resulta na formação de intermediário radicalar estável após transferência de um elétron, o ânion radical nitro (Figura 16, etapa 1), que se refere ao primeiro processo eletródico, onda I_c (-1,122 V) e sua correspondente anódica I_a (-1,000 V) (Figura 15B). O processo de redução do ânion radical nitro,

em meio aprótico, se completa na onda IIc (-1,925 V) (Figura 15B), em processo que envolve o consumo de mais três elétrons e quatro prótons para formação do derivado hidroxilamínico ou outros produtos, a depender da estabilidade ou não da hidroxilamina (Figura 16, etapa 2).

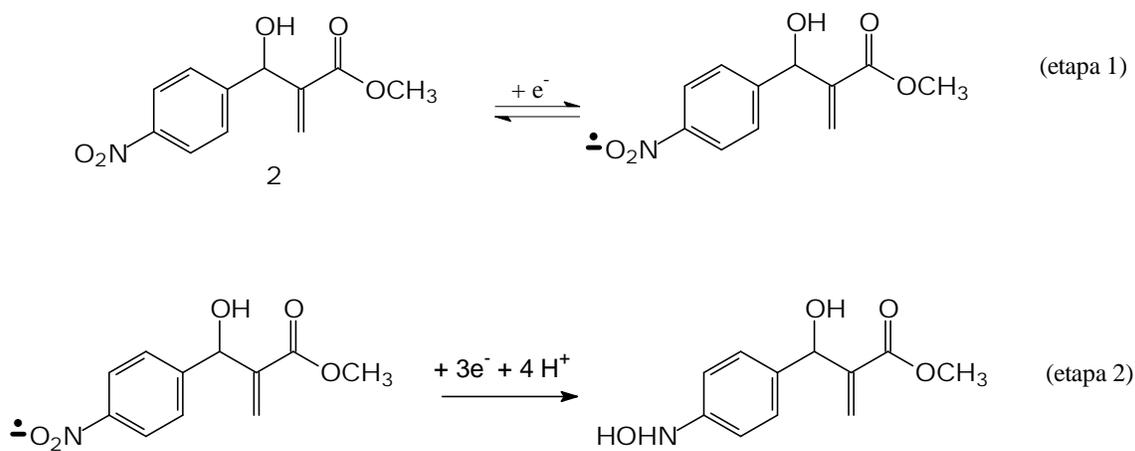


Figura 16. Esquema representativo da provável redução de **2** em DMF/TBAP.

Em baixas velocidades de varredura, os voltamogramas cíclicos de **2** revelaram a presença de apenas uma onda anódica no ciclo reverso (Figura 17A), referente ao par redox nitro/ânion radical nitro. Porém, quando a velocidade de varredura é igual ou superior a $0,100 \text{ V s}^{-1}$, o voltamograma apresenta uma segunda onda anódica (IIa) (-0,643 V) (Figura 17B). De acordo com os dados da literatura, onde o comportamento de redução de nitroaromáticos é bastante explorado [BOLLO et al., 2001], a onda anódica IIa observada em valores de potencial pouco negativos, refere-se à oxidação da hidroxilamina formada no segundo processo eletródico.

Em varreduras sucessivas, observa-se a $1,00 \text{ V s}^{-1}$, a presença de uma nova onda catódica (I'c) (Figura 17C). Por outro lado, o mesmo comportamento não é evidenciado em velocidades de varredura inferiores, conforme pode ser observado na figura 17B. A presença desse novo sistema redox, bem como a presença da segunda onda anódica apenas em altas velocidades de varredura, sugere a instabilidade da hidroxilamina, que provavelmente pode sofrer reações

posteriores a sua formação, por exemplo, com perda de água e formação do derivado oximaquinonametídeo (Figura 18).

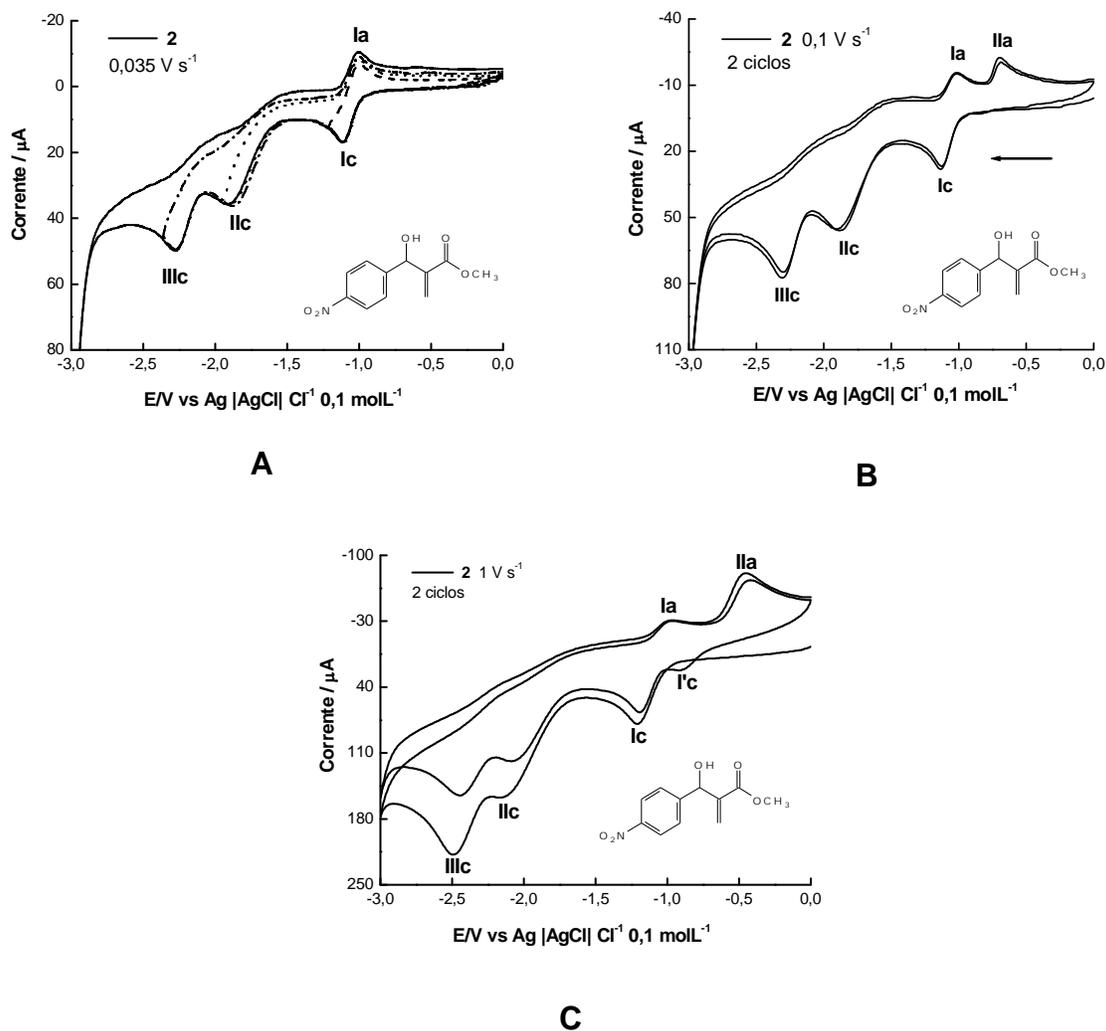


Figura 17. Voltamogramas cíclicos de 2 ($2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em meio aprótico DMF+TBAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, carbono vítreo (área = $7,065 \text{ mm}^2$). A: $v = 0,035 \text{ V s}^{-1}$; B: $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$; C: $v = 1,000 \text{ V s}^{-1}$, em varreduras sucessivas.

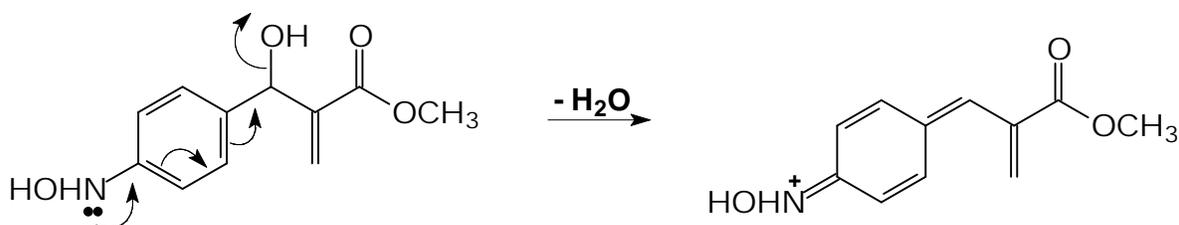


Figura 18. Provável mecanismo para a decomposição da hidroxilamina em meio aprótico.

Como mencionado anteriormente, a redução do composto **2** envolve três processos eletródicos, sendo que o último, onda IIIc, é observado em valores de potencial mais negativos (-2,311 V). A redução do derivado **1**, que não possui o grupo nitro, revelou uma onda catódica na mesma faixa de potencial (Figura 13A). Desta forma, a similaridade nos potenciais de redução sugere que este último processo seja relacionado à presença do mesmo grupo eletroativo nas duas moléculas, a cetona α,β -insaturada.

O comportamento eletroquímico de compostos carbonílicos, como cetonas α,β -insaturadas é bastante complexo em função das possibilidades reacionais observadas quando essas estruturas são submetidas à redução eletroquímica. O processo de redução pode envolver a saturação da ligação dupla, redução da carbonila a álcool, ou os dois processos conjuntamente, diversos acoplamentos, formação de oligômeros e polímeros por seqüenciamento de acoplamentos e formação de compostos organometálicos, quando eletrodos metálicos são utilizados [LUND; BAIZER, 1990].

De acordo com as considerações a respeito da classe em questão, pode-se considerar que: quando um grupo eletroativo se encontra em conjugação com uma olefina, a molécula se torna, sob condições comparáveis, mais facilmente redutível do que se não houvesse conjugação; a ligação dupla, na maioria dos casos, sofre redução antes do grupo carbonílico [LUND; BAIZER, 1990].

Embora no estudo ora realizado, a caracterização dos prováveis produtos de redução da cetona α,β -insaturada não tenha sido realizada, de acordo com o que se conhece na literatura a respeito da classe enona, a onda catódica IIIc, presente no espectro eletroquímico dos compostos estudados provavelmente se refere à redução da ligação dupla e conseqüente saturação desta ligação.

4.1.2. VOLTAMETRIAS DE PULSO DIFERENCIAL E ONDA QUADRADA

O voltamograma de pulso diferencial de **2** também é representado por três ondas de redução. A onda I_c (-1,044 V), correspondente ao ânion radical nitro, é representada por um pico bem definido e agudo, de alta intensidade de corrente, enquanto a segunda e terceira ondas, II_c (-1,661 V) e III_c (-2,122 V), apresentam menores intensidades de corrente e são alargados (Figura 19).

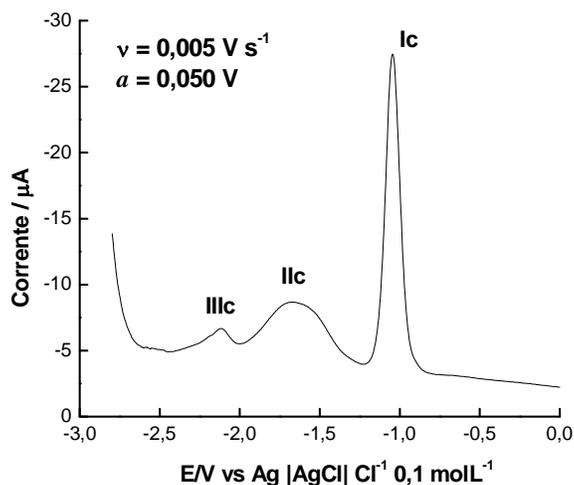


Figura 19. Voltametria de pulso diferencial de **2** ($2 \times 10^{-3} \text{ mmol L}^{-1}$) em meio aprótico DMF / TBAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, carbono vítreo (área = $7,065 \text{ mm}^2$), $\nu = 0,005 \text{ V s}^{-1}$ e $a = 0,050 \text{ V}$.

Os estudos eletroquímicos realizados através da voltametria de onda quadrada, assim como voltametria de pulso diferencial, foram úteis no sentido de complementar a elucidação do mecanismo de redução de **2**, já descrito anteriormente.

Os resultados obtidos em voltametria de onda quadrada foram similares aos observados em voltametria cíclica. De acordo com a contribuição das correntes de pico direto e inverso na intensidade da corrente pico resultante (Figura 20), a reversibilidade do primeiro processo de transferência de elétrons foi confirmada. Através dessa técnica, a formação do intermediário estável ânion radical nitro é observada em $-1,057 \text{ V}$ (I_c).

O processo eletródico é seguido por mais duas ondas catódicas pouco definidas, denominadas IIc e IIIc, em potenciais de $-1,817$ V e $-2,191$ V, respectivamente. Para estas duas últimas é observada a irreversibilidade do processo, conforme ausência de corrente pico inverso para os dois processos. Esta observação corrobora os resultados descritos na voltametria cíclica.

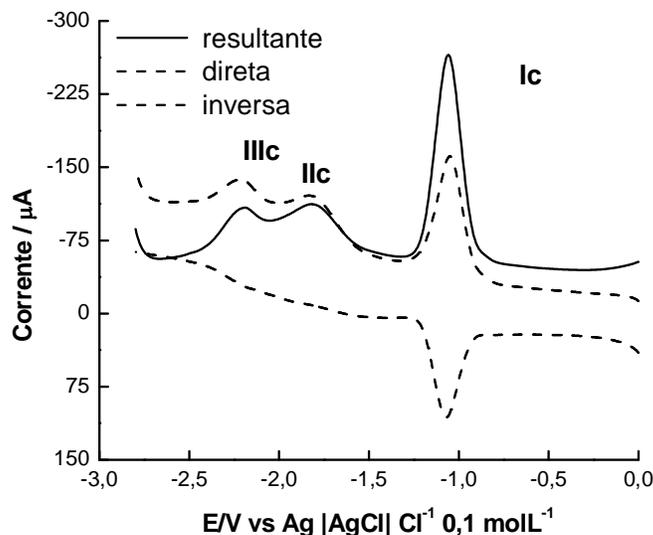


Figura 20. Voltametria de onda quadrada de **2** (2×10^{-3} mol L $^{-1}$) em meio aprótico DMF / TBAP 0,1 mol L $^{-1}$, carbono vítreo (área = 7,065 mm 2), $f = 30$ Hz.

4.2. ESTUDOS EM MEIO PRÓTICO

A redução eletroquímica de nitroaromáticos em meio prótico é um processo complexo e fortemente dependente do pH. Em meio ácido, observa-se tanto a formação da hidroxilamina quanto do derivado aminado. Porém, apenas um pico catódico, referente ao primeiro derivado, caracteriza o espectro eletroquímico obtido em meio neutro. Por outro lado, a redução em valores de pH correspondentes a meio alcalino, em consequência da baixa atividade de prótons,

resulta na formação de intermediário ânion radical mais estável [SQUELLA, NÚÑEZ-VERGARA, 2005], que não sofre reações de protonação acopladas.

4.2.1. ESTUDOS EM MEIO NEUTRO

4.2.1.1. VOLTAMETRIA CÍCLICA

Estudos eletroquímicos em meio prótico foram realizados em meio aquoso-etanólico tamponado (10%), pH ~ 6,9, para promover a completa solubilização do composto.

No meio estudado, os voltamogramas cíclicos de **2** revelam um mecanismo de redução típico de nitroaromático em meio prótico [ZUMAN et al., 1992]. O voltamograma é constituído por uma onda catódica I_c (-0,741 V, $\nu = 0,100 \text{ V s}^{-1}$) bem definida, de controle difusional (I_{pc1} vs $\nu^{1/2}$) e irreversível (E_{pc1} varia com $\log \nu$) (Figura 21 A,B,D,E e F). Em varreduras sucessivas, foi possível observar a presença de uma nova onda catódica (I'_c) em - 0,210 V (Figura 21C).

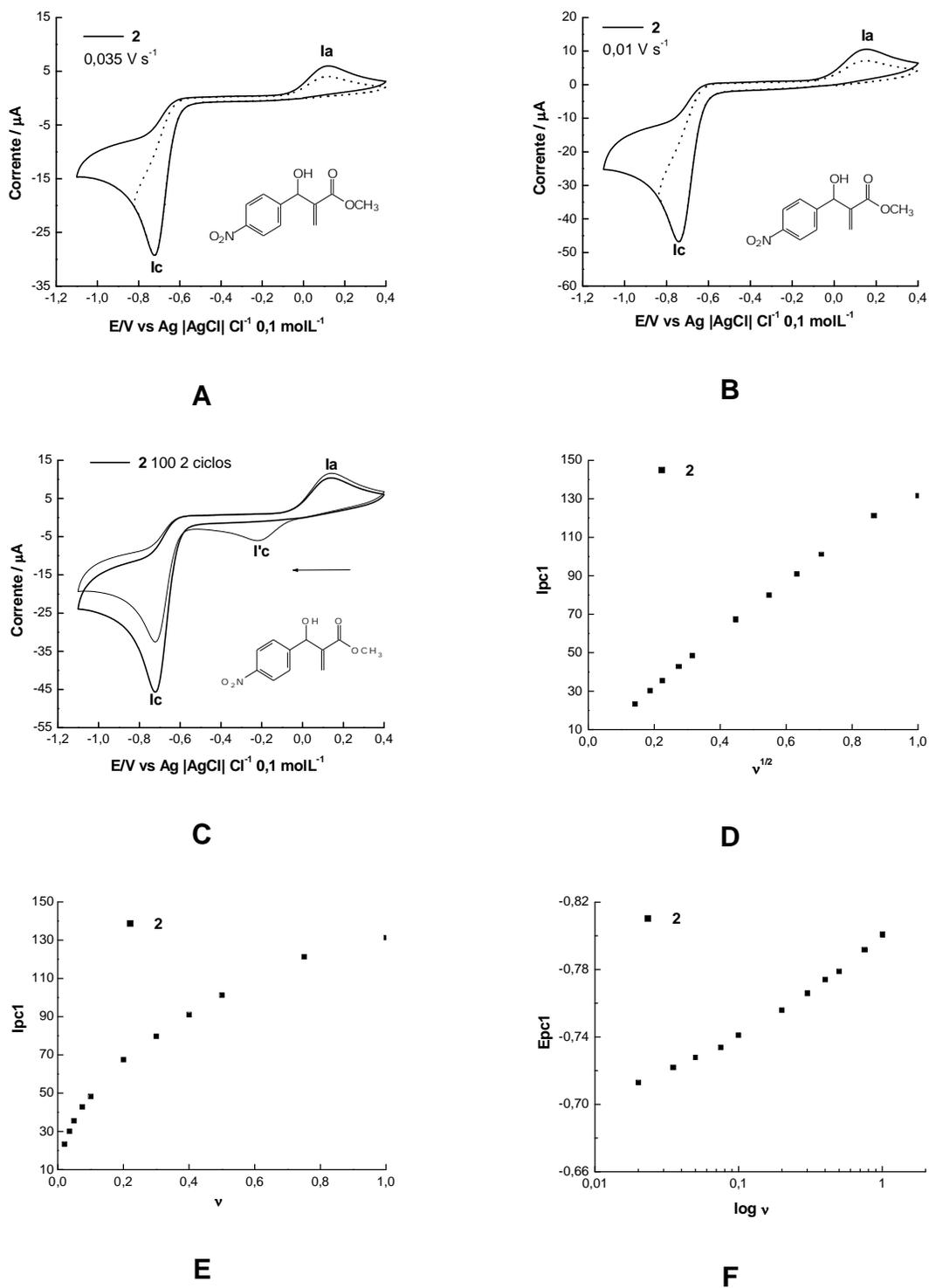


Figura 21. Voltametria cíclica de **2** (1 x 10⁻³ mol L⁻¹) em meio prótico tamponado (etanol + tampão fosfato: 1/9, 0,1 mol L⁻¹), carbono vítreo (área = 7,065 mm²). A: v = 0,035 V s⁻¹. B: v = 0,100 V s⁻¹. C: Varreduras sucessivas a v = 0,100 V s⁻¹. D: *I*_{pc1} vs v^{1/2}. E: *I*_{pc1} vs v. F: *E*_{pc1} vs log v.

