



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
CICERO DE OLIVEIRA COSTA

ESTUDOS BIOELETROQUÍMICOS DE QUINONAS

Maceió – Alagoas

2011

CICERO DE OLIVEIRA COSTA

ESTUDOS BIOELETROQUÍMICOS DE QUINONAS

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

Orientadora: Profa. Dra. Marília Oliveira Fonseca Goulart

Maceió - Alagoas

2011

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

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

C837e Costa, Cícero de Oliveira.
Estudos bioeletroquímicos de quinonas / Cícero de Oliveira Costa.
– 2011.
194 f. : il. tabs., grafs.

Orientadora: Marília Oliveira Fonseca Goulart.
Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal
de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2011.

Bibliografia: f. 181-192.

Glossário: f. 193-194.

1. Bioeletroquímica. 2. Eletroanálise. 3. Quinomas. 4. Química médica-
nal. 5. DNA. 6. Biossensores. 7. Oncocalixona. 8. Juglona. 9. Biflorina.
I. Título.

CDU: 544:577.1



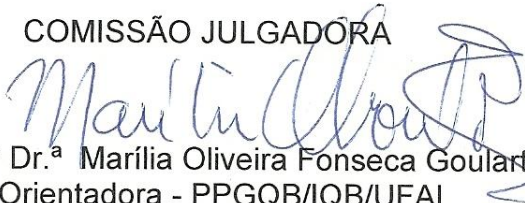
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA



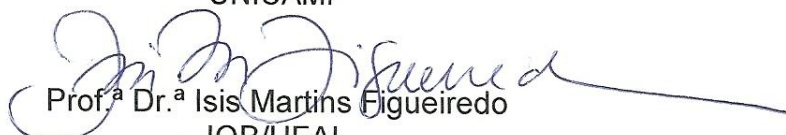
BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1384, Fax: (82) 3214-1384
email: cpgqb@qui.ufal.br

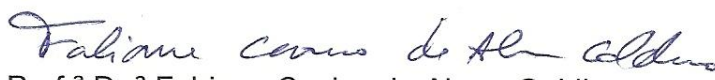
Membros da Comissão Julgadora da Tese de Doutorado de **Cícero de Oliveira Costa**, intitulada: "**Estudos Bioeletroquímicos de Quinonas**", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 15 de abril de 2011, às 9h, na Sala de Aulas do PPGQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA


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


Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota
UNICAMP


Prof.^a Dr.^a Isis Martins Figueiredo
IQB/UFAL


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


Prof. Dr. Paulo dos Santos Roldan
PPGQB/IQB/UFAL

*Dedico esta tese a minha família ,
em especial a minha querida mãe, Josefa.*

AGRADECIMENTOS

a Deus, por ser meu guia e sempre iluminar meu caminho.

agradecimento especial a minha querida mãe, Josefa de Oliveira Queiroz, pelo amor e incentivo oferecidos durante toda a minha vida, especialmente na acadêmica.

aos meus irmãos, Erivaldo, Sebastião, Aparecido e Vitória, por todo apoio e conselhos oferecidos ao longo desses anos.

a toda minha família, em especial as minhas cunhadas Maria e Selma, minha tia Carmelita e seu esposo Manoel, que sempre me aconselharam e estiveram por perto.

aos meus amigos do laboratório Augusto, Paulo, Waldomiro, Adilson e Antonio, pelas brincadeiras, discussões e ajuda nas horas mais difíceis.

aos colegas do laboratório de eletroquímica em especial, Allani, Iara, Alane, Manu, Tiago, Fabricia, Camila, Francisco, Cleilton, Wilson, Rui, Andressa, Danuzia e Monica, pela companhia e ajuda em alguns momentos.

aos doutores, Rita de Cássia e Flávio Damos, pela boa recepção, suporte e ajuda durante todo o tempo em que permaneci na Unicamp.

aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, pelos ensinamentos e discussões realizadas durante o curso.

agradecimento especial ao Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota, pela recepção, orientação e ensinamentos oferecidos em seu laboratório na Unicamp/SP.

ao Prof. Claudio Olea-Azar, da Universidade do Chile, pelas análises realizadas com a oncocalixona.

às Profas. Dras. Marne Vasconcellos, Telma Leda Lopes e Otilia Pessoa da Universidade Federal do Ceará, por terem cedido algumas quinonas para análise.

ao Prof. Dr. Jay D. Wadhawan, da Universidade de Hull, pelos ensinamentos e pela ótima recepção em Hull na Inglaterra.

Um agradecimento especial à Profa. Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino, pelos ensinamentos, conselhos, discussões frutíferas e ótima companhia.

agradeço ao CNPq, à FAPEAL e à CAPES, pelo apoio financeiro, possibilitando assim a realização desse trabalho.

agradecimento especial a minha orientadora, Profa. Dra. Marília Goulart, pela orientação, pela paciência e conselhos dados em alguns momentos difíceis; agradeço também, pelo seu incentivo em ser mais independente, pelo apoio nas horas mais complicadas, pela grande torcida e orientações quando fiz o concurso para Professor do IFAL, e pelas oportunidades de estágios em outras universidades, pois, contribuíram muito para a minha formação.

RESUMO

Muitas quinonas têm sido associadas a uma grande variedade de atividades biológicas, incluindo atividades antitumorais, antimaláricas, larvicidas e antibacterianas. Embora existam muitos agentes clinicamente importantes contendo núcleo quinônico com excelente atividade anticâncer, muitas outras quinonas requerem testes para busca de atividades adicionais, como por exemplo: Oncocalixona A, Juglona, Biflorina e outras quinonas hidroxiladas e halogenadas. O DNA representa um dos principais alvos de compostos quinônicos, que, geralmente, pertencem aos grupos de intercaladores de DNA e/ou agentes alquilantes, e/ou inibidores de topoisomerases. Desta forma, o uso de biossensores de DNA ou outros métodos eletroquímicos baseados na investigação da interação entre ácidos nucléicos e compostos orgânicos, permitiria prever a ação biológica, e se estas estão relacionadas aos danos ao DNA. Devido à importância das quinonas, entre elas, Oncocalixona A, Juglona e Biflorina, análises eletroquímicas e eletroanalíticas para detecção em quantidades nanomolares, bem como a investigação da interação destas quinonas com o DNA foram realizadas, no presente trabalho. Utilizou-se uma série de métodos eletroquímicos, em diferentes condições, em meios aprótico e prótico, usando eletrodo de carbono vítreo, como eletrodo de trabalho, Ag/AgCl, como eletrodo de referência e fio de platina, como contra-eletrodo. O pKa da juglona foi determinado (5,98). O desenvolvimento de um sensor voltamétrico altamente sensível para oncocalixona A, usando eletrodo de carbono vítreo modificado com uma bicamada de ftalocianina tetrassulfonada de ferro(II) (FeTSPc) e tetra-(*N*-metil-4-piridil)-porfirina de ferro(III) (FeT₄MPyP) foi descrito. O eletrodo modificado mostrou atividade catalítica e estabilidade para a redução da oncocalixona A, proporcionando o deslocamento anódico do potencial de pico de redução de ca. 30 mV, apresentando correntes de pico maiores do que aquelas obtidas em eletrodo de carbono vítreo limpo. Uma faixa linear entre 0,005-1,2×10⁻⁶ mol L⁻¹, com uma sensibilidade de 8,11 μA L μmol⁻¹ e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) de 1,5 e 5,0×10⁻⁹ mol L⁻¹ foram obtidos com este sensor, respectivamente. A interação das quinonas escolhidas com ssDNA, ácido poliguanílico e ácido poliadenílico foi investigada usando análises voltamétricas, em solução. Juglona, oncocalixona e biflorina mostraram forte interação em relação ao DNA, representado experimentalmente pela diminuição da corrente de oxidação e deslocamento dos picos diagnósticos de guanina e adenina, bem como pelos valores das constantes de associação calculadas para o aduto formado. Algumas das quinonas não causaram qualquer mudança nos picos de oxidação das bases usadas, como foi o caso da α-lapachona, o que serviu como controle negativo, indispensável em relação a comparações com métodos farmacológicos. Estes resultados foram correlacionados positivamente com atividades biológicas/farmacológicas. Sensores de DNA são importantes ferramentas no mapeamento de compostos biologicamente ativos.

Palavras-Chave: Bioeletroquímica, Eletroanálise, DNA, Quinonas, Interação, Oncocalixona, Juglona, Biflorina, Biossensores, Química medicinal.