A redução de nitroaromáticos em meio aquoso tamponado, pH 7,0, caracteriza-se por um pico catódico, processo envolvendo o consumo de quatro elétrons e quatro prótons, para formar a hidroxilamina que, em varredura anódica é oxidada ao derivado nitroso (Figura 22). Para varreduras sucessivas, um segundo pico catódico relacionado à redução do nitroso também é observado [LUND; BAIZER, 1990]. Desta forma, o pico de redução observado no voltamograma de **2** (Figura 21A) refere-se a formação da hidroxilamina, enquanto que o par redox (Ia/I'c) presente no voltamograma obtido em varreduras sucessivas, corresponde a oxidação da hidroxilamina e posterior redução do derivado nitroso.



Figura 22. Redução do grupo nitro em meio prótico.

De acordo com os relatos que sugerem o envolvimento dos derivados nitroso e hidroxilamina no mecanismo de ação de nitrocompostos, em regiões hipóxicas de tumores sólidos [ZIEBA-MIZGALA et al., 2005], buscaram-se evidências da formação destes derivados através dos estudos realizados. Para tal, nos experimentos voltamétricos, manteve-se constante o potencial do eletrodo no valor correspondente à formação da hidroxilamina durante um período determinado.

Após manter o potencial constante em $-0,900$ V, relativo à onda I_c, durante 120 segundos (Figura 23B e 23C), foi possível observar um aumento nas intensidades de corrente das ondas Ia e I'c, em relação à varredura de dois ciclos convencional (Figura 23A). Este comportamento sugere que, após esse tratamento, a hidroxilamina é concentrada na superfície do eletrodo, com conseqüente aumento na intensidade de corrente para o processo nitroso/hidroxilamina.

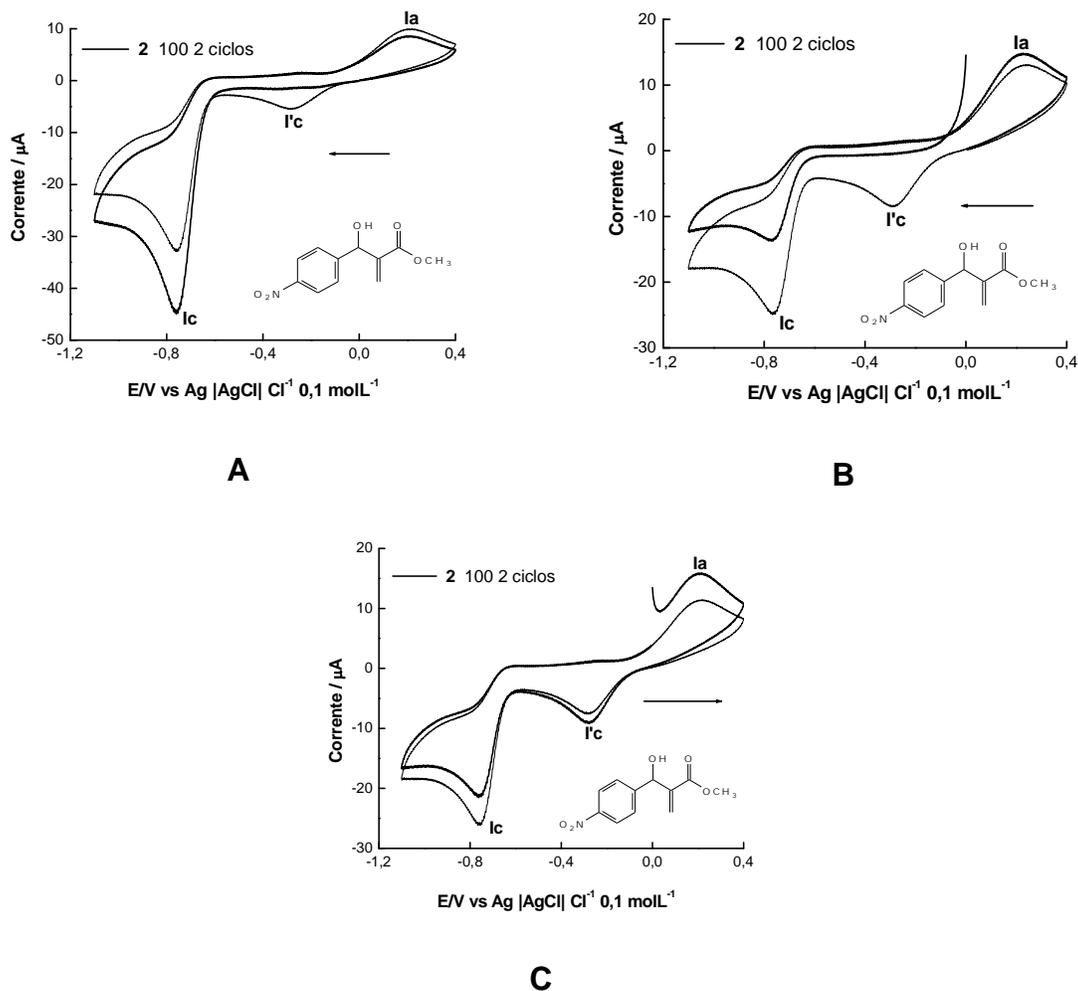


Figura 23. Voltametria cíclica de **2** ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em meio prótico tamponado (etanol+tampão fosfato: 1/9, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ Varredura), carbono vítreo (área = $7,065 \text{ mm}^2$). A: sucessiva a $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. B e C: $E_{ap.} = -0,9 \text{ V}$, por 120 s.

4.2.1.2. VOLTAMETRIAS DE PULSO DIFERENCIAL E ONDA QUADRADA

Nos voltamogramas de pulso diferencial (Figura 24A) e onda quadrada (Figura 24B) de **2**, foi observada também, apenas uma onda catódica referente à redução do grupo nitro. Em voltametria de pulso diferencial, a formação do derivado hidroxilaminico é observada em $-0,695 \text{ V}$, enquanto que, em onda

quadrada, o potencial referente a este processo corresponde a $-0,690$ V. Os resultados obtidos a partir dessas duas técnicas, assim como em voltametria cíclica não revelaram a presença do pico referente à redução do grupo acrilato, como observado em meio prótico. Apesar da conjugação, a redução do grupo acrilato (cetona α,β -insaturada), é observada apenas em valores de potencial mais negativos. Assim, como os estudos foram realizados numa faixa restrita de potencial (0 a $-1,1$ V), não foi possível observar o pico catódico referente à redução desse grupo funcional.

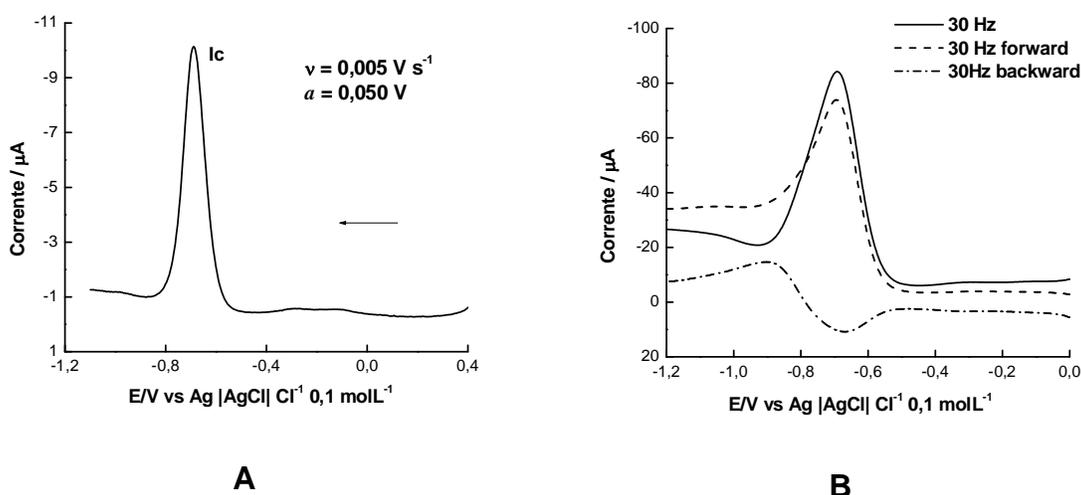


Figura 24. Voltamogramas de **2** (1×10^{-3} mol L $^{-1}$) em meio prótico (etanol + tampão fosfato:1/9, 0,1 mol L $^{-1}$), carbono vítreo (área = 7,065 mm 2). A: Pulso diferencial, $v = 0,005$ V s $^{-1}$. B: Onda quadrada, $f = 30$ Hz.

Uma das vantagens da voltametria de onda quadrada é que a corrente resultante é a diferença das correntes direta e inversa, pois a varredura ocorre simultaneamente no sentido da redução e oxidação. Assim, certo grau de reversibilidade é observada para o processo de transferência de elétrons referente à formação da hidroxilamina a partir de **2**, conforme contribuição observada na corrente da varredura inversa (Figura 24B).

O potencial do eletrodo foi mantido em $-0,8$ V durante 120 segundos (Figura 25), para redução do grupo nitro, sendo observadas mudanças

significativas nos voltamogramas ao se fazer varreduras tanto no sentido da redução, quanto da oxidação.

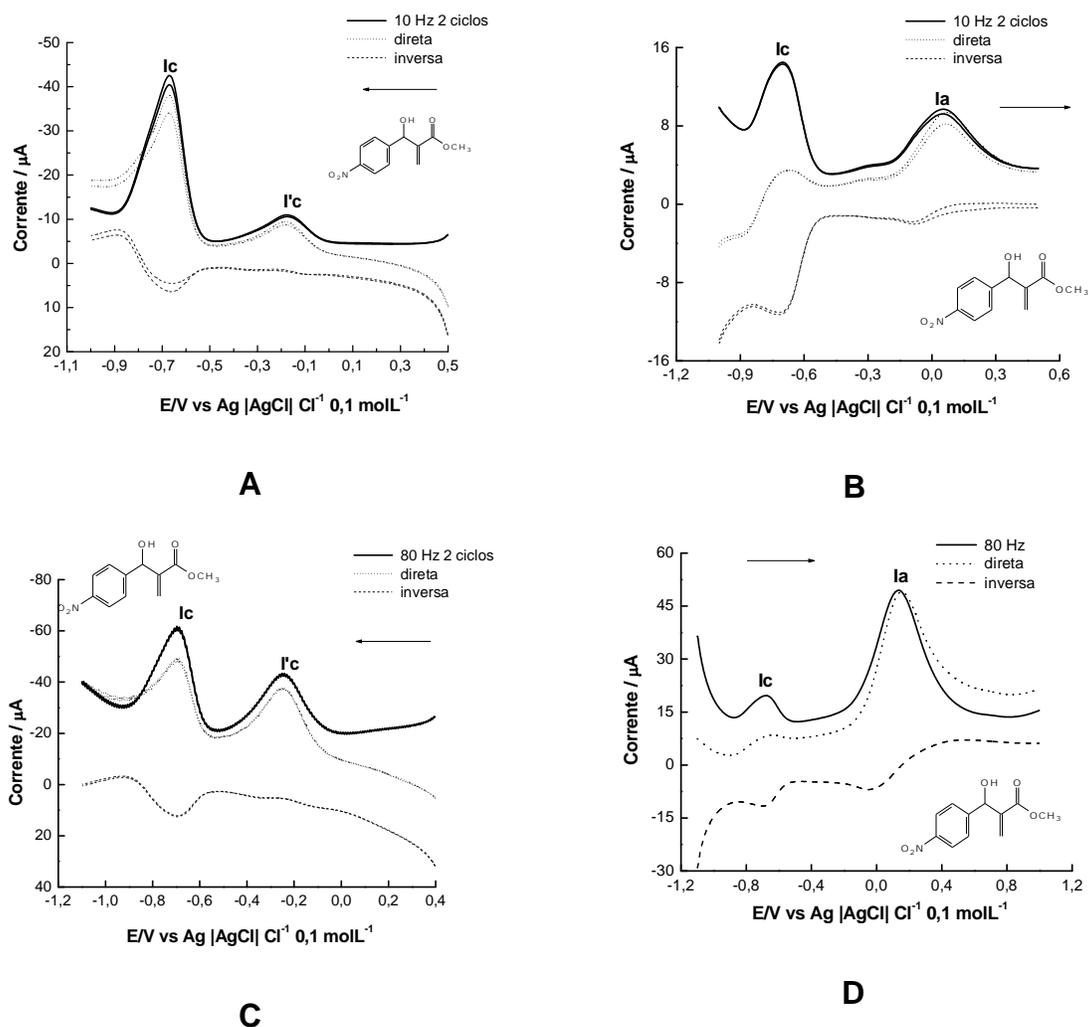


Figura 25. Voltametria de onda quadrada de **2** ($1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) em meio prótico tamponado (etanol + tampão fosfato: (1:9) 0,1 mol L⁻¹), carbono vítreo (área = 7,065 mm²). A: $E_{ap.} = -0,8$ V / Direção: Redução, $f = 10$ Hz. B: $E_{ap.} = -0,8$ V / Direção: Oxidação, $f = 10$ Hz. C: $E_{ap.} = -0,8$ V / Direção: Redução, $f = 80$ Hz. D: $E_{ap.} = -0,8$ V / Direção: Oxidação, $f = 80$ Hz.

Em varreduras realizadas no sentido da redução, após manter fixo o potencial do eletrodo, é possível observar no voltamograma de onda quadrada, um novo pico catódico (I'_c) em $-0,163$ V, referente à redução do produto formado na primeira varredura (I_c) (Figura 25A). Já para varreduras em direção anódica, o

espectro eletroquímico evidencia a presença de uma onda de anódica (I_a) em -0,053 V. Um aumento na intensidade de corrente desses processos é observado em maiores valores de frequência (Figura 25 C e D).

De acordo com os resultados obtidos a partir desses estudos, a formação dos derivados nitroso e hidroxilamínico tornam-se evidentes. O pré-tratamento submetido ao eletrodo permitiu que a hidroxilamina fosse concentrada na superfície eletródica. Desta forma, ao se realizar varredura no sentido negativo, com base no fundamento da voltametria de onda quadrada, o novo pico catódico (I'_c) observado é relacionado à redução do nitroso, obtido simultaneamente a formação da hidroxilamina (Figura 25A e C). Por outro lado, nos estudos no sentido positivo, a onda I_a, refere-se à formação do nitroso a partir da oxidação da hidroxilamina (Figura 25B e D).

4.2.2. ESTUDO EM MEIO ALCALINO

Os voltamogramas cíclicos de **2**, em valores de pH correspondente a meio alcalino, mostram uma mudança significativa no comportamento eletroquímico em relação ao observado em meio neutro. Buscando-se investigar a estabilidade do ânion radical nitro em meio alcalino, bem como a reatividade desta espécie com glutathione, estudos eletroquímicos foram realizados em dois meios tamponados, fosfato e bicarbonato. O comportamento eletroquímico obtido nesses meios é caracterizado por duas ondas catódicas, revelando um comportamento similar ao já descrito para nitroaromático em meio alcalino [CARBAJO et al., 2000].

Em meio fosfato, pH 9,4, o espectro eletroquímico de **2** apresenta duas ondas catódicas bem definidas, sendo observado certo grau de reversibilidade para o primeiro processo eletródico e irreversibilidade para a segunda onda de redução (Figura 26A). Em varredura sucessiva, a presença de um novo sistema redox I_a/I'_c (Figura 26B) é evidenciada.

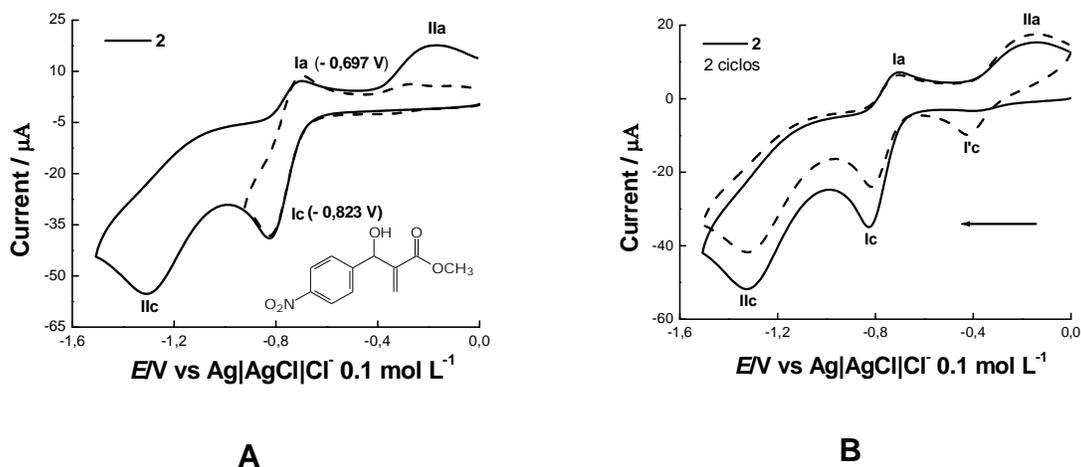


Figura 26. Voltamogramas cíclicos de **2** ($2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em meio prótico, DMF/tampão fosfato + NaOH (1:9), pH 9,4, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A: $v = 0,035 \text{ V s}^{-1}$. B: varreduras sucessivas, $v = 0,035 \text{ V s}^{-1}$.

Comportamento eletroquímico similar foi obtido em tampão bicarbonato, na mesma faixa de pH. Para o primeiro processo de transferência de elétrons também foi observada certa reversibilidade (Figura 27A), bem como a irreversibilidade do segundo e a presença do sistema quase reversível Ilc/I'c em varredura sucessiva (Figura 27B).

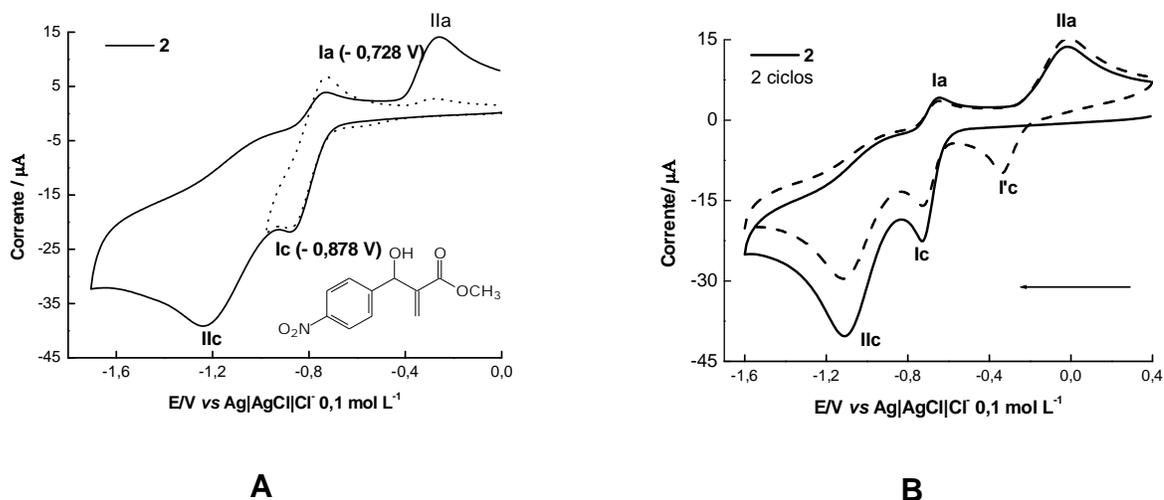


Figura 27. Voltamogramas cíclicos de **2** ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em meio prótico, etanol/bicarbonato + NaOH (1:9), pH 9,4. A: $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. B: varredura sucessiva, $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$.

Para ambos os meios, a reversibilidade do primeiro processo de transferência de elétrons, onda catódica (Ic) e sua correspondente anódica (Ia), sugerem a presença do par redox nitro/ânion radical nitro, enquanto que a segunda onda catódica (IIc) observada em valores de potencial mais negativo, com características de processo irreversível, refere-se à formação da hidroxilamina. Em varreduras sucessivas, o sistema quase-reversível (IIa/I'c), referente ao par RNO/RNHOH, evidencia que a hidroxilamina é estável nos meios estudados.

4.2.3. ELETRÓLISE EM POTENCIAL CONTROLADO

Com objetivo de elucidar o mecanismo de redução eletroquímica, bem como identificar os produtos de redução, eletrólises em potencial controlado de **2** foram realizadas em meio aquoso-etanólico tamponado, pH aparente 6,9.

A eletrólise a potencial controlado de **2** ($0,05 \text{ g} - 2,64 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foi realizada em $E_{ap} -0,950 \text{ V}$, registrando-se o número de coulombs envolvidos, o valor da corrente residual e o tempo do processo. A reação ocorreu envolvendo um consumo de 4,0 elétrons/mol, de acordo com os cálculos realizados a partir da equação de Faraday, num tempo total de 4 horas (Figura 28A). No final da eletrólise foi observada uma mudança de coloração da solução, que passou de incolor a marrom escura.

A reação foi acompanhada por voltametria cíclica e espectroscopia no UV-Vis (Figura 28 B-D). É possível observar, após o término da eletrólise, o completo desaparecimento da onda catódica (Ic) e um aumento da intensidade de corrente das ondas Ia e I'c seguidas de um leve deslocamento de potencial (Figura 28B-C).

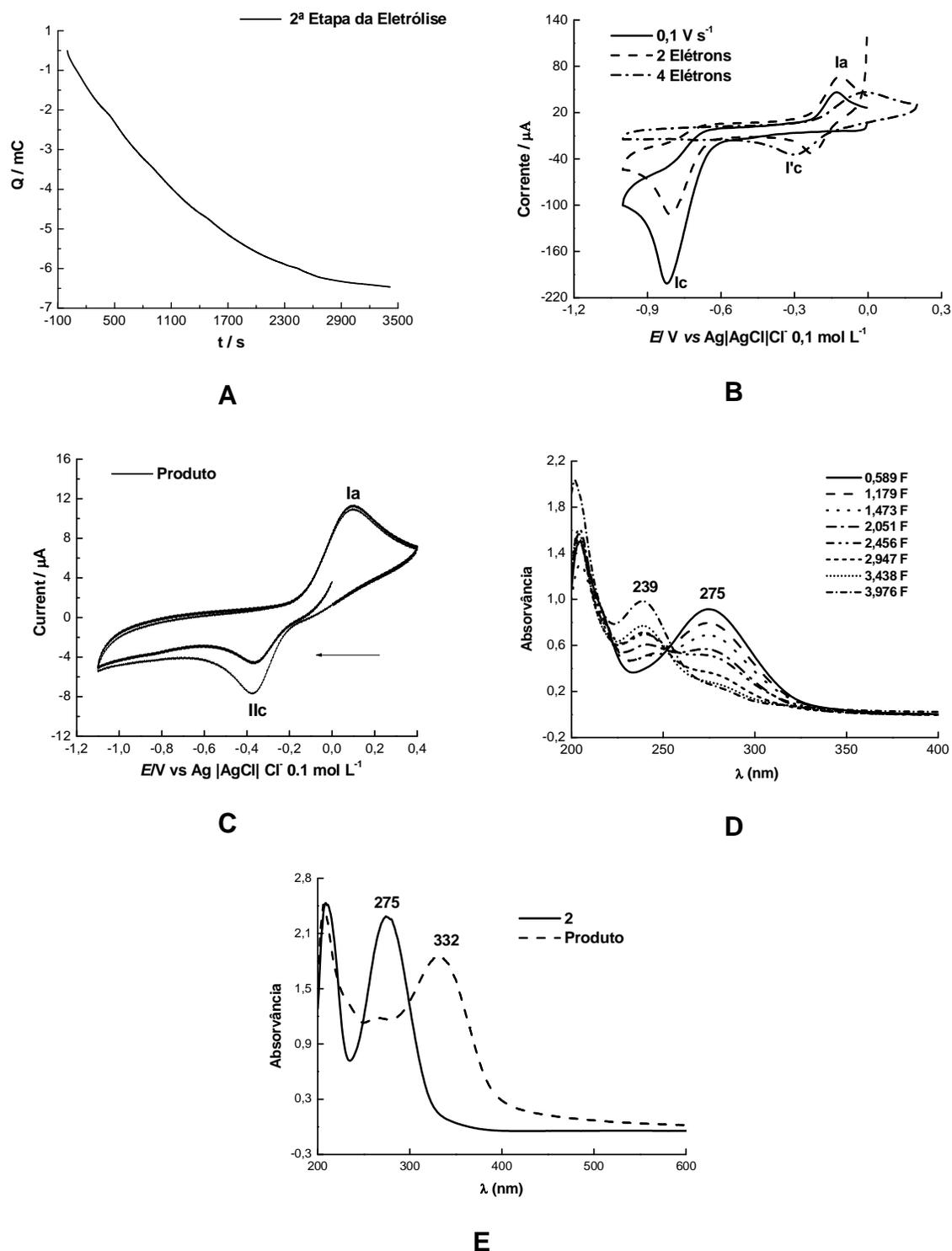


Figura 28. A: Eletrólise de **2** em $E_{ap} = -0,950$ V. B: Voltametria cíclica, antes e após a eletrólise, $v = 0,100$ V s⁻¹. C: Voltametria cíclica do produto de eletrólise, $v = 0,100$ V s⁻¹. D: Espectro no UV-Vis durante a eletrólise. E: espectro no UV-Vis, em EtOH + tampão fosfato (2:8), pH 6,9, do produto isolado.

Durante a eletrólise é possível observar, nos espectros no UV-Vis, um decréscimo gradativo da banda de absorção em 275 nm até completo desaparecimento, com concomitante aparecimento de uma nova banda em 239 nm (Figura 28D). Após isolamento do produto de eletrólise, através da evaporação do solvente, novos espectros no UV-Vis deste mostraram a presença de uma banda de absorção em 332 nm, enquanto os espectros de **2** nas mesmas condições, apresentam uma banda em 275 nm (Figura 28E). O deslocamento batocrômico fornece subsídios para sugerir redução do grupo nitro (eletroretirador) a hidroxilamínico (eletrodoador).

A estrutura do produto de eletrólise foi elucidada de acordo com os espectros de EM, RMN ^1H e RMN ^{13}C . A partir dos dados obtidos, principalmente através dos espectros de massa, a redução levou à formação do produto **3**. Desta forma, pode-se concluir que a hidroxilamina formada sofre reação química posterior, levando à formação de um dímero (**3**) (Figura 29).

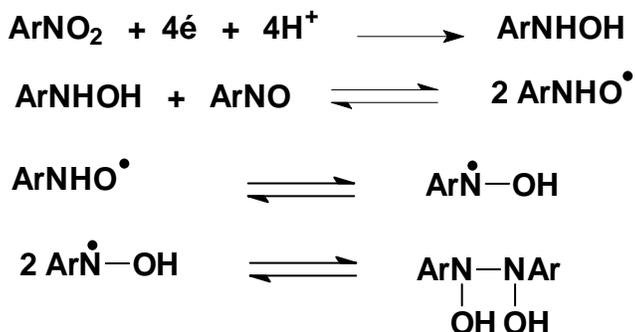
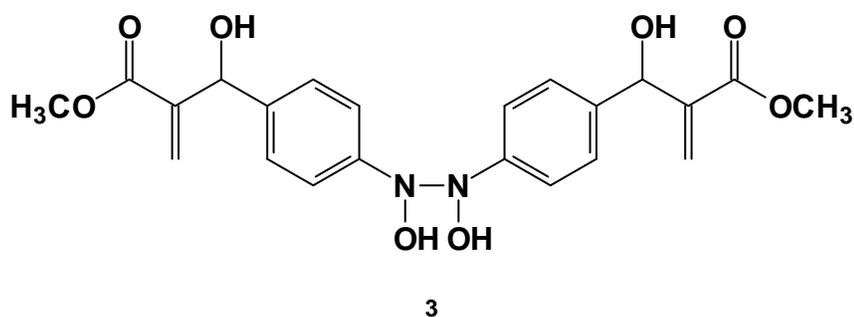


Figura 29. Provável mecanismo para formação do dímero, após redução do grupo nitro a hidroxilamina.

4.3. ESTUDO ELETROQUÍMICO DE **2** EM BIOSENSOR DE dsDNA

Como anteriormente abordado, um dos alvos biológicos mais relevantes para atuação de nitroaromáticos é o DNA. O biossensor de dsDNA é ferramenta valiosa na observação qualitativa da interação DNA/fármaco, com ou sem redução preliminar.

Um biossensor eletroquímico de dsDNA foi preparado e submetido a pré-tratamento, onde varreduras em voltametria de pulso diferencial foram realizadas na faixa de potencial de 0 a + 1,4 V, no intuito de assegurar as interações eletrostáticas entre as cargas negativas dos grupos fosfato ligados à desoxirribose e o eletrodo polarizado positivamente. O mesmo tratamento ao qual foi submetido o biossensor que foi utilizado para investigar possíveis interações entre o dsDNA e **2**, foi também submetido a outro biossensor de dsDNA, denominado de branco, com o objetivo de assegurar que quaisquer alterações observadas no espectro eletroquímico do biossensor em presença de **2** não fossem decorrentes de possível desnaturação da dupla hélice de DNA ou oxidação indesejada de suas bases constituintes.

Em tampão acetato, pH 4,5, o comportamento eletroquímico do biossensor de dsDNA não apresentou qualquer evidência de oxidação das bases (Figura 30), o que está relacionado ao fato das bases não estarem disponíveis para sofrerem oxidação, em consequência da existência de ligações de hidrogênio entre estas na dupla fita de DNA.

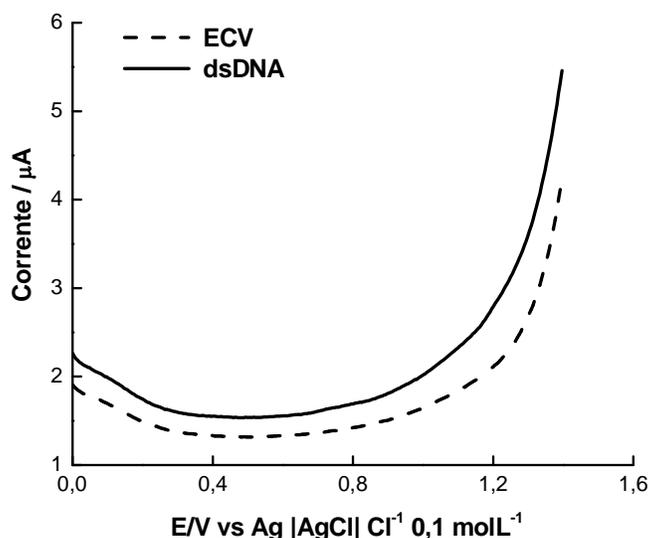


Figura 30. Voltamograma de pulso diferencial do eletrodo de carbono vítreo limpo e modificado com dsDNA, tampão acetato, pH 4,5, após ciclagem entre 0 e 1,4 V. $v = 0,005 \text{ V s}^{-1}$ e $a = 0,050 \text{ V}$.

Estudos eletroquímicos de **2** foram realizados em biossensor de dsDNA através de duas metodologias. Na primeira, foram adicionados $25 \mu\text{L}$ de uma solução de **2** ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), no biossensor de dsDNA, mantendo-se em contato durante 24 horas. Decorrido esse tempo, fez-se uma varredura anódica na faixa de 0 a + 1,4 V para verificar qualquer interação entre **2** e o dsDNA. De acordo com o observado na Figura 31A, não houve qualquer interação entre **2** e as bases do dsDNA durante esse período.

No segundo caso, realizado um estudo eletroquímico prévio de **2**, nas mesmas condições anteriores, que revelou um pico de redução em $-0,660 \text{ V}$, referente a formação da hidroxilamina, e ausência de onda de oxidação na faixa de potencial utilizada, efetuou-se uma pré-eletrólise em $-0,7 \text{ V}$ durante 120 segundos. Desta forma, o grupo nitro foi reduzido a hidroxilamina no próprio biossensor de dsDNA. Após esse tratamento, é observada em varredura realizada no sentido da oxidação, a presença de duas ondas de anódicas referentes à oxidação das nucleobases guanina e adenina (Figura 31B).

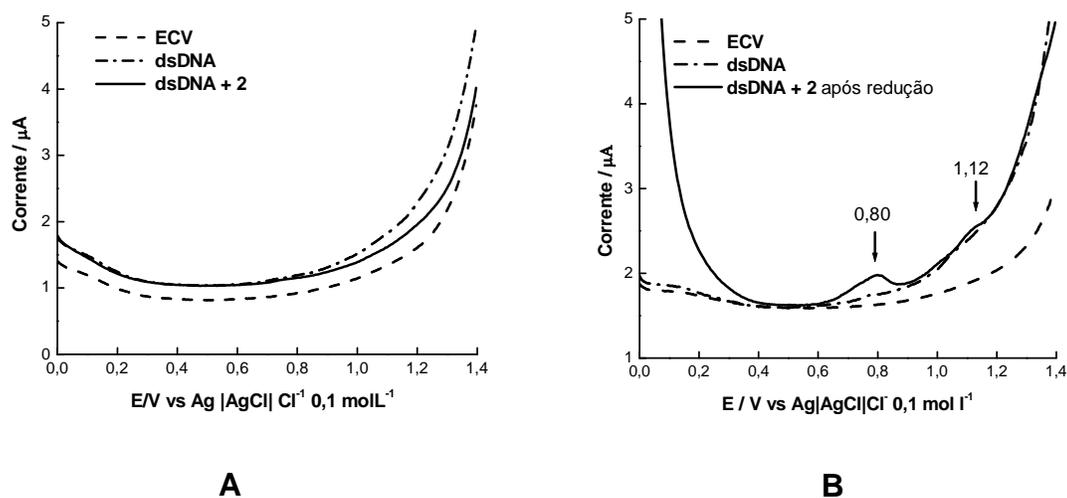


Figura 31. Voltamograma de pulso diferencial de 2 em um biossensor de dsDNA, tampão acetato, pH 4,5. A: Voltamograma obtido antes da redução. B: Voltamograma obtido após redução.

As duas ondas anódicas (+0,80 e +1,12 V) observadas no voltamograma de pulso diferencial (Figura 28B) são referentes à oxidação das nucleobases guanina e adenina, expostas e, portanto passíveis de sofrer oxidação após interação de **2** com a dupla fita de DNA (dsDNA), devido a quebra das ligações de hidrogênio entre as fitas da biomacromolécula [LA-SCALEA, 1998]. De acordo com os resultados obtidos, é possível concluir que **2** só interage com o dsDNA após formação de intermediários reativos, via eletrorredução *in situ* do grupo nitro. No entanto, estudos mais detalhados da interação de **2** com o biossensor de dsDNA ainda serão realizados no intuito de se obter um diagnóstico preciso das interações, caracterizando, se possível, o intermediário formado na redução do grupo nitro que é responsável pela lesão ao DNA.

4.4. COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DE **2** EM PRESENÇA DE GLUTATIONA

Os estudos ciclo-voltamétricos de **2** em meio aquoso alcalino demonstraram a presença de uma onda de redução monoeletrônica quase-reversível (Ic), referente ao ânion radical nitro, e uma segunda onda catódica irreversível (IIc), relacionada ao derivado hidroxílamínico, como já mencionado anteriormente. Estudos eletroquímicos de **2** em presença de glutathione evidenciaram claramente que o ânion radical nitro interage tanto com glutathione na sua forma reduzida quanto oxidada, envolvendo mecanismos diferentes.

Alguns estudos demonstraram a reatividade do produto de redução monoeletrônica a partir de nitrocompostos com glutathione. A estabilidade e reatividade do ânion radical em presença de endobióticos foram analisadas através das mudanças voltamétricas nas correntes de pico catódico e anódico [NÚÑEZ-VERGARA et al., 1996; NÚÑEZ-VERGARA et al., 1997]. A reatividade observada para glutathione frente ao ânion radical nitro é consequência das características ácidas do grupamento tiol e/ou amônio (amina protonada) da GSH, onde a forma não dissociada pode atuar como um doador de prótons, efeito favorável para que ocorram interações [NÚÑEZ-VERGARA et al., 1996].

4.4.1. MEIO FOSFATO

Em presença de glutathione reduzida, uma drástica mudança no mecanismo eletródico de **2** é observada. Estudos foram realizados em presença de dois co-solventes, etanol ou DMF, sendo observada similaridade nas feições voltamétricas. Após adição de GSH, tem-se um aumento na intensidade de corrente da primeira onda de redução (Ic), enquanto que um efeito contrário é observado para a onda anódica correspondente (Ia) (Figura 32A e B). Para o segundo processo de redução, a presença de glutathione promoveu o desaparecimento da onda IIc e o aparecimento de uma nova onda anódica

alargada (I'a) (Figura 32B), em valores de potencial mais positivos, sem correspondente catódica, em varredura sucessiva.

A adição de GSH promoveu variação do pH do meio, sendo observado que o mesmo variou cerca de uma unidade (de 8,77 para 7,85), após adição do endobiótico. Em presença de **2**, o pH do meio DMF/tampão fosfato, anteriormente pH 9,1, também sofreu variação, sendo observado um valor final de 8,77. Em excesso de GSSG, não foi verificado o pH final do meio.

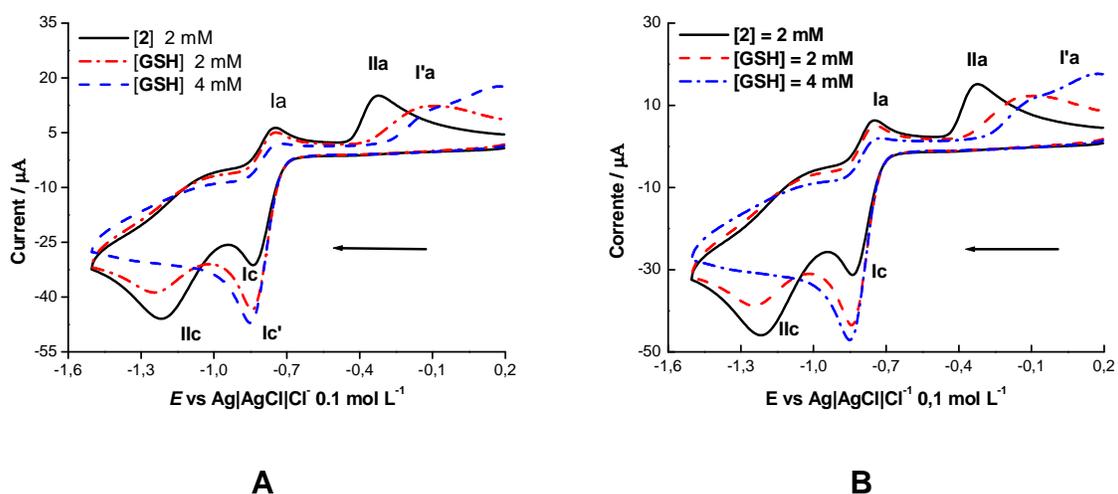


Figura 32. Voltametria cíclica de **2** em presença de GSH. A: meio prático (etanol + tampão fosfato + NaOH (1:9) $v = 0,035 \text{ V s}^{-1}$). B: meio prático (DMF/tampão fosfato + NaOH (1:9), $v = 0,035 \text{ V s}^{-1}$).