ABSTRACT

Many quinones have been associated with a wide range of biological activities, including antitumoral, antimalarial, larvicidal and antibacterial activities. Although, there are many clinically important agents containing a quinone nucleus with excellent anticancer activity, many other quinones require testing for additional activities, for instance: Oncocalyxone A, Juglone, Biflorin and some hydroxylated and halogenated quinones. DNA represents one of the main targets of biologically active quinonoid compounds, which, generally, belong to the group of DNA intercalating and/or alkylating agents, and/or topoisomerase inhibitors. As such, the use of DNA biosensors or other electrochemical methods based on the investigation of nucleic acid/organic compound interaction, would allow to predicting a biological action, if this one is related to damage to DNA. Due to the importance of quinones, for instance, Oncocalyxone A, Juglone and Biflorin, electrochemical analysis and the development of a new electroanalytical method for detection in nanomolar quantities, together with DNA interaction analysis with those quinones was therein performed. We have used diverse electrochemical methods performed in protic and aprotic media, using glassy carbon electrode, Ag/AgCl electrode as reference and platinum wire as counter electrode. The pKa of juglone was determined (5.98). The development of a highly sensitive voltammetric sensor for oncocalyxone A using a glassy carbon electrode modified with a bilayer iron(II) tetrasulfonated phthalocyanine (FeTSPc) and iron(III) tetra-(*N*-methyl-4-pyridyl)-porphyrin (FeT₄MPyP) was described. The modified electrode showed catalytic activity and stability for the oncocalyxone A reduction, provoking the anodic shift of the reduction peak potentials of *ca.* 30 mV and presenting much higher peak currents than those obtained on the bare GC electrode. A wide linear response range between 0.005-1.2×10⁻⁶ mol L⁻¹, with a sensitivity of 8.11 μA L μmol⁻¹ and limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of 1.5 and 5.0×10⁻⁹ mol L⁻¹ were obtained with this sensor, respectively. The interaction of chosen quinones with ssDNA, poly-guanilic and poly-adenilic acid was investigated, using voltammetric analysis, in solution. The DNA interaction investigation with juglone, oncocalyxone and biflorin had shown significant DNA activity, represented by the decrease of oxidation current and shift of oxidation peaks of guanine and adenine and the binding constant values obtained for these adducts; these observations could be related to Michael addition reaction, among other possible effects. Some of the quinones do not cause any change on the oxidation peaks of the used bases, as is the case of α-lapachone, being used as negative control. These results, upon comparison with biological/ pharmacological activities, show correlation and indicate electrochemistry and DNA sensors as important tools in the screening of biologically active compounds.

Keywords: Bioelectrochemistry, Electroanalysis, DNA, Quinones, Interaction, Oncocalyxone, Juglone, Biflorin, Biosensors, Medicinal Chemistry.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação dos processos de (a) redução e (b) oxidação de uma espécie A, em solução. Os orbitais moleculares (OM) das espécies A mostrados são o OM ocupado de mais alta energia (HOMO) e o OM vazio de mais baixa energia (LUMO)..... 34
- Figura 2. Formas de aplicação de potencial para a voltametria cíclica: a) potencial com varredura linear e b) potencial do tipo escada (staircase). 39
- Figura 3. Voltamograma cíclico, descrito por Nicholson, detalhando as correntes de pico em relação à corrente zero..... 40
- Figura 4. Representação esquemática da aplicação do potencial em função do tempo em VPD, tanto para instrumentos analógicos (a) quanto para instrumentos digitais (b). Amostragem da corrente em S_1 e S_2 , sendo registrada a diferença entre essas correntes. 42
- Figura 5. Perfil corrente-potencial esquemático para VPD. 43
- Figura 6. Esquema básico para a voltametria de onda quadrada. 44
- Figura 7. Seqüência potencial vs. tempo (E vs. t) usada em VOQ. Parâmetros tempo e potencial aplicados em voltametria de onda quadrada, onde: τ = tempo de um ciclo de onda quadrada; $1/\tau$ = freqüência da onda quadrada em Hz; E_{sw} = amplitude de pulso da onda quadrada (em mV); E_{step} (E_{salto} ou "step potential") = potencial (em mV) de salto de rampa de potencial em degraus sendo $2E_{sw}$ a amplitude de pico a pico da onda quadrada (em mV). 45
- Figura 8. Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada onde: 1) representa um processo redox de um sistema reversível e 2) de um sistema irreversível. 46
- Figura 9. Sumário dos potenciais mecanismos moleculares citotóxicos para quinonas, com destaque para a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) importante na via de oxidação do DNA, e o papel da glutathiona (GSH) e de NAD(P)H:quinona oxidoreductase (NQO1) nas vias de detoxificação celular por meio de eliminação de derivados quinônicos tóxicos (hidroquinonas). 50
- Figura 10. Vias de formação de EROs, o processo de peroxidação lipídica e o papel da glutathiona (GSH) e outros antioxidantes (Vitamina E, Vitamina C, ácido lipóico) na manutenção do estresse oxidativo. Reação 1: formação do ânion radical superóxido pelo processo de redução de

oxigênio molecular mediado por NAD(P)H e xantina oxidase ou por compostos reativos redox, como o composto semi-ubiquinona da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. Reação 2: transformação do radical superóxido pela superóxido dismutase (SOD) a H_2O_2 . Reação 3: seqüestro de peróxido de hidrogênio pela enzima glutatona peroxidase (GPx) com GSH como doador de elétrons. Reação 4: redução da glutatona oxidada (GSSG) a GSH pela enzima glutatona redutase (Gred) com uso de NADPH como doador de elétrons. Reação 5: Reação de Fenton pela quebra do peróxido de hidrogênio a radical hidroxila reativo por meio de alguns metais de transição (Fe^{2+} , Cu^+ , entre outros). Reação 6: geração de um radical lipídico (L^{\cdot}) pela abstração de um elétron de um ácido graxo poli-insaturado (LH)O pelo radical hidroxila. Reação 7: interação do radical lipídico (L^{\cdot}) com oxigênio molecular para geração de um radical peroxil lipídico (LOO^{\cdot}). A não redução do radical peroxil lipídico (LOO^{\cdot}) por antioxidantes leva ao processo de peroxidação lipídica (reações 18-23 e 15-17). Reação 8: redução do radical peroxil lipídico (LOO^{\cdot}) dentro da membrana pela forma reduzida da vitamina E (T-OH) resultando na formação do hidroperóxido lipídico e um radical da vitamina E (T-O \cdot). Reação 9: regeneração da vitamina E pela vitamina C, onde o radical da vitamina E (T-O \cdot) é reduzido de volta a vitamina E (T-OH) pelo ácido ascórbico (a forma fisiológica do ascorbato é o monoânion ascorbato, $AscH^-$) deixando pra trás o radical ascorbil ($Asc^{\cdot-}$). Reação 10: regeneração da vitamina E por GSH, onde o radical da vitamina E oxidada (T-O \cdot) é reduzido por GSH. Reação 11: glutatona oxidada (GSSG) e o radical ascorbil ($Asc^{\cdot-}$) são reduzidos de volta a GSH e monoânion ascorbato, $AscH^-$, respectivamente, pelo ácido dihidrolipóico (DHHLA) que é convertido por ele mesmo a ácido α -lipóico (ALA). Reação 12: regeneração de DHHLA a partir de ALA usando NADPH. Reação 13: hidropoxidases lipídicas são reduzidas a alcoóis e dioxigênio por GPx usando GSH como doador de elétron. *Processo de peroxidação lipídica*: Reação 14: reação rápida de hidroperóxidos lipídicos com Fe^{2+} para formação de radicais alcoxilas lipídicos (LO^{\cdot}), ou lenta com Fe^{3+} para formação de radicais peroxil (LOO^{\cdot}). Reação 15: radical alcoxila lipídico (LO^{\cdot}), derivado do ácido aracdônico, conduz reação de ciclização para formar um anel hidroperóxido de seis membros. Reação 16: anel hidroperóxido de seis membros conduz mais reações (envolvendo cisões β) para formar 4-hidroxi-nonenal. Reação 17: 4-hidroxi-nonenal se torna num aduto inócuo glutatiila (GST, glutatona S-transferase). Reação 18: Um radical peroxil localizado na posição interna do ácido graxo pode reagir por ciclização para produzir um peróxido cíclico adjacente a um radical carbono-centrado. Reação 19: Este radical pode então tanto ser reduzido para formar um hidroperóxido ou pode conduzir a uma segunda ciclização para formar um peróxido bicíclico que depois se junta ao dioxigênio e a redução rende uma molécula estruturalmente análoga ao endoperóxido. Reação 20: o composto formado é um produto intermediário para a produção de malondialdeído. Reações 21, 22 e 23: malondialdeído pode reagir com as bases do DNA, Citosina, Adenina e Guanina para formar adutos M1C, M1A e M1G, respectivamente..... 51