Em varreduras sucessivas, o voltamograma obtido em presença de GSH revela a ausência de sistema quase reversível referente ao par nitroso/hidroxilamina observado na ausência do endobiótico (Figura 33).

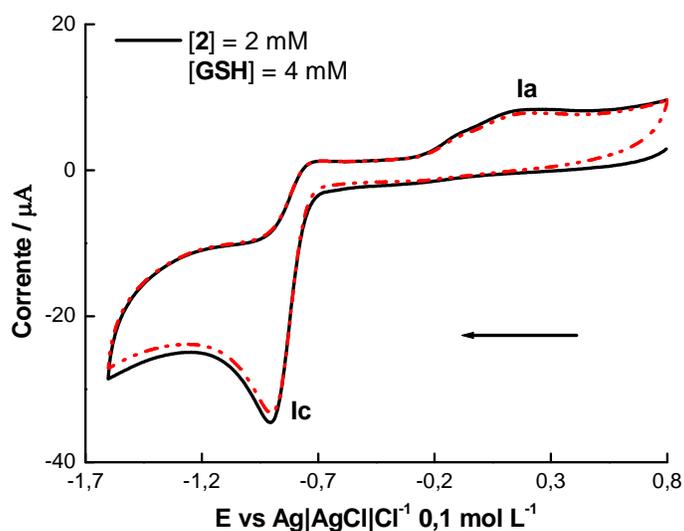
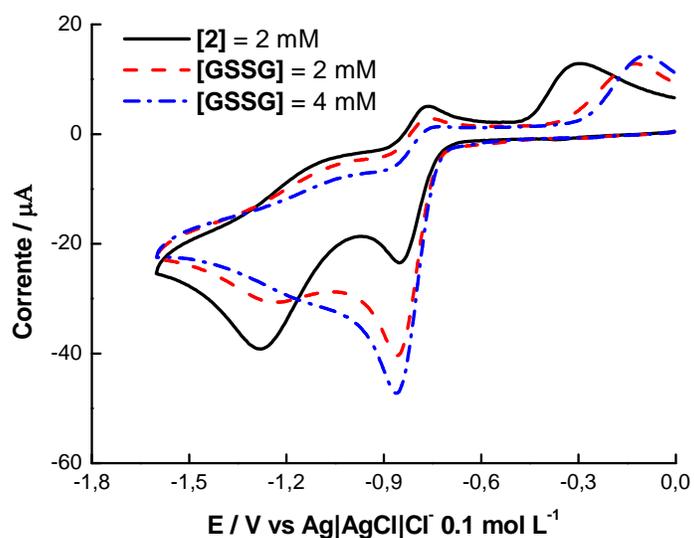
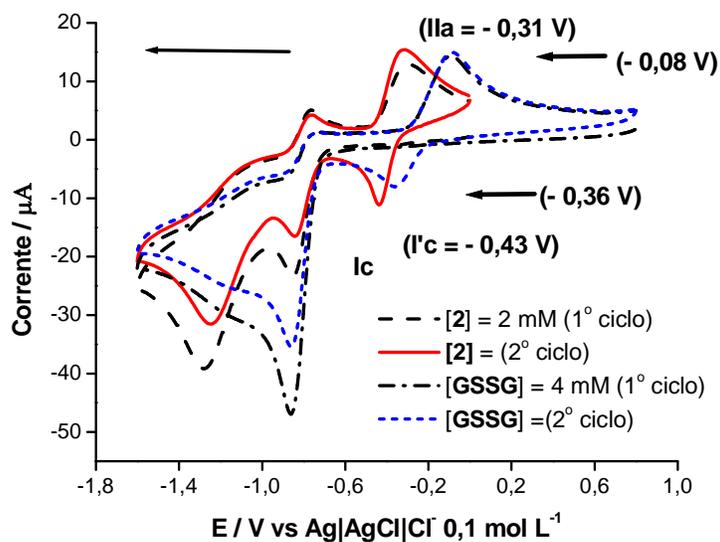


Figura 33. Voltamogramas Cíclicos da redução de **2** em presença de GSH, varreduras sucessivas, meio prótico (DMF + tampão fosfato+NaOH (1:9). Eletrodo de carbono vítreo, $\nu = 0,035 \text{ V s}^{-1}$.

Os estudos realizados em presença de glutathiona oxidada (GSSG) (Figura 34A) demonstram um efeito aparentemente similar ao observado para GSH, havendo um efeito bem mais acentuado no aumento da intensidade de corrente para a onda Ic, (105%) bem como perda da reversibilidade do processo. A segunda onda catódica (I_{IIc}) desaparece, assim como em presença de GSH, porém o sistema quase-reversível I_{IIa}/I'_{IIc} se mantém e sofre apenas deslocamento de potencial (240 mV) e pequeno decréscimo em corrente (Figura 34B).



A



B

Figura 34. Voltamogramas cíclicos de **2** em meio prótico (etanol + tampão fosfato + NaOH (1:9) em presença de GSSG. Eletrodo de carbono vítreo. A: $v = 0,035 \text{ V s}^{-1}$. B: Varreduras sucessivas, $v = 0,035 \text{ V s}^{-1}$.

Em tampão fosfato, devido às funções ácidas da glutathiona [pka (GSH)= 3,59 (-COOH), 8,75 (-SH) e 9,6 (-NH₃⁺)] [ISON et al., 2006], o efeito tamponante não funcionou eficientemente. Houve variação de uma unidade de pH. Este efeito sugere que, nesse meio, o ânion radical nitro sofre protonação. Assim o aumento observado na corrente da onda Ic se deve à protonação e à formação do derivado nitroso, numa reação que envolve 2 e⁻ e 2H⁺.

O efeito observado para o segundo processo de redução, ausente no voltamograma quando em presença de glutathiona, sugere a reatividade do tiol com produtos de redução posterior, levando provavelmente a adutos com GSH (Figura 35). Essa consideração é reforçada pelo voltamograma em varreduras sucessivas (Figura 33), onde o sistema nitroso/hidroxilamina é afetado drasticamente, em presença de GSH.

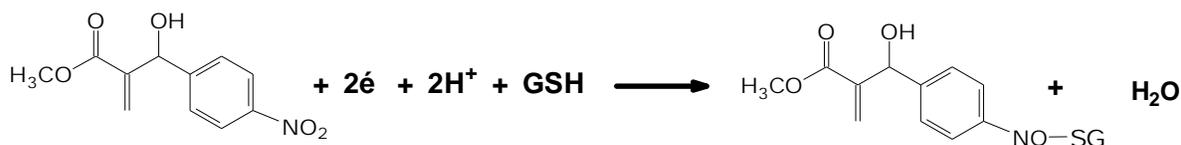


Figura 35. Provável mecanismo para a formação de adutos com GSH em sua forma protonada após redução do grupo nitro em meio fosfato.

Já em presença de GSSG, que também ocasiona a variação do pH do meio, em cerca de uma unidade, a mudança no espectro eletroquímico provavelmente está relacionada apenas ao efeito de protonação, já que na forma oxidada, a molécula apresenta seis fontes de prótons. Essa observação está de acordo com o comportamento observado para **2**, em presença do dissulfeto, onde a onda Ic sofre aumento mais significativo que no caso anterior, pouco mais que o dobro, com provável geração da hidroxilamina, que mais estável, devido à associação, via ligação de hidrogênio, com GSSG, sofre oxidação em potenciais mais positivos. Em varredura sucessiva, é possível observar o sistema nitroso/hidroxilamina quase-reversível, deslocado em cerca de 240 mV (Figura 34B).

4.4.2. MEIO BICARBONATO

A redução de **2**, em tampão fosfato tanto quanto em tampão bicarbonato apresentou comportamento semelhante, no entanto, os estudos realizados em presença das glutations reduzida e oxidada, nesses meios, demonstraram um mecanismo eletródico totalmente diferente. Em presença de GSH, uma mudança acentuada no voltamograma cíclico de **2** (Figura 36A) é observada apenas para processo referente à formação da hidroxilamina, onde a onda IIc desaparece por completo. Contudo, o sistema ânion radical nitro, praticamente, não é afetado, havendo apenas um leve decréscimo de potencial da onda Ic, e aumento da reversibilidade, pois nenhuma mudança significativa da onda anódica (Ia) é observada. Por outro lado, os estudos em presença de GSSG (Figura 36B) revelaram apenas um discreto decréscimo da onda IIc, em relação ao efeito provocado por GSH. A onda Ila se mantém em presença de GSSG (Fig. 36B), enquanto tende ao desaparecimento em presença de GSH (Fig. 36A).

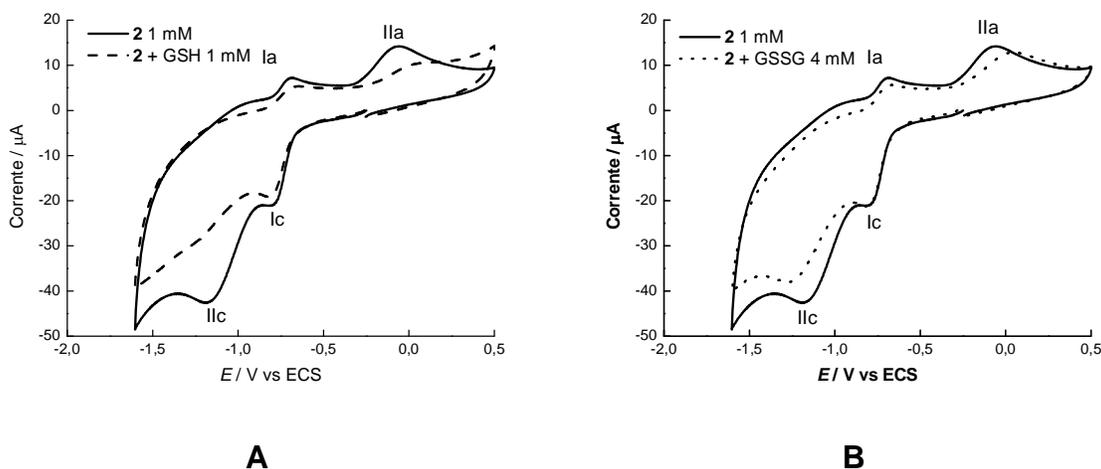


Figura 36. Voltamograma cíclico de **2** em meio prótico (etanol/bicarbonato + NaOH (2:8) pH 9,6). Eletrodo de carbono vítreo. A: em presença de GSH. B: em presença de GSSG, $\nu = 0,100 \text{ V s}^{-1}$.

Não foi observada variação do pH após adição das glutations, indicando então que as mesmas se encontram praticamente dissociadas nesse meio. O decréscimo na intensidade de corrente da onda catódica Ic, observado em

presença de GSH (Figura 36A), sugere que, a forma dissociada do tiol, o ânion GS^- , promove, em pequena extensão, a redução do grupo nitro, tendo como consequência, uma diminuição na corrente da onda. Entretanto, em potenciais mais negativos, o desaparecimento da onda de redução (Ic) (Figura 36A), é resultado de prováveis reações dos novos intermediários gerados com GS^- , formando adutos, provavelmente, RNO-tiolatos, de acordo com a figura 37. Esse comportamento é reforçado pelo efeito observado na onda anódica IIa, onde o sistema RNHOH/RNO é, significativamente, afetado por GSH.

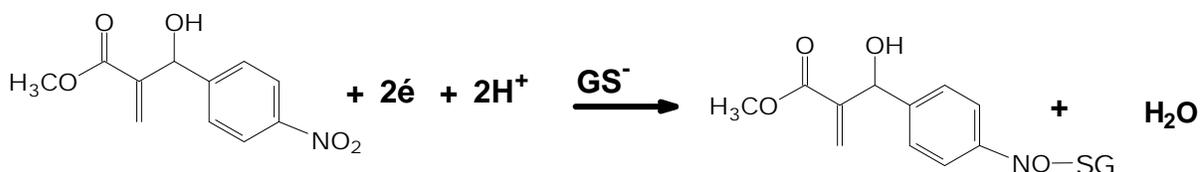


Figura 37. Formação de adutos com GSH/ GS^- após redução do grupo nitro [JULIÃO et al., 2006].

4.4.3. ELETRÓLISE EM PRESENÇA DE GSH

Eletrólise em potencial controlado, em meio fosfato, foi realizada em presença de GSH e, seguida por métodos eletroquímicos e espectrofotométricos. A eletrólise foi realizada em $E_{\text{ap}} -0,950 \text{ V}$, registrando-se o número de coulombs envolvidos, o valor da corrente residual e o tempo do processo.

O processo ocorreu sem que o substrato fosse totalmente convertido em produto, envolvendo o consumo de 2,3 elétrons/mol (Figura 38A). De acordo com o voltamograma de **2**, após eletrólise, a formação do derivado nitroso, modificado por GSH foi reforçada. O grupo nitro não foi completamente reduzido, sendo ainda observado o processo referente à formação do intermediário estável ânion radical nitro no voltamograma obtido após eletrólise (Figura 38A), embora haja uma drástica diminuição na intensidade de corrente relacionada a esse processo.

Após a eletrólise, o voltamograma cíclico evidenciou a presença de uma nova onda catódica (I''c) em potencial próximo ao observado para a redução do

nitroso (I'c) em varreduras sucessivas, o que sugere a formação deste derivado ou do aduto RNO-tiolato.

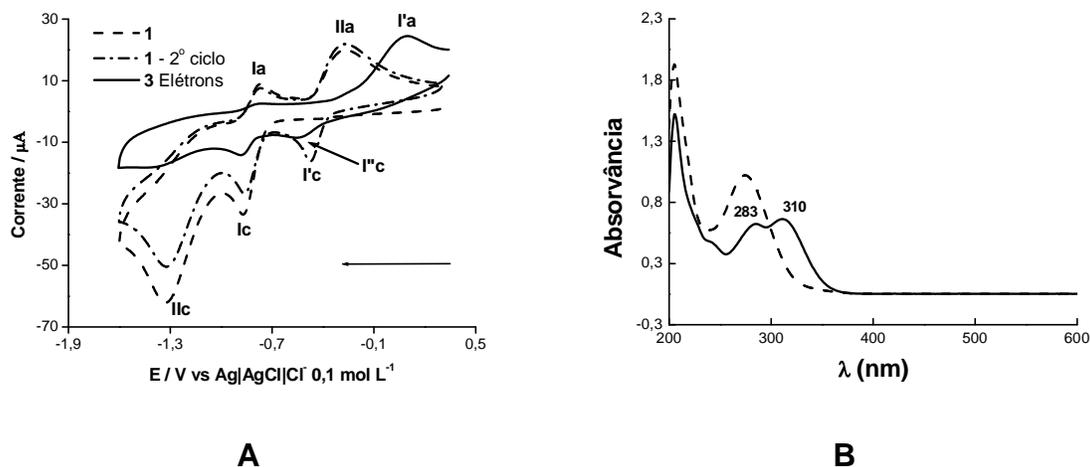


Figura 38. Voltametria cíclica de **2**, A: antes (----) e após (___) eletrólise realizada em tampão fosfato + NaOH, em presença de GSH. B: Espectro no UV-Vis do produto final de eletrólise (mistura de **2** + derivado nitroso).

Apesar de haver um deslocamento de potencial para valores mais positivos, o pico anódico referente à oxidação da hidroxilamina (IIa) se mantém no voltamograma. Além da mudança no voltamograma de **2**, após eletrólise (Figura 38A), uma acentuada alteração no espectro no UV-Vis também é evidenciada (Figura 38B), sugerindo a presença de novo(s) produto(s). Não foi possível o isolamento do produto de redução, até o presente momento, devido, principalmente, à alta polaridade do mesmo.

4.4.4. COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DE **2** EM PRESENÇA DE O_2

A atividade biológica de nitrocompostos, como já abordado, é dependente da redução do grupo nitro. Estudos têm relatado que uma das mais importantes reações *in vivo* para essa atividade é a ciclagem redox com oxigênio, onde o

ânion radical nitro é regenerado, enquanto que espécies reativas de oxigênio são formadas, sendo estas responsáveis pelo dano bioquímico ao DNA ou outros endobióticos (Figura 1) [ARGÜELLO et al., 2006; MAYA et al., 2003].

Nesse sentido, estudos foram realizados em presença de oxigênio para averiguar se o intermediário radicalar, ânion radical nitro, formado a partir da redução de **2** é capaz de ciclagem redox. De acordo com os resultados obtidos (Figura 39), a adição de oxigênio não afeta o processo de redução do nitroaromático.

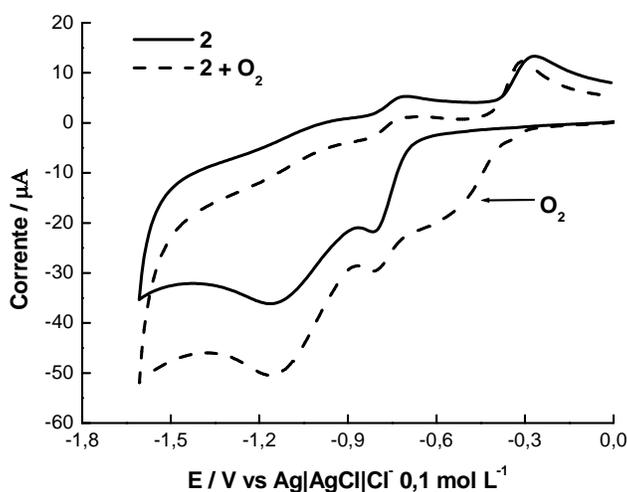


Figura 39. Voltamograma cíclico de **2** (1 mmol L^{-1}), em solução saturada com oxigênio, EtOH + tampão fosfato + NaOH (1:9), pH 9,4, $v = 0,035 \text{ V s}^{-1}$.

Os resultados revelam ausência de reação com oxigênio, indicando que **2** não atua como ciclador redox. Desta forma, a atividade anticancerígena pode ser atribuída à biorredução, tendo como resultado a redução nos níveis de glutathione intracelular.

4.4.5. ESTUDO DA REATIVIDADE QUÍMICA DE **2** COM GLUTATIONA

Compostos carbonílicos α,β -insaturados são aceptores de Michael, capazes de adições conjugadas com nucleófilos biológicos. Desta forma, estudos espectroscópicos foram realizados para investigar a reatividade química da ligação acrilato com GSH.

Em meio fosfato, pH 9,4, o espectro no UV-Vis de **2** é caracterizado por duas bandas de absorção. A primeira destas, em 220 nm refere-se à ligação acrilato, no sistema cetona α,β -insaturada, enquanto que o grupo nitro absorve em 275 nm (Figura 40A). No entanto, os espectros referentes a GSH sugerem certa instabilidade para o tiol durante o período de análise, sendo observado, após duas horas, o surgimento de uma banda em 304 nm durante os estudos (Figura 40B), provavelmente devido à oxidação por oxigênio.

Uma solução contendo **2** e GSH (1:1) foi monitorada durante um período de 4 horas, buscando-se observar qualquer mudança nos espectros que sugerissem prováveis interações químicas entre **2** e o tiol. Durante esse período, as mudanças observadas nos espectros são as mesmas evidenciadas para os compostos isoladamente.

A Figura 40 C, referente a este ensaio, mostra uma diminuição na banda de absorção em 220 nm, porém, a banda referente a GSH em 304 nm não é observada. Desta forma, pode-se sugerir que não houve reação química entre **2** e GSH nessas condições, havendo necessidade de redução anterior do grupo nitro.

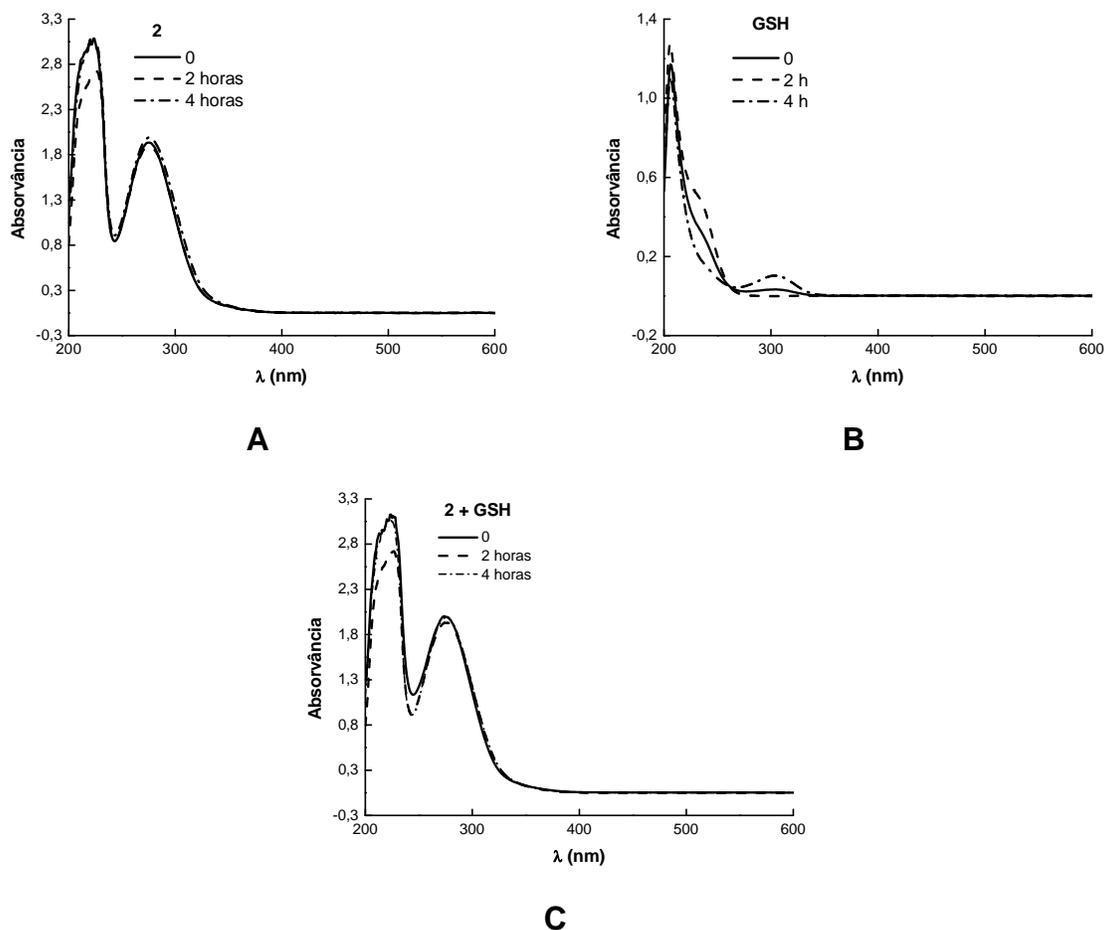


Figura 40. Espectros no UV-Vis em tampão fosfato (etanol/tampão fosfato + NaOH (1:9), pH aparente 9,4. A: espectro de 2 (1×10^{-4} mol L $^{-1}$). B: espectro para GSH (1×10^{-4} x 10^{-1}). C: espectro de 2 + GSH na razão de 1:1.

4.5. ESTUDOS DA ESTABILIDADE DO ÂNION RADICAL NITRO

O produto da redução monoelétrica do grupo nitro aromático pode sofrer reações químicas posteriores a sua formação, como já descrito na literatura [CARBAJO et al., 2000; CARBAJO et al.; 2002; ARGÜELLO et al.; 2006]. A presença de reações químicas acopladas ao processo de transferência de elétrons, como desproporcionamento (etapa 2), dimerização (etapa 3) (Figura 41) são relatadas frequentemente.

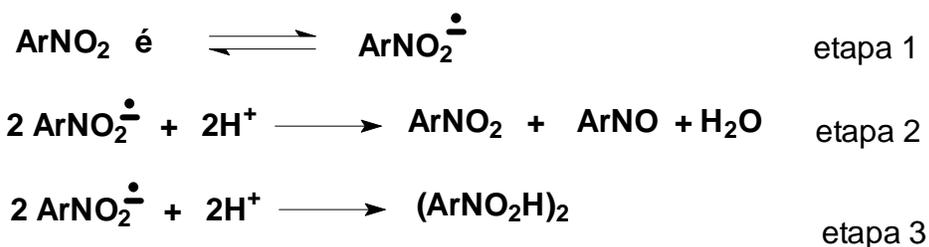


Figura 41. Mecanismo proposto para o decaimento do ânion radical nitro.

A formação do intermediário radicalar estável, ânion radical nitro, foi observada nos estudos eletroquímicos realizados em meio aprótico e meio prótico alcalino. Assim, a estabilidade desse intermediário foi investigada nesses meios. De acordo com os voltamogramas cíclicos representados através das correntes de pico normalizadas em função da raiz quadrada da velocidade de varredura e da razão i_{pa}/i_{pc} , uma maior estabilidade do ânion radical nitro é observada tanto em meio aprótico (DMF/TBAP) (Figura 42), quanto em meio aquoso alcalino (PBS+NaOH) (Figura 43).

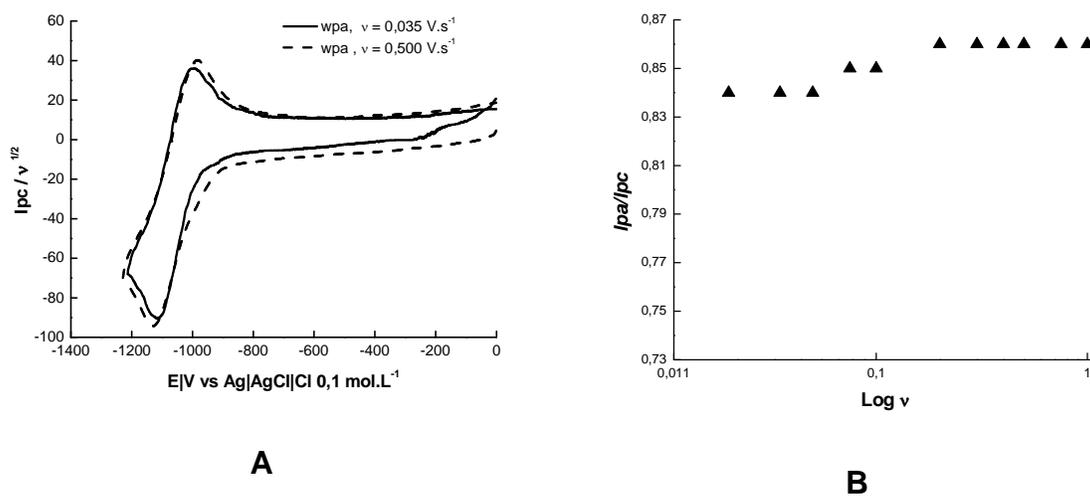


Figura 42. Corrente de pico normalizada obtida para meio aprótico (DMF + TBAP 0,1 mol L⁻¹). B: Dependência da razão i_{pa}/i_{pc} em relação à velocidade de varredura.

Para o meio fosfato, além da evidência obtida através da corrente de pico normalizada, onde as correntes de pico catódico são coincidentes, a razão I_{pa}/I_{pc} mostra que a reversibilidade do sistema apresenta menor dependência com a velocidade de varredura. Assim, o gráfico de I_{pa}/I_{pa} vs $\log v$ (Figura 43B) permanece linear a uma determinada velocidade de varredura e constante a partir de $0,300 \text{ V s}^{-1}$, confirmando que o ânion radical é estável, não havendo efeito pronunciado de reações químicas acopladas ao processo eletrodico.

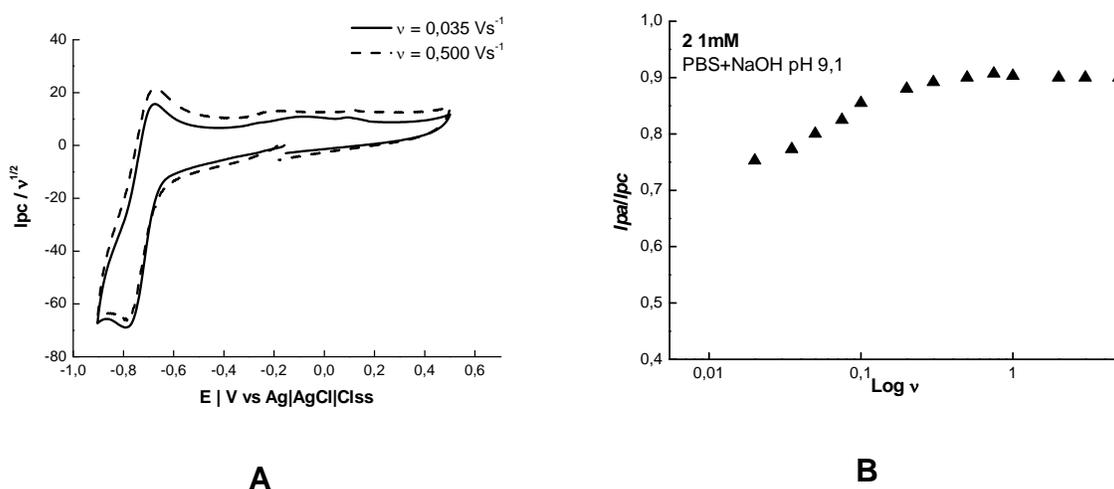


Figura 43. A: Corrente de pico normalizada obtida em meio misto (DMF/tampão PBS + NaOH (1:9), pH 9,1). B: Dependência da razão I_{pa}/I_{pc} sobre a velocidade de varredura.

Para o meio bicarbonato, a corrente de pico normalizada demonstra que processo de transferência de elétrons referente à formação do ânion radical nitro apresenta menor reversibilidade em baixas velocidades de varredura (Figura 44A), assim como uma maior dependência em relação à velocidade de varredura para a razão I_{pa}/I_{pc} (Figura 44B) é observada. Desta forma, pode-se concluir a partir desses resultados que o ânion radical é menos estável nesse meio, e, portanto, o efeito de reações químicas acopladas ao processo de transferência de elétrons é mais pronunciado.

De posse da evidência de reações químicas acopladas à transferência de elétrons (EC), como a dependência da razão I_{pa}/I_{pc} em função da velocidade de

varredura, estudos foram realizados para determinar a ordem de reação. De acordo com a dependência obtida entre a razão i_{pa}/i_{pc} e a concentração do nitrocomposto (Figura 45) pode-se afirmar que a ordem da reação é maior que 1.

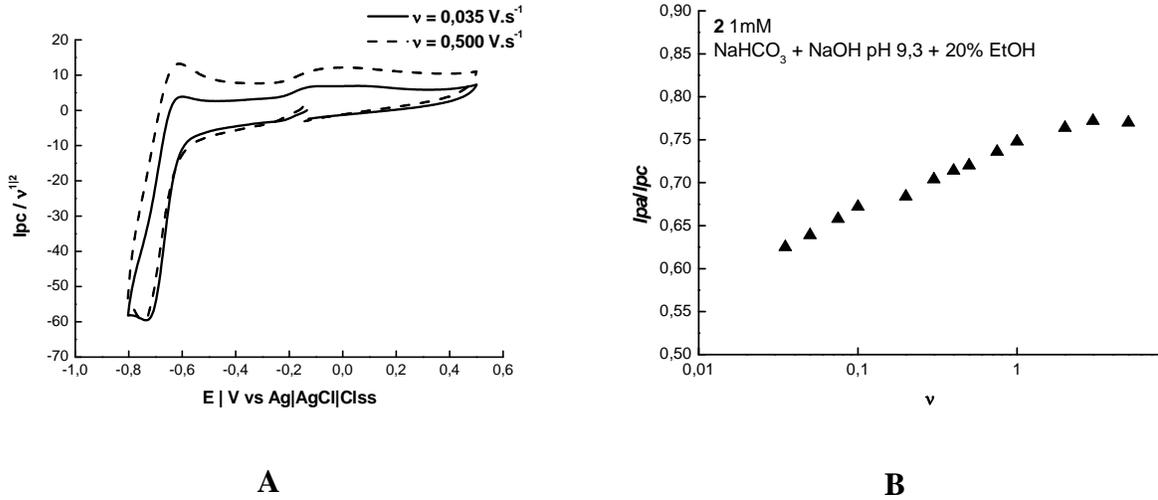


Figura 44. A: Corrente de pico normalizado obtida em meio misto [Etanol + bicarbonato + NaOH (2:8)], pH 9,6. B: Dependência da razão i_{pa}/i_{pc} em relação à velocidade de varredura.

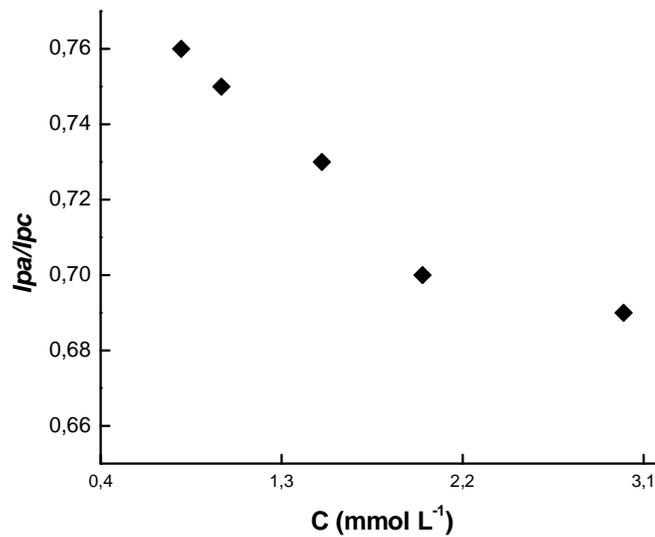


Figura 45. Dependência entre a razão i_{pa}/i_{pc} e a concentração do nitrocomposto.

Através dos estudos teóricos realizados por Olmstead e colaboradores (Olmstead et al., 1969), para desproporcionamento ou dimerização, a constante da reação química de segunda ordem foi calculada (k_2).

Os valores de $|pa|/pc$ obtidos experimentalmente para cada velocidade de varredura, foram inseridos em uma curva de trabalho (Figura 46) para determinar o parâmetro ω , que incorpora os efeitos da constante reacional, concentração e velocidade de varredura. A partir desse parâmetro, a constante para reação química de segunda ordem pode ser obtida através da curva ω vs τ , que resulta numa relação linear descrita pela equação 4:

$$\omega = k_2 C_0 \tau \quad (4)$$

onde k_2 é a constante para reação de segunda ordem, C_0 é a concentração inicial do nitrocomposto e $\tau = (E_\lambda - Ep_{1/2})/v$.

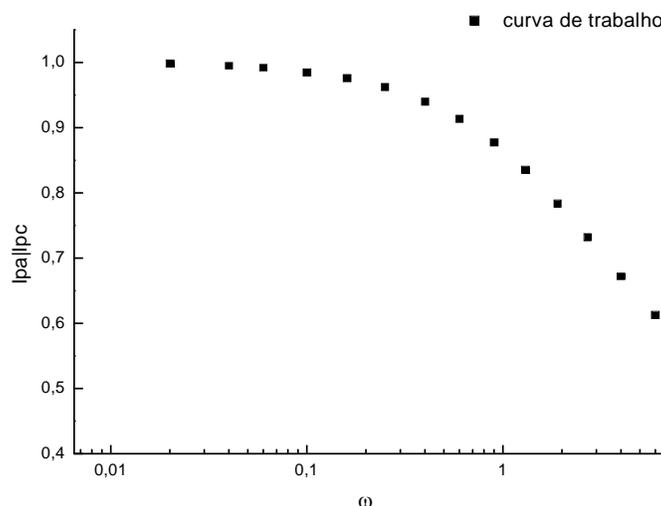


Figura 46. Curva teórica, para reações de desproporcionamento, para determinar o parâmetro ω .

O valor da constante de decaimento do ânion radical nitro, K_2 , em meio fosfato, foi obtido a partir do coeficiente angular do gráfico da Figura 47, sendo igual a $k_2 = 304 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

A estabilidade do ânion radical pôde ser obtida através do cálculo de meia vida: $t_{1/2} = 1/k.C_0$, sendo de 3,28 s.

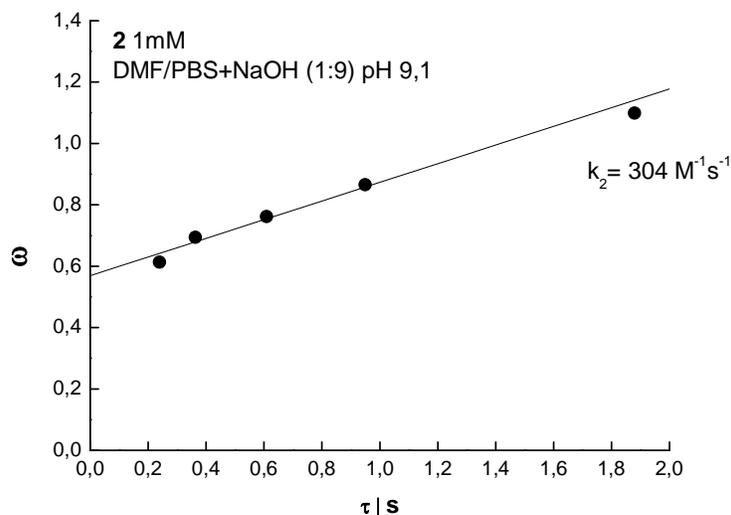


Figura 47. Curva ω vs τ , para meio fosfato (DMF + PBS + NaOH (1:9) pH 9,1).

Já em meio bicarbonato, a menor estabilidade do ânion radical nitro foi confirmada a partir dos valores da constante da reação de segunda ordem e tempo de meia vida: $k_2 = 2674 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $t_{1/2} = 0,37\text{s}$ (Figura 48). O ânion radical formado em meio bicarbonato pode sofrer, após a transferência de elétrons, reações de desproporcionamento, conforme já descrito para nitroaromáticos em meio alcalino [ARGÜELLO et al., 2006], ou dimerização, considerado que um dímero foi isolado a partir da redução de **2**.