Figura 11. Exemplos de produtos mutagênicos gerados a partir da peroxidação lipídica por meio da reação do malondialdeído (MDA) com as bases guanina, adenina e citosina na formação dos adutos M ₁ G, M ₁ A e M ₁ C.	54
Figura 12. Representação esquemática de mecanismos pelos quais pró-drogas ativadas por biorredução exercem suas atividades farmacológicas por meio da ativação seletiva em hipóxia ou ativação em condições normais, com geração do estresse oxidativo.	55
Figura 13. Plumbagina, naftoquinona derivada da planta <i>Plumbago zeylanica</i>	57
Figura 14. Atuação de quinonas na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e destoxificação, pelo emprego de catalase e superóxido-dismutase (SOD).	57
Figura 15. <i>Auxemma oncocalyx</i>	59
Figura 16. Oncocalixona A (<i>rel-8α</i> -Hidroxi-5-hidroximetil-2-metoxi-8aβ-metil-7,8,8a,9-tetraidro-1,4-antracenediona).	60
Figura 17. Juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona).	61
Figura 18. Família Juglandaceae (<i>Juglans regia</i> L.).	62
Figura 19. Mudanças morfológicas induzidas por juglona determinadas pelo corante acridina laranja/brometo de etídio. a) controle mostrando células vivas (V) b) 5,0×10 ⁻³ mol L ⁻¹ de Juglona por 12 h mostrou células com apoptose inicial (AI) bem como baixa porcentagem de células necróticas (N) c) 10×10 ⁻³ mol L ⁻¹ de Juglona por 12 h mostrou alta porcentagem de células com apoptose final (AF) e necróticas (N) bem como células com apoptose inicial (AI).	63
Figura 20. Biflorina (6,9-dimetil-3-(4-metil-3-pentenil)nafta[1,8- <i>bc</i>]-piran-7,8-diona).	64
Figura 21. Potencial de redução de pares redox dependentes do pH em função do pH. Duas espécies com diferentes valores de pK _a mas com mesmo potencial de semi-reação em condições-padrão.	67
Figura 22. Principais enfoques analíticos e estratégias no desenvolvimento de EQM's.	69
Figura 23. Princípio de atuação de um mediador redox imobilizado à superfície de um EQM usado para eletrocatalise. (a) Processo de redução, MO – Mediador Oxidado, MR – Mediador Reduzido, SO – Substrato Oxidado, PR – Produto Reduzido.	70

Figura 24. Plano basal (plano da folha) e plano vertical (plano perpendicular à folha) da superfície do eletrodo de carbono.....	71
Figura 25. Ftalocianina: $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$, ftalocianina tetrassulfonada: $R_1 = R_2 = R_4 = H$ e $R_3 = SO_3^-$, M = Cobalto, Níquel, Ferro ou Cobre.....	72
Figura 26. Representação estrutural de Co(TRP), Zn(TPPS) e do seu respectivo par iônico.....	73
Figura 27. DNA em dupla fita (double-strand DNA) com representação detalhada do interior hidrofóbico do DNA destacando as fitas formadas pelos nucleotídeos interligados e suas respectivas bases.....	74
Figura 28. Classes de agentes DNA-interativos e suas interações moleculares com DNA. a) Linha do tempo para a descoberta e evolução de agentes DNA-interativos até o presente. b) Ilustração dos tipos de modificação que podem se formar no DNA, incluindo ligações cruzadas, intercalação, clivagem da fita do DNA, e moléculas leitoras de códigos genéticos. A hélice do DNA é também mostrada associada com proteínas, como a topoisomerase II, e com estruturas secundárias do DNA (guanina-quádrupla). c) Detalhes dos modelos, mostrando os diferentes tipos de modificação do DNA.....	75
Figura 29. Constituintes de um biossensor analítico.....	76
Figura 30. Modo de atuação do biossensor de DNA. O analito se insere entre as fitas do DNA modificando sua conformação levando a exposição das bases, que por sua vez, serão passíveis de oxidação anódica.....	77
Figura 31. Representação esquemática da desnaturação por aquecimento do DNA fita-dupla (dsDNA) para formação do DNA fita-simples (ssDNA).....	79
Figura 32. Mecanismo de oxidação para a Guanina (A) e Adenina (B). (C) Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para uma mistura equimolar com $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de guanina, adenina, timina e citosina em tampão fosfato, pH 7,4, em eletrodo de carbono vítreo.	80
Figura 33. Oxidação da guanina na presença de radicais hidroxilas.....	81
Figura 34. A) Ácido Adenílico (Adenosina Monofosfato - AMP). B) Ácido Guanílico (Guanosina Monofosfato - GMP).....	81
Figura 35. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de guanosina-5-monofosfato (GMP), $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de adenosina-5-monofosfato (AMP),	