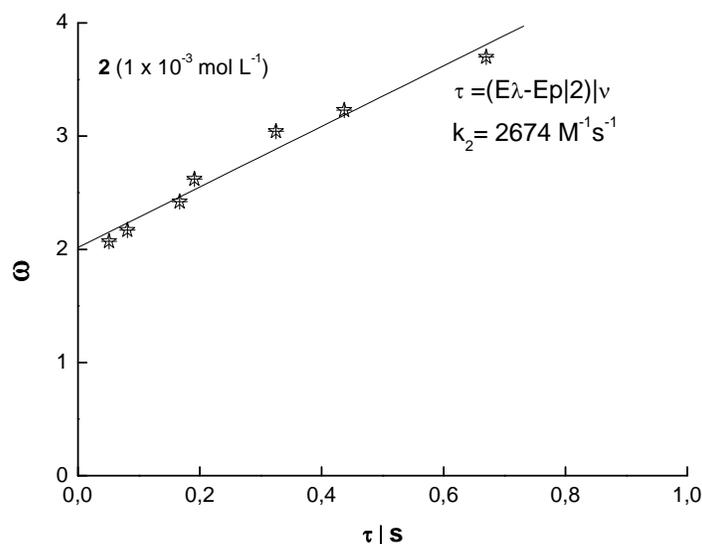


Figura 48. Curva ω vs τ , para meio fosfato (Etanol/ NaHCO_3 + NaOH (2:8) pH 9,3).

Em meio fosfato, o ânion radical nitro, que se apresentou apreciavelmente estável, foi bastante afetado por GSH. É possível observar na corrente normalizada de pico, que a onda catódica sofre um aumento acentuado na intensidade de corrente e há perda da reversibilidade do sistema (Figura 49). Este efeito confirma a atuação da glutathione como um doador de prótons nesse meio, favorecendo então a formação do derivado nitroso. A hidroxilamina, diferentemente ao observado em meio ácido ou neutro, só é formada em potenciais mais negativos, correspondentes ao segundo processo catódico (IIc).

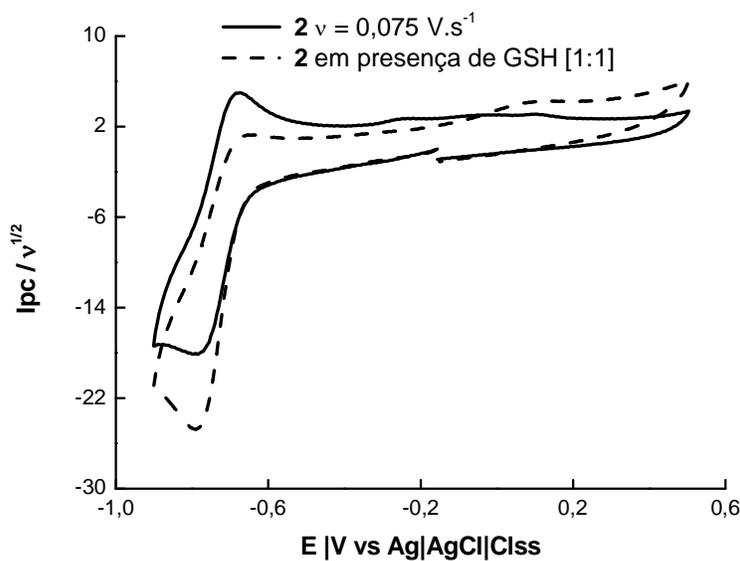


Figura 49. Corrente de pico normalizado obtida para **2** em presença e ausência de GSH, meio misto (DMF + tampão PBS + NaOH (1:9), pH 9,1).

Em meio bicarbonato, obteve-se um efeito bastante diferente, sendo observada a diminuição da onda catódica, embora a onda anódica não tenha diminuído na mesma proporção (Figura 50). Este resultado corrobora o efeito já mencionado para o ânion GS^- , que pode atuar como um doador de elétrons, reduzindo o grupo nitro homogeneamente, resultando na diminuição do mesmo, na superfície eletródica, com conseqüente decréscimo da onda catódica, enquanto que o processo anódico não é afetado, favorecendo o aumento da reversibilidade do sistema. O aumento na reversibilidade desse processo após adição de glutatona é confirmado pela razão I_{pa}/I_{pc} vs v (Figura 51).

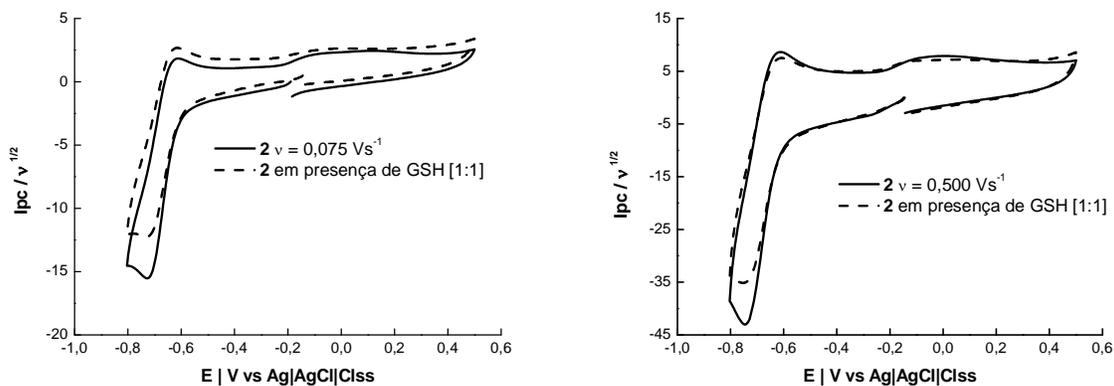


Figura 50. Correntes de pico normalizado obtida em meio misto (etanol/bicarbonato + NaOH (2:8), pH 9,6).

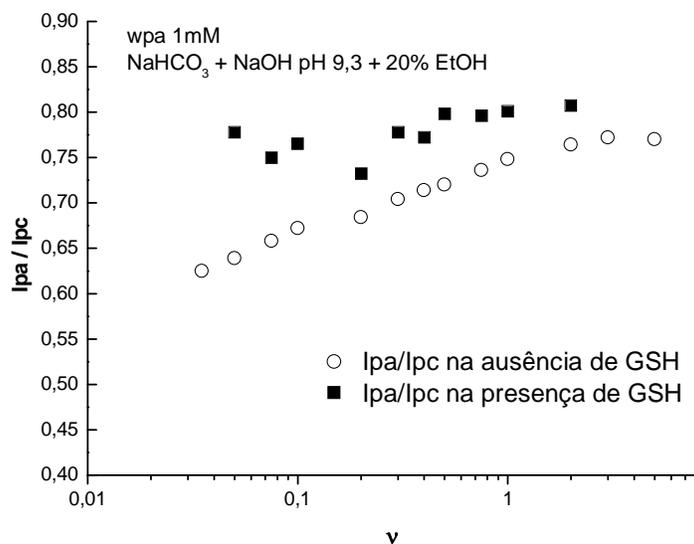


Figura 51. Dependência da razão I_{pa}/I_{pc} sobre a velocidade de varredura.

Desta forma, a estabilidade do ânion radical nitro em meio fosfato mostra-se comparável àquela em meio aprótico, em consequência da baixa atividade de prótons. Essa consideração foi reforçada pelo menor valor obtido para a constante cinética de decaimento do ânion radical nitro, bem como o tempo de meia vida. Por outro lado, a adição de GSH provoca uma brusca mudança no espectro

eletroquímico, resultando na perda de reversibilidade do processo devido a reações químicas acopladas ao processo de transferência de elétrons.

Para o meio bicarbonato, o ânion radical nitro mostrou-se menos estável, apresentando valor significativo para a constante de decaimento do mesmo. GSH não provocou o mesmo efeito que o observado em fosfato, sendo verificado um aumento da reversibilidade do processo referente à formação do ânion radical nitro.

5. CONCLUSÕES

Os estudos revelaram que o mecanismo de redução de **2** em meio aprótico é típico de composto nitroaromático, no que se refere ao primeiro processo de transferência de elétrons, onde se observa a formação de intermediário radicalar estável, com exceção para a hidroxilamina, que se mostrou instável e, portanto, provavelmente suscetível a reações químicas posteriores.

Em meio aprótico, por analogia ao seu precursor não nitrado **1**, é possível observar um processo catódico adicional, em potencial mais negativo, relativo à redução do grupo acrilato, cetona α,β -insaturada, grupo eletroativo comum aos dois compostos.

Em meio aprótico e meio prótico alcalino, o ânion radical nitro formado apresentou-se relativamente estável. De acordo com os valores calculados para a constante de decaimento do ânion radical, foi confirmado a presença de reações químicas acopladas ao processo de transferência de elétrons. Em meio bicarbonato foi observada uma menor estabilidade do intermediário radicalar, refletida no valor da constante de decaimento do ânion radical.

Eletrólise em potencial controlado, em meio neutro, levou a formação de um dímero após redução da hidroxilamina.

Estudos eletroquímicos também permitiram avaliar possíveis interações do ânion radical nitro com importantes alvos biológicos, como GSH e DNA através das mudanças nos perfis voltamétricos referentes à redução e/ou oxidação de **2** para os estudos em presença de GSH, bem como o surgimento de picos de oxidação das bases de DNA após redução do grupo nitro.

Os resultados obtidos em biossensor de dsDNA, sugerem que um dos alvos para ação biológica de **2** é o DNA. Depois de incubado no biossensor de dsDNA, foi possível observar picos referentes à oxidação das bases guanina e adenina, apenas, após redução do grupo nitro no gel de dsDNA. Desta forma, pode-se concluir que o dano celular é uma consequência da formação de intermediários danosos ao DNA, após redução do grupo nitro.

Em presença de GSH, foi observado que em meio fosfato, devido a efeitos de protonação, a formação de derivado RNO-tiol é favorecida. Por outro lado, nesse mesmo meio, a adição de GSSG, importante fonte de prótons, favorece apenas a formação da hidroxilamina, sem ataque nucleofílico.

Em meio bicarbonato, devido à maior eficiência tamponante, prevalece à forma desprotonada do tiol. Dessa forma, as interações foram observadas apenas após redução posterior ao ânion radical nitro.

Em presença de oxigênio, foi observado ausência de interação, o que indica que o mecanismo de ação biológica de **2** provavelmente não envolve ciclagem redox. Assim, a atividade anticancerígena pode estar relacionada à biorredução, em condições de hipóxia ou não, com conseqüente redução nos níveis de glutathiona após redução do grupo nitro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARGÜELLO, J.; NÚÑEZ-VERGARA, L. J.; BOLLO, S.; SQUELLA, J. A.; *Bioelectrochem.* **2006**, 69, 104.

BARETY, D.; RESIBOIS, B.; VERGOTEN, G.; MOSCHETTO, Y.; *J. Electroanal. Chem.* **1984**, 162, 335.

BÉRUBÉ, L. R.; FARAH, S.; MCCLELLAND, R. A.; RAUTH, A. M. *Biochem. Pharmacol.* **1991**, 42, 2153.

BOLLO, S.; GUNCKEL, NÚÑEZ-VERGARA, S.; L. J.; CHAUVIERE, G.; SQUELLA, J. A.; *Electroanal.* **2005**, 17, 134.

BRETT, A. M. O.; CHIORCEA, A. M.; *Electrochem. Commun.* **2003**, 5, 178.

BRETT, A. M. O.; VIVAN, M.; FERNANDES, I. R.; PIEDADE, J. A. P.; *Talanta* **2002**, 56, 959.

BREZDEN, C. B.; MCCLELLAND, R. A.; RAUTH, A. M. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, 48, 361.

BUETTNER, G. R.; *Arch. of Biochem. and Bioph.* **1993**, 300, 535.

SIES, H.; *F. Rad. Biol. Med.* **1999**, 27, 916.

CARBAJO, J.; BOLLO, S.; NÚÑEZ-VERGARA, L. J.; CAMPERO, A.; SQUELLA, J. A.; *J. Electroanal. Chem.* **2000**, 494, 69.

CARBAJO, J.; BOLLO, S.; NÚÑEZ-VERGARA, L. J.; CAMPERO, A.; SQUELLA, J. A.; *J. Electroanal. Chem.* **2002**, 531, 187.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHER, P.; *Organic Chemistry*. By Oxford University Press Inc.; New York. **2005**, p. 584, 1124.

COELHO, F.; ALMEIDA, W. P.; *Quím. Nova* **2000**, 23, 98.

DE ABREU, F. C.; FERRAZ, P. A. L.; GOULART, M. O. F.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, 13, 19.

DICULESCU, V. C.; PAQUIM, A. M. C.; BRETT, A. M. O.; *Sensors* **2005**, 5, 377.

EVERETT, S. A.; NAYLOR, M. A.; PATEL, K. B.; STRATFORD, R. L.; WARDMAN, P.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 1267.

FERNÁNDEZ-CHECA, J. C.; *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2003**, 304, 471.

GOULART, M. O. F. G.; SANT'ANA, A. E. G.; ROCHA, E. M. M.; FONTES, G.; *Electroanalytical Aspects of Biological Significance Compounds* **2006**, 2. p. 1 - 32.

GRIFFITH, O. W.; MEISTER, A.; *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 7558.

GRIFFITH, O. W.; *Free Rad. Biol. Med.* **1999**, 27, 922.

HADDAD, J. J.; HARB, H. L.; *Mol. Immun.* **2005**, 42, 987.

HEIMBROOK, D. C.; SHYAM, K.; SARTORELLI, A. C.; *Anti-Canc. Drug Des.* **1988**, 2, 339.

HELI, H.; BATHAIE, S. Z.; MOUSAVI, M.F.; *Electrochim. Acta* **2005**, 51, 1108.

ISON, A.; ODETH, I. N.; MARGERUM, D. W.; *Inorg. Chem.* **2006**, 45, 8768.

IYANAGI, T.; MAKINO, N.; MASON, H. S.; *Biochem.* **1974**, 13, 1701.

JAFFAR, M.; WILLIAMS, K. J.; STRATFORD, I. J.; *Adv. Drug Del. Rev.* **2001**, 53, 217.

JULIÃO, M. D.; FERREIRA, E. I.; FERREIRA, N. G.; SERRANO, S. H. P.; *Electrochim. Acta* **2006**, 51, 5080.

KELSON, B.; MCNAMARA, J. P.; PANDEY, A.; RYAN, K. J.; DORIE, M. J.; MCAFEE, P. A.; MENKE, D. R.; BROWN, J. M.; TRACY, M.; *Anti-Canc. Drug Des.* **1998**, 13, 575.

KENNEDY, K. A.; TEICHER, B. A.; ROCKWELL, S.; SARTORELLI, A. C.; *Biochem. Pharmacol.* 1980, 29, 1.

KIRLIN, W. G.; CAI, J.; THOMPSON, S. A.; DIAZ, D.; KAVANAGH, T. J.; JONES, D. P.; *Free Rad. Biol. Med.* **1999**, 27, 1208.

KOHN, L. K.; PAVAM, C. H.; VERONESE, D.; COELHO, F.; DE CARVALHO, J. E.; ALMEIDA, W. P.; *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, 41, 738.

KOVACIC, P.; OSUNA, J.; *Curr. Pharmacol. Des.* **2000**, 6, 277.

LA-SCALEA, M. A.; SERRANO, S. H. P.; GUTZ, I. G. R.; *Química Nova* **1999**, 22 (3), 417.

LUND, H.; *In Organic Electrochemistry*, 2nd ed., Marcel Dekker, Inc; New York.; **1991**, 296.

LUND, H.; BAIZER, M. M. *Organic Electrochemistry: an introduction and a guide.* 3rd ed. New York: Marcel Dekker Inc; 411-412,451-452, **1990**.

MASELLA, R.; DI BENEDETTO, R.; VARI, R.; FILESI, C.; GIOVANNINI, C.; *J. Nutrit. Biochem.* **2005**, 16, 577.

MAYA, J. D.; BOLLO, S.; NUÑEZ-VERGARA, L. J.; SQUELLA, J. A.; REPETTO, Y.; MORELLO, A.; PÉRIÉ, J.; CHAUVIÈRE, G. *Biochem. Pharm.* **2003**, 65, 999.

MOUSTY, C.; *App. Clay Science* **2004**, 27, 159.

MCCARTHY, T. J.; HAYES, E. P.; SCHWARTZ, C. S.; WITZ, G.; *Fundam. Appl. Toxicol.* **1994**, 22, 543.

MCCLELLAND, R. A.; in *Selective Activation of Drugs by Redox Processes*, G.E. Adams, A. Breccia, E.M. Fielden and P. Wardman, Editors, Plenum Press, New York **1990**, p. 125.

MILLER, C.; FOLKES, L. K.; MOTTLEY, C.; WARDMAN, P.; MASON, R. P.; *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2002**, 397, 113.

MONGE, A.; PALOP, J. A.; CERÁIN, A. L.; SENADOR, V.; MARTÍNES-CRESPO, F. J.; SAINZ, Y.; NARRO, S.; GARCÍA, E.; DE MIGUEL, C.; GONZÁLEZ, M.; HAMILTON, E.; BARKER, A. J., CLARKE, E. D.; GREENHOW, D. T.; *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 1786.

NAUGHTON, D. P.; *Adv. Drug Del. Rev.* **2001**, 53, 229.

NÚÑEZ-VERGARA, L. J.; NAVARRETE-ENCINA, P. A.; ORTIZ, M. E.; BOLLO, S.; SQUELLA, J. A.; *Chemico-Biol. Interac.* **1996**, 101, 89.

NÚÑEZ-VERGARA, L. J.; ORTIZ, M. E.; BOLLO, S.; SQUELLA, J. A.; *Chemico-Biol. Interac.* **1997**, 106, 1 – 14.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J.; *Química Nova* **2002**, 25, 976.

OLMSTEAD, M. L.; NICHOLSON, R. S.; *Anal. Chem.*, **1969**, 862.

PARVEN, I.; NAUGHTON, D. P.; WHISH, W. J. D.; THREADGILL, M. D.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 2031.

PLANCHON, S. M.; PINK, J. J.; TAGLIARINO, C.; BORNMANN, W. G.; VARNES, M. E.; BOOTHMAN D. A.; *PNAS* **2004**, 101, 6564-6569.

RADI, A.; BELAL, F.; *J. Electroanal. Chem.* **1998**, 441, 39.

RAJSKI, S. R., WILLIAMS, R. M.: *Chem. Rev.* **1998**, 98, 2723.

RAUF, S.; GOODING, J. J.; AKHTAR, K.; GHOURI, M. A.; RAHMAN, M.; ANWAR, M. A.; KHALID, A. M.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, 37, 205.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; *Quimica Nova* **2001**, 24, 112.

RUSSO, A.; DEGRAFF, W.; FRIEDMAN, N.; MITCHELL, J. B.; *Canc. Res.* **1986**, 46, 2845.

SAKHI, A. K.; RUSSNES, K. M.; SMELAND, R. B.; GUNDERSEN, T. E.; *J. Chrom.* **2006**, 1104, 179.

SÉQUARIS, J. M.; VALENTA, P.; *J. Electroanal. Chem.* **1987** N, 227, 11.

SCHAFFER, F. Q.; BUETTNER, G. R.; *Free Rad. Biol. Med.* **2001**, 30, 1191.

SQUELLA, J. A.; BOLLO, S.; NÚÑEZ-VERGARA, L. J.; *Curr. Org. Chem.* **2005**, 9, 565.

TOCHER, J. H.; *Gen. Pharmac.* **1997**, 28, 485.

TOCHER, J. H.; EDWARDS, D. I.; *Biochem. Pharm.* **1995**, 9, 1367.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; *Chem. Biol. Interac.* **2006**, 160, 1.

VALKO, M.; IZAKOVIC M.; MAZUR, M.; RHODES, C. J.; *Mol. Cell. Biochem.* **2004**, 266, 37.

WANG, J.; OZSOZ, M.; CAI, X. H.; RIVAS, G.; SHIRAISHI, H.; GRANT, D. H.; CHICHARRO, M.; FERNANDES, J.; PALECEK, E.; *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1998**, 45, 33.

WILLIAMSON, J. M.; BOETTCHER, B.; MEISTER, A.; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1982**, 79, 6246.

ZIEBA-MIZGALA, A.; PUSZKO, A.; REGIEC, A.; KUDUK-JAWORSKA, J.; *Bioelec.* **2005**, 2005, 113-119.

ZUMAN, P.; FIJALEK, Z.; DUMANOVIC, D.; SUZNJEVIC, D.; *Electroanalysis* **1992**, 4, 783.

7. TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

SOUZA, A. A.; COSTA, C. O.; MIRANDA, P. R. B.; “**Estudos Eletroquímicos de Corantes Têxteis e da Niclosamida e de sua Adsorção no Bioplímero Quitosana**”. XIV Congresso Acadêmico da Universidade Federal de Alagoas, no período de 15 a 17 de dezembro de 2004, Maceió - AL.

SOUZA, A. A.; DE PAULA, F. S.; GOULART, M. O. F. G.; FRAGA, C. A. M.; DA SILVA, E. F.; CARVALHO, S. D'AQUINO; “**Estudos Bioeletroquímicos de Fármacos Híbridos: Nitroaromáticos Fenil-Hidrazônicos**”. XV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica - SIBEE, no período de 04 a 07 de dezembro de 2005, Londrina - PR.

MELO, A. M. S. **SOUZA, A. A.**; GOULART, M. O. F. G.; DE ABREU, F. C.; “**Estudo Eletroanalítico e Espectroscópico da Adsorção da Trifluralina no Biopolímero Quitosana**”. 13º Encontro Nacional de Química Analítica / 1º Congresso Ibero-Americano de Química Analítica, no período de 12 a 16 de dezembro de 2005, Niterói - RJ.

MELO, A. M. S.; MOURA, M. A. B. F.; **SOUZA, A. A.**; DE PAULA, F. S.; DE ABREU, F. C.; GOULART, M. O. F. G.; “**Determinação do pKa da Trifluralina via Eletroquímica**”. 29º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 22 de maio 2006, Águas de Lindóia – SP.

MELO, A. M. S.; MOURA, M. A. B. F.; **SOUZA, A. A.**; GOULART, M. O. F. G.; DE ABREU, F. C.; “**Estudo Eletroquímico da Trifluralina em Eletrodo de Carbono Vítreo**”. XVII Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Electroquímica – SIBAE, no período de 3 a 7 de abril de 2006, La Plata, Argentina.

GOULART, M. O. F. G.; **SOUZA, A. A.** ; SALES, E. M. ; ALMEIDA, W. P. ;
**“Electrochemical Study of Methyl 2-[p-Nitrophenyl(Hydroxy)-Methyl Acrylate,
an Anticancer Drug, in the Presence of GSH an dsDNA”**. 210th Meeting of the
Electrochemical Society / XXI Congreso de la Sociedad Mexicana de
Electroquímica, no período de 29 de outubro a 3 novembro de 2006, Cancun –
México.

8. PREMIAÇÕES EM CONGRESSOS

Melhor Painel – Seção de Eletroquímica Orgânica – XV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – SIBEE, 2005. The Electrochemical Society.

9. ANEXOS

SOUZA, A. A.; SALES, E. M.; DE ABREU, F. C.; DE PAULA, F. S.; GOULART, M. O. F. G.; ALMEIDA, W. P.; “***Electrochemical Study of Methyl 2-[p-Nitrophenyl(Hydroxy)-Methyl Acrylate, an Anticancer Drug, in the Presence of GSH and dsDNA***”. The Electrochemical Society, 2007, vol. 3.

Electrochemical Study of Methyl 2-[*p*-Nitrophenyl(Hydroxy)Methyl]Acrylate, An Anticancer Drug, In The Presence of GSH and dsDNA

A. A. de Souza^a, E. M. Sales^a, F. C. de Abreu^a, F. S. de Paula^a, Marília O. F. Goulart^{a*}, W. P. Almeida^b

^aInstituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, 57072-970, Maceió, AL Brazil

^bFaculdade de Ciências Médicas/UNICAMP, Campinas – SP, Brazil

Electrochemical experiments (CV, DPV, SWV, CPE) with methyl 2-[*p*-nitrophenyl(hydroxy) methyl] acrylate (**1**) were performed in protic (EtOH + phosphate buffer 1:9, 0.1 mol L⁻¹, pH 6.9 and EtOH + phosphate buffer: 1:9, 0.1 mol L⁻¹, pH 9.4) and aprotic (DMF + TBAP, 0.1 mol L⁻¹) media. The reduction behaviours were typical of nitroaromatics, with an additional wave, in aprotic medium, related to the reduction of the olefin. Electrolysis, in protic media, furnished a reduced dimer. The incubation of **1** into a dsDNA biosensor revealed, that, after reduction of the nitroaromatic function, diagnostic oxidation peaks of the nucleobases were observed, indicative of interaction between them. GSH influenced the reduction behaviour of **1**. Direct reduction of **1**, in phosphate buffer, pH 9.38, to a stable nitroso/GSH adduct is facilitated. These electrochemical results help in the understanding of the anticancer activity of **1** that can be considered a hypoxia targeted bioreductive agent with a glutathione depleting function.

Introduction

Interaction of antineoplastic drugs with cellular targets involves various types of chemical binding (1). Cellular glutathione (GSH) levels were found to be higher in human cancer cell lines than in a normal cell (2,3). GSH it is responsible for a variety of cellular functions including protection from toxic oxygen species and detoxification of various xenobiotics (4). Compounds that either inhibit or stimulate GSH synthesis can be of value in cancer chemotherapy (5,6). β -hydroxyacrylates, known as Baylis-Hillman adducts have been investigated toward biological nucleophiles, with evidence of significant interaction with glutathione rather than with deoxyribonucleosides [7]. It may be also possible to target such GSH target molecules to tumor cells by coupling them to hypoxia activated bioreductive molecules, such as nitroaromatics. Such coupling can utilize or incorporate groups that have a propensity to oxidize thiols, such as intracellular glutathione. The resulting depletion of glutathione may increase redox mediated apoptosis. This rationale led to the synthesis of Baylis-Hillman adducts (8). The *in vitro* antiproliferative activity of these compounds in DMSO was evaluated with significant results (8). The *in vitro* antiproliferative activity of these compounds at 250, 25, 2.5 and 0.25 $\mu\text{g/mL}$ concentrations in DMSO was evaluated by using the protocol established by National Cancer Institute (NCI) (8). Compound **1** showed pronounced effects toward melanome, lung, non-small cells, ovarian and prostate

cancer cells (Table 1) (8). The experimental procedures have been described in detail (8). In that study, UACC62 (melanoma), MCF7 (breast), NCI460 (lung, non-small cells), OVCAR (ovarian), PC03 (prostate), HT29 (colon), 786-0 (renal) and NCI-ADR (breast cells expressing a multiple drugs resistance phenotype) were used. Results are shown in table 1.

Table 1. Cytotoxic Activities of compounds **1** against a panel of human tumor cell lines

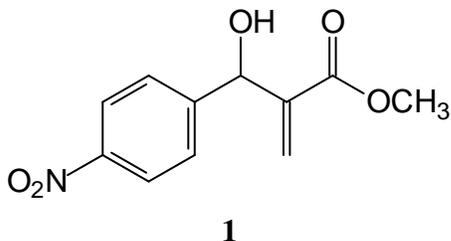
Compd.	IC ₅₀ (μM) of cell lines ^a							
	UACC62	MCF7	NCIADR	786-0	NCI460	PC-03	OVCAR	HT29
1	3.8	14	2	7.1	4.3	4.1	3.2	21

The biological activity of nitrocompounds depends on its *in vivo* reduction to RNO₂[•] species, promoted by nitroreductases and, therefore, optimum activity should result when the redox potential of RNO₂ is situated between that corresponding to the cellular electron donor agents and the natural biological oxidizing agent O₂/O₂[•]-couple (9-11).

Electrochemical techniques represent powerful tools for the analysis of those compounds and their interaction with DNA and GSH (9-11).

An electrochemical DNA-biosensor is a receptor-transducer that uses double stranded DNA (dsDNA) and single-stranded DNA (ssDNA) immobilized on the surface of an electrochemical transducer as molecular recognition element to measure specific binding processes with DNA (1,12). It allows the evaluation of potential DNA interactions of a molecule based on its binding to nucleic acids, and the prediction of possible DNA damage that may represent a health hazard (1,12,13). The technique employs voltammetric methodologies for the study of drugs, pro-drugs and other analytes and for *in situ* generation of reactive intermediates, which may react with DNA. The interaction with dsDNA may lead to the rupture of hydrogen bonds and opening of the double helix. This in turn permits the bases to come into contact with the electrode surface and enables the electrochemical detection of the damage by monitoring the oxidation of the exposed bases (12, 13). With this in mind an electrochemical DNA-biosensor was used to investigate possible DNA damage caused by compound **1**. It is also a complementary tool for the study of biomolecular interaction mechanisms. The electrochemical characteristics of these DNA-biosensors have been evaluated (13). The mechanism of interaction of DNA-compound **1** at charged interfaces mimics better the *in vivo* DNA-**1** situation, where it is expected that DNA is in close contact with charged phospholipid membranes and proteins, rather than when the interaction is in solution.

This paper presents electrochemical studies of reduction and oxidation of compound **1** using a glassy carbon electrode, towards DNA and GSH, in different conditions.



Experimental

Apparatus and procedures

The electrochemical experiments (cyclic voltammetry, differential pulse voltammetry and coulometry) were recorded using a Potenciostat/Galvanostat BAS 100B or a PGSTAT AUTOLAB 20. The working electrode was a glassy carbon electrode BAS ($d = 3$ mm), the counter electrode was a Pt coil, and the reference was an Ag|AgCl, Cl^- (0.1 mol L^{-1}), all contained in a one-compartment electrochemical cell, with a volumetric capacity of 10 mL. The glassy carbon electrode was polished with alumina on a polishing felt (BAS polishing kit), resulting in a surface with a mirror-like appearance. UV-VIS spectra were obtained on a Shimadzu MultiSpec-1501 spectrophotometer.

Electrochemical studies were performed in protic (EtOH + phosphate buffer 1:9, 0.1 mol L^{-1} , pH 6.9 and EtOH + phosphate buffer: 1:9, 0.1 mol L^{-1} , pH 9.4) and aprotic (DMF + TBAP, 0.1 mol L^{-1}) media. GSH (Aldrich) was added to pH 9.4 phosphate buffer, in different proportions. Upon addition of GSH, pH value changed to *ca.* 8.4.

Controlled potential electrolysis was held in divided cells (100 mL), in EtOH + phosphate buffer (2:8) pH 6,9, using carbon felt as the working electrode, Pt as auxiliary vs. Ag/AgCl, Cl^- (0.100 mol L^{-1}), as a reference electrode. The cell was degassed by purging N_2 through it. Pre-electrolysis was performed at $E_{\text{app.}} = -1.0$. After the addition of compound **1**, $E_{\text{app.}}$ was adjusted to -0.950 V. UV-VIS and CV were used to follow the status of electrolysis.

Chemicals

Compound **1** was synthesized following published procedures (14, 8). Its analytical and physico-chemical data are in total agreement with the proposed structure (14,8). Calf thymus dsDNA (Sodium salt, Type I) and GSH were obtained from Sigma Chemical Co (St Louis, USA). Acetate buffer solutions of ionic strength 0.2 mol L^{-1} at pH 4.5, were used in all experiments and were prepared using analytical grade reagents and purified water from a Millipore Milli-Q system (conductivity $< 0.1 \mu\text{S cm}^{-1}$). All experiments were performed at room temperature ($24 \pm 2^\circ\text{C}$). Except in reduction, no deoxygenation by bubbling an inert gas (N_2) through the solution was necessary.

Preparation of dsDNA-GC biosensor.

The electrochemical procedure for the investigation of the dsDNA interaction involved three steps: preparation of the electrode surface, immobilisation of dsDNA gel and voltammetric transduction. Initially the GC electrode (BAS, diameter 3 mm), was polished with alumina, using a BAS polishing felt, until the surface exhibited a mirror-like appearance. The electrode was then electrochemically pre-treated using successive potential cycles from 0 to 1.4 V *versus* Ag|AgCl, Cl⁻ (0.1 mol dm⁻³) in aqueous acetate buffer (0.2 mol dm⁻³; pH 4.5) until a stable DPV response was obtained (12,13), washed thoroughly with distilled/deionised water, dried and placed in an upright position in the cell. In order to immobilise the dsDNA, the surface of the electrode was coated with 50 µL of calf thymus DNA solution [containing 18.75 mg of dsDNA in 0.5 ml of acetate buffer (0.2 mol dm⁻³; pH 4.5), the cell was covered to protect it from atmospheric contamination and the gel allowed to dry at room temperature for 24 h. The quantity of dsDNA employed was estimated to be sufficient to cover the entire surface of the GC electrode. After drying, the biosensor was immersed in 10 ml of aqueous acetate buffer (0.2 mol dm⁻³; pH 4.5) and a potential of 0.6 V *versus* Ag|AgCl, Cl⁻ (0.1 mol dm⁻³) was applied for 180 s, until a stable DPV response was obtained. For each series of experiments, an identical dsDNA-GC electrode was prepared as a reference blank to serve as a control. This electrode was not treated with substrate but received the same pre- and post-treatments as the test electrode. The application of the positive electrode potential is worthy to achieve electrostatic binding of the positive GC surface with the negatively charged phosphate backbone of the dsDNA. The biosensor was removed from the acetate solution and, then, 20 µL of a pH 4.5, 0.2 mol L⁻¹ aqueous acetate buffer solution of compound **1** (1.0 mmol L⁻¹) was added to the dried gel and left in contact for additional 24 hours, already in the voltammetric cell and covered by aluminium paper. After that time, 10 mL of the buffer solution was added to the cell for the voltammetric experiments.

Results and discussion

Aprotic medium

Cyclic voltammetry of compound **1**, at a glassy carbon electrode, in DMF + TBAP, 0.1 mol L⁻¹ (Figure 1A), presents the usual reduction and oxidation electron transfer reactions, characteristic of nitroaromatic compounds (9-10, 15). In this medium, three reduction waves are observed in the cyclic voltammograms of compound **1**. The first two [Ic (-1,122 V), IIc (- 1,917 V)] and the third one [IIIc (- 2,311 V)] are related to the nitroaromatic function and to the acrylate moiety, respectively (Figure 1). The generation of the stable nitro-anion radical is observed (system Ic/Ia) (Figure 1), followed by a second wave, related to the generation of the hydroxylamine, that would suffer oxidation at IIa (-0.655 V). There is no corresponding response on the second negative scan, related to the reversible 2-electron RNO/RNHOH couple, fact that suggests instability of the hydroxylamine, in this medium (figure not shown). The third wave was similar to the one obtained in the same conditions for methyl 2-[phenyl(hydroxy) methyl] acrylate (figure not shown) and is related to the reduction of the olefin in the α,β -unsaturated system.

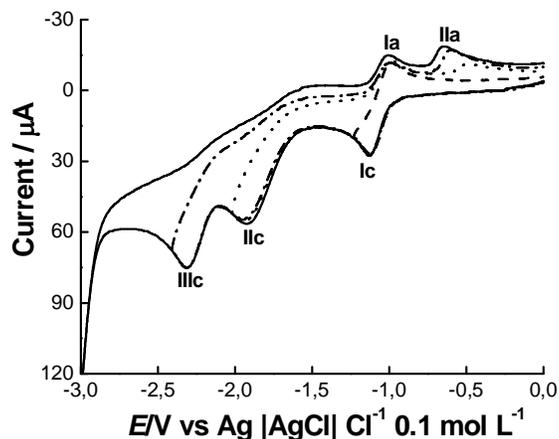


Figure 1. Cyclic voltammograms (CV) of **1** (2 mmol L^{-1}), DMF + TBAP, 0.1 mol L^{-1} , GCE, $\nu = 0.100 \text{ V s}^{-1}$.

The reduction of **1** was also studied by square wave voltammetry (Figure 2) and the reduction mechanism described earlier was confirmed. Square wave voltammetry forward and backward currents for the second scan clearly show the reversibility of the electrogenerated nitro anion radical [(Ia/Ic ($-1,057 \text{ V}$)] system and the irreversibility of the following waves [IIc ($-1,817 \text{ V}$) and IIIc ($-2,191 \text{ V}$)].

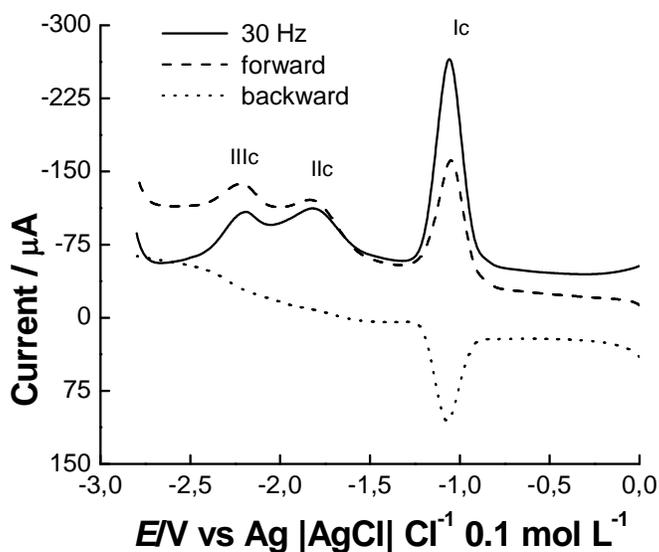


Figure 2. Voltammograms of **1** (2 mmol L^{-1}), DMF + TBAP, 0.1 mol L^{-1} , GCE. **A**: CV, $\nu = 0.100 \text{ V s}^{-1}$; **B**: SWV, $f = 30 \text{ Hz}$.

Protic medium

Neutral pH

CV of **1** shows a reduction behaviour typical of nitroaromatics, with the first diffusional (I_{pc1} vs $v^{1/2}$) and irreversible (E_{pc1} dependent on v) wave (Ic) related to the generation of the derived hydroxylamine, in a $4e^-/4H^+$ process (Figure 3 A-B). The quase-reversible system Ia/Iic is related to the derived $NO \rightarrow NHOH$. VPD shows only one wave and VOQ indicates a certain degree of reversibility of the nitro reduction (Figures 3 C-D).

After holding the potential at -0.8 V, during 120 s (Figure 4), it was possible to observe, using a negative scan, along with wave Ic (hydroxylamine formation), a second wave (Iic), relative to the reduction of the RNO, formed in the first scan (Figure 4A). In the case of a positive scan, wave Ia, which corresponds to the oxidation of the product generated at Ic (Figure 4B).