5,0×10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de timidina-5-monofosfato (TMP) e 5,0×10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de citidina-5-monofosfato (CMP). Tampão fosfato, pH 7,4, em eletrodo de carbono vítreo pré-condicionado.	82
Figura 36. Esquema de um sensor de DNA usando o método sanduíche. Um eletrodo modificado com ssDNA é hibridizado com uma sequência do DNA-alvo (passo 1) e então um DNA sinalizador marcado é adicionado (passo 2). A presença da probe redox na superfície do eletrodo serve para formar a ligação com o DNA-alvo. MCH (6-mercaptop-1-hexanol) serve para reduzir a adsorção não-específica.....	83
Figura 37. Esquema representativo da cela eletroquímica e dos eletrodos utilizados.....	90
Figura 38. Ftalocianina Tetrassulfonada de Ferro(II) (FeTSPc).	97
Figura 39. tetra-(<i>N</i> -metil-4-piridil)-porfirina de Ferro(III) (FeT ₄ MPyP).	97
Figura 40. Bioensaios realizados para análise da atividade moluscicida contra <i>Biomphalaria glabrata</i> , com destaques para caramujos com hemorragia.	104
Figura 41. Larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	105
Figura 42. Voltamograma cíclico da oncoalixona, na concentração de 1,0×10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ , a 100 mV s ⁻¹ , em meio aprótico, DMF/TBABF ₄ (0,1 mol L ⁻¹) vs. Ag AgCl Cl ⁻ (0,1 mol L ⁻¹). Eletrodo de trabalho: carbono vítreo.	108
Figura 43. Análise da variação da velocidade de varredura em VC da oncoalixona, em meio aprótico, DMF/TBABF ₄ (0,1 mol L ⁻¹) vs. Ag AgCl Cl ⁻ (0,1 mol L ⁻¹). Velocidades analisadas: (♦) 10, (♦) 20, (♦) 30, (♦) 35, (♦) 50, (♦) 70, (♦) 75, (♦) 100, (♦) 200, (♦) 300, (♦) 400 e (♦) 500 mV s ⁻¹ . Eletrodo de trabalho: carbono vítreo.	109
Figura 44. Gráficos representativos do comportamento voltamétrico (VC) da oncoalixona com ênfase na dependência da corrente de pico com o aumento da velocidade de varredura (I _p vs. v ^{1/2}), r: 0,9963 (A) e na dependência do potencial com aumento linear da velocidade (E _p vs. log v) (B). Meio aprótico, DMF/TBABF ₄ (0,1 mol L ⁻¹) vs. Ag AgCl Cl ⁻ (0,1 mol L ⁻¹), eletrodo de trabalho: carbono vítreo.	110
Figura 45. Voltamograma cíclico da oncoalixona, na concentração de 1,0×10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ , a 50 mV s ⁻¹ , em meio aquoso misto, tampão fosfato etanólico (20%, v/v), pH 7,0. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo.	111

- Figura 46. Análise da velocidade de varredura em VC da oncocalexona, em meio prótico, tampão fosfato/etanol, (20 %), pH 7,0. Velocidades analisadas: (♦) 10, (♦) 20, (♦) 30, (♦) 35, (♦) 50, (♦) 70, (♦) 75, (♦) 100, (♦) 200, (♦) 300, (♦) 400 e (♦) 500 mV s^{-1} . Eletrodo de trabalho: carbono vítreo..... 112
- Figura 47. Gráficos representativos do comportamento voltamétrico (VC) da oncocalexona com ênfase na dependência da corrente de pico com o aumento da velocidade de varredura ($I_{p_{cl}}$ vs. $v^{1/2}$), r : 0,9974 (A) e na dependência do potencial com aumento linear da velocidade ($E_{p_{cl}}$ vs. $\log v$) (B). Meio prótico, tampão fosfato etanólico (20%, v/v), pH 7,0, vs. Ag|AgCl|Cl^- ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), eletrodo de trabalho: carbono vítreo..... 113
- Figura 48. Voltamogramas cíclicos em eletrodo de carbono vítreo (Cv) não modificado na ausência (a) e presença (b) de oncocalexona ($5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), em eletrodo de Cv modificado com uma única camada de FeTSPc na presença de oncocalexona