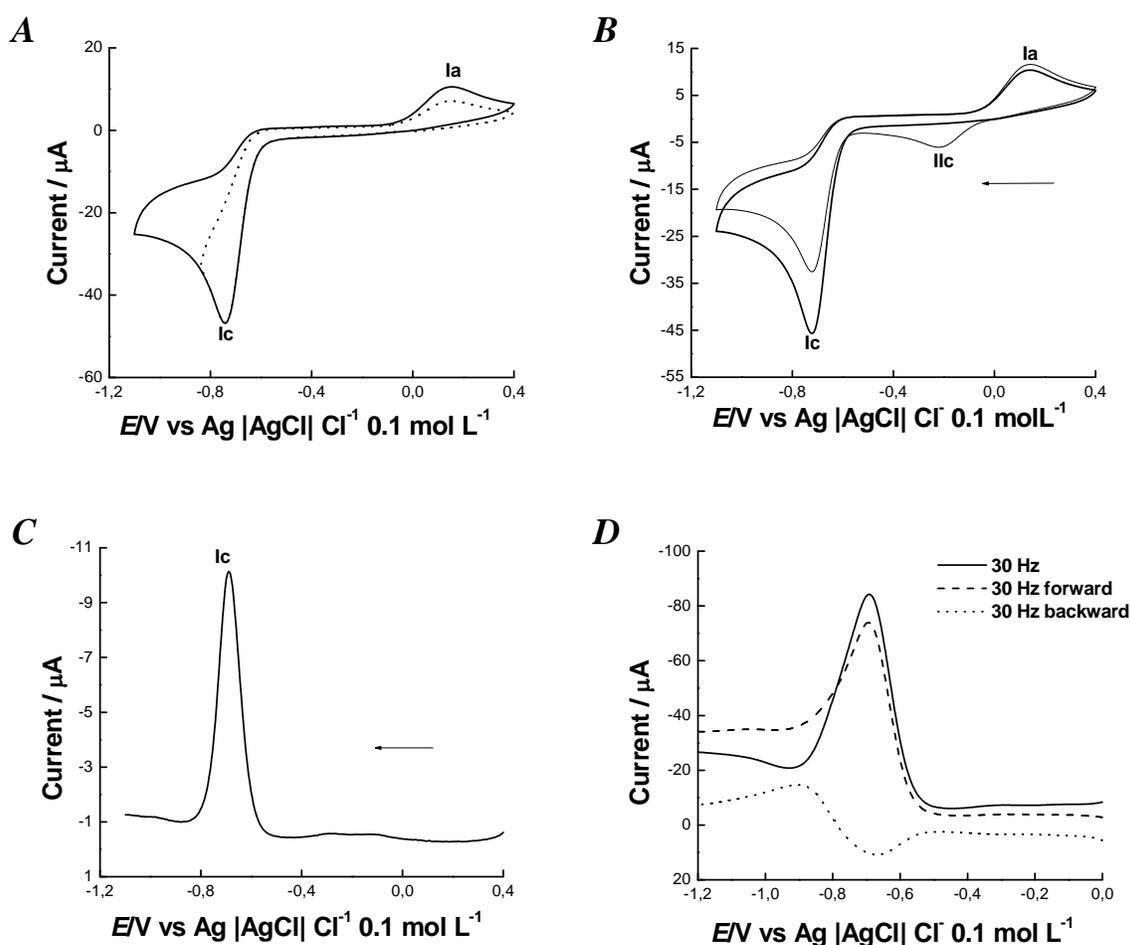


Figure 3. Cyclic voltammograms (CV) of **1**, 1 mmol L^{-1} , EtOH + phosphate buffer: 1:9, 0.1 mol L^{-1} , pH 6.9, GCE. **A** and **B**: CV, $v = 0.100 \text{ V s}^{-1}$; **B**: 2 cycles. **C**: Differential Pulse Voltammogram (DPV), $v = 0.005 \text{ V s}^{-1}$; **D**: Square Wave Voltammetry (SWV), $f = 30 \text{ Hz}$.

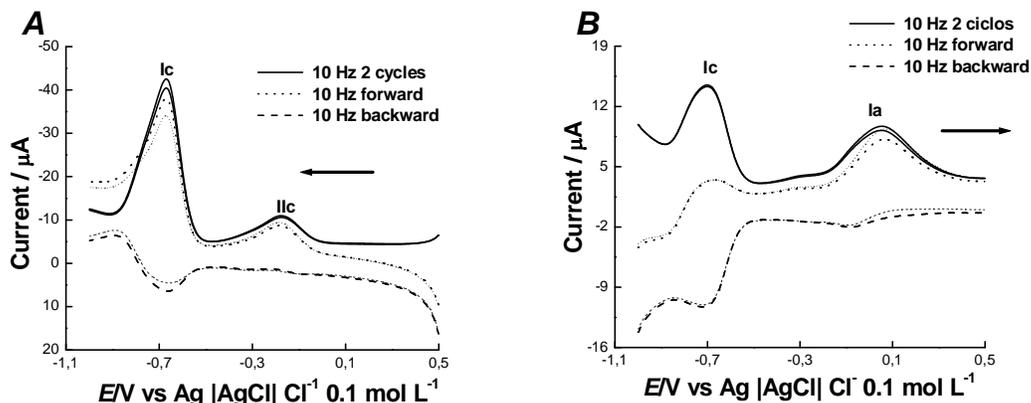
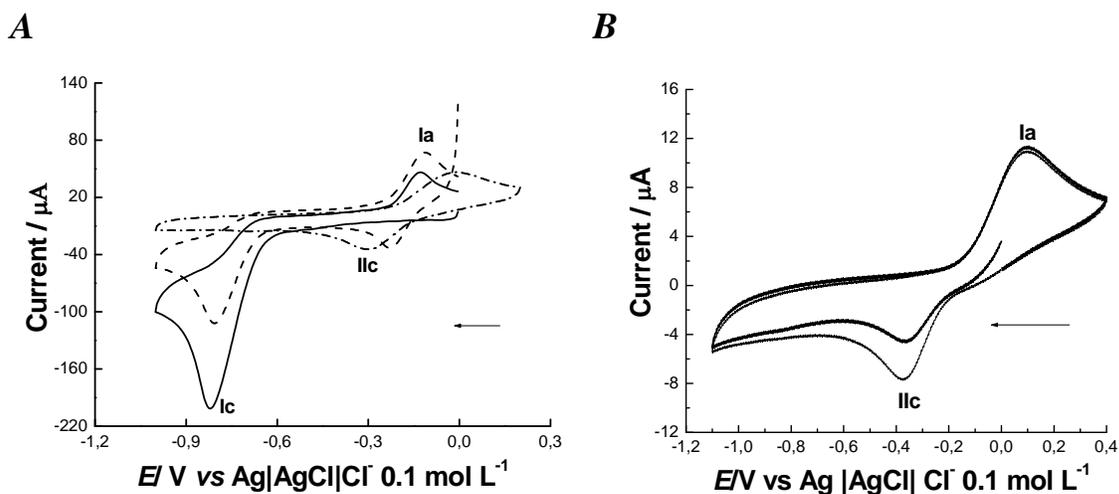


Figure 4. SWV of **1**, 1 mmol L⁻¹, EtOH + phosphate buffer: 1:9, 0.1 mol L⁻¹, pH 6.9, GCE. **A.** - 0.8 V (120 s), scan from positive to negative potentials (cathodic), $f = 10$ Hz. **B.** - 0.8 V (120 s), scan from negative to positive potentials (anodic), $f = 10$ Hz.

Electrolysis, performed in EtOH + phosphate buffer: 1:9, pH 6.9, with E_{app} -0.950 V, was followed by CV (Figure 4A) and led to the consumption of 4 mol electron mol⁻¹. Figure 4B shows the CV of the product of electrolysis and figure 4C, the UV-VIS spectra of **1** and its reduction product. Work-up of the reactional product allowed the separation of a dark product, that was submitted to the usual methods (MS, ¹³C NMR and ¹H NMR), for structure determination, which led to the structure **2** for the reduction product.



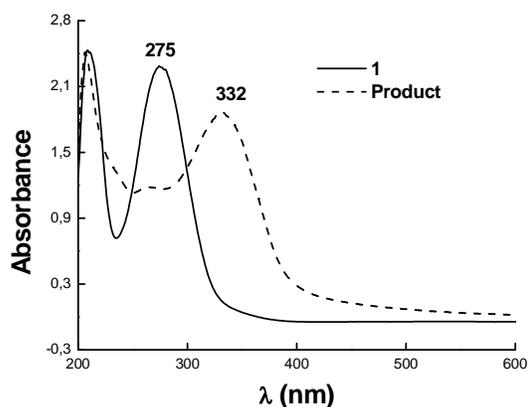
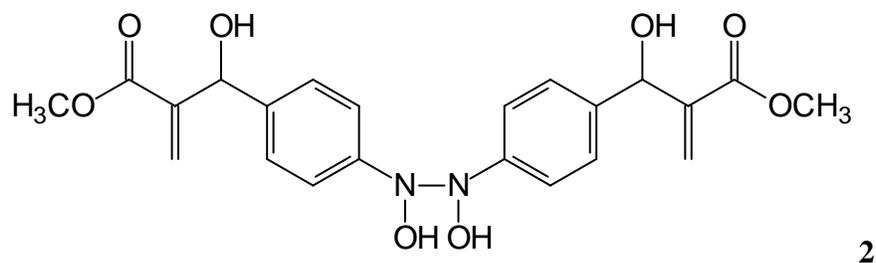


Figure 5. **A**: CV of **1**, during electrolysis, $v = 0.100$ V. **B**: CV of the product (**2**), after electrolysis. **C**: UV-Vis spectra of **1** and reduced product (0.1 mmol L^{-1}).



Basic pH (9.38)

The $\text{NO}_2/\text{NO}_2^{\ominus}$ turns reversible at EtOH + phosphate buffer: 1:9, 0.1 mol L^{-1} , pH 9.38 (Figure 6A).

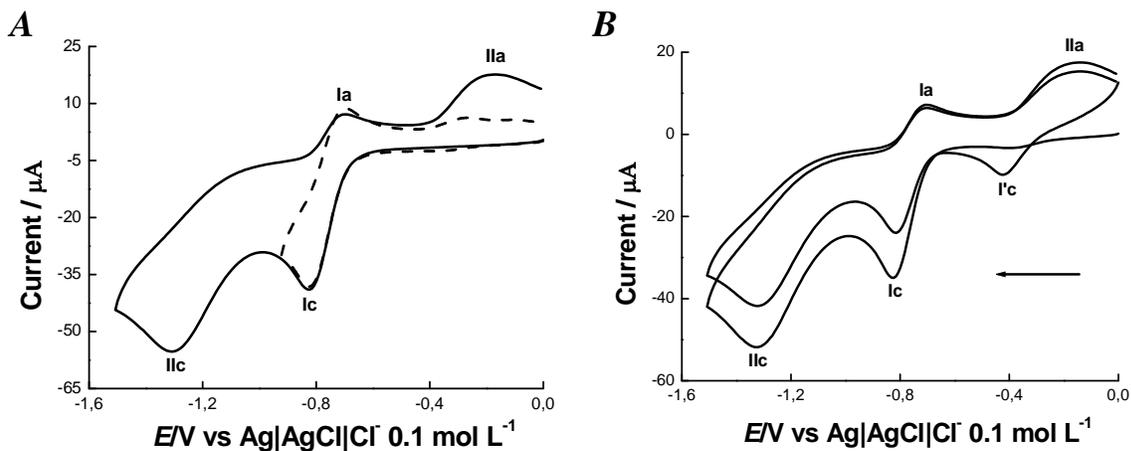


Figure 6. **A** CV of **1**, 1 mmol L^{-1} , EtOH + phosphate buffer: 1:9, 0.1 mol L^{-1} , pH 9.38. **B** successive cycles. $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$.

DNA biosensor

Compound **1** was incubated in a dsDNA biosensor. Figure 7A shows that no interaction between dsDNA was observed, once the blank and the modified dsDNA were similar. On the other hand, after reduction of the nitro group, with a pre-electrolysis performed at -0.7 V, during 120 s, two anodic waves related to the oxidation of bases guanine and adenine have appeared, indicative of interaction between the reduced **1** and dsDNA (12,13).

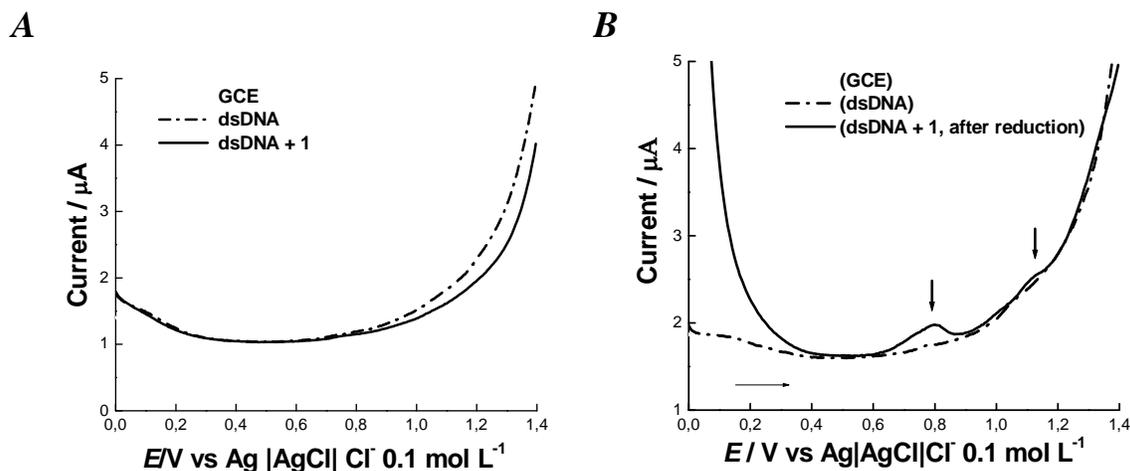


Figure 7. Differential pulse voltammograms (DPV) using the dsDNA biosensor in 1:1 mixture of pH 4.5 0.2 mol L⁻¹ aqueous acetate buffer and ethanol: without (•••••); and with 1 mmol L⁻¹ of compound **1**, before (A) and after: (—) $t_d = 120$ s at $E_d = -0.7$ V. $v = 5$ mV s⁻¹.

As shown, the electrochemical DNA-biosensor enabled the investigation of DNA damage caused by compound **1**, by monitoring the occurrence of the oxidation peaks of the nucleobases. Using the electrochemical DNA-biosensor it was possible to select the potential for the *in situ* electrogeneration of reactive intermediates during compound **1** reduction that can cause damage to the DNA, and to detect *in situ* the damage caused by those species on the DNA immobilised on the electrode surface.

GSH addition

The direct effect of GSH on the ArNO₂/ArNO₂[•] redox couple is presented in figure 8.

Addition of glutathione at different [GSH]:[**1**] ratios results in an increase of current response of wave Ic and decrease of current response for the RNHOH oxidation wave, IIa, accompanied by the appearance of wave IIa', until stabilization, at [GSH]:[**1**] equal to 5. At this thiol concentration, the current doubles, in comparison to the original one, suggesting a 2e⁻/2H⁺ process, which would lead to a stable nitroso compound, in the presence of GSH (equation 1) (11, 4). The removal of IIa is in agreement with the known chemical reactivity of hydroxylamine derivatives with thiols (16,17).



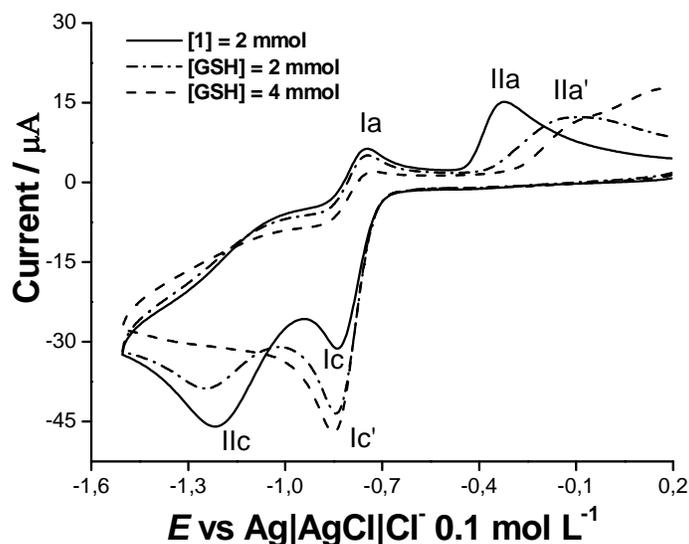


Figure 8. CV of **1** (1 mmol L^{-1}), 1 mmol L^{-1} , EtOH + phosphate buffer: 1:9, 0.1 mol L^{-1} , pH 9.38. Addition of GSH (5 mmol L^{-1}) lead to the duplication of wave Ic (now Ic') and disappearance of wave IIc.

Conclusions

The acrylate function suffers reduction at more negative potentials and possibly does not influence the biological action of compound **1**, related to redox processes. GSH induces the generation of the nitroso function, also pharmacophoric and sometimes, more active than the nitro function.

These electrochemical results help in the understanding of the anticancer activity of **1** that can be considered a hypoxia targeted bioreductive agent with glutathione depleting function.

Acknowledgments

Authors thank CNPq, CAPES, BNB, FAPEAL and FAPESP for research grants and CAPES/COFECUB for a post-doctoral scholarship for FCA.

References

1. S. Rauf, J.J. Gooding, K. Akhtar, M.A. Ghauri, M. Rahman, M.A. Anwar and A.M. Khalid, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **37**, 205 (2005).
2. A. Russo, W. Degraff, N. Friedman and J.B. Mitchell, *Cancer Res.* **46**, 2845 (1986).
3. K. D. Tew, *Cancer Res.*, **54**, 4313 (1994).

-
-
4. L.R. Berube, S. Farah, R. A. McClelland and A.M. Rauth, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **22**, 817 (1992).
 5. O. W. Griffith and A. Meister, *J. Biol. Chem.*, **254**, 7558 (1979).
 6. J. M. Williamson, B. Boettcher and A. Meister, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6246 (1982).
 7. T. J. McCarthy, E.P. Hayes, C.S. Schwartz and G. Witz, *Fundam. Appl. Toxicol.* **22**, 543 (1994).
 8. L. K. Kohn, C. H. Pavam, D. Veronese, F. Coelho, J. E. De Carvalho and W. P. Almeida. *Eur. J. Med. Chem.*, **41**, 738 (2006).
 9. F.C. De Abreu, P.A.L. Ferraz and M.O.F. Goulart, *J. Braz. Chem. Soc.* **13**, 19 (2002).
 10. J.A. Squella, S. Bollo and L. J. Núñez-Vergara, *Current Org. Chem.*, **9**, 565 (2005).
 11. M. D. da S. Julião, E.I. Ferreira, N. G. Ferreira and S.H.P. Serrano, *Electrochim. Acta* **51**, 5080 (2006).
 12. A. M. O. Brett, M.O.F.; Goulart and F.C. de Abreu, *Biosens. Bioelectron.*, **17**, 913 (2002).
 13. A. M.O. Brett, S. H. P. J. Serrano, A. P. Piedade, in *Comprehensive Chemical Kinetics*, R. G. Compton and H. G. Hancock, Editors. vol. 37, p 91-119, Elsevier: Amsterdam (1999).
 14. F. Coelho, W.P. Almeida, C.R. Mateus, D. Veronese, E.C.S. Lopes, G.P.S. Silvira, R.C. Rossi and C.H. Pavam, *Tetrahedron* **58**, 7437 (2002).
 15. H. Lund, Cathodic Reduction of Nitro and Related Compounds. In *Organic Electrochemistry*, 4th Ed., H. Lund and O. Hammerich, Editors, p. 389, Marcel Dekker, New York (2001).
 16. R.A. McClelland, in *Selective Activation of Drugs by Redox Processes*, G.E. Adams, A. Breccia, E.M. Fielden and P. Wardman, Editors, p. 125, Plenum Press, New York (1990).
 17. J.H. Tocher and D.I. Edwards, *Biochem. Pharmacol.* **50**, 1367 (1995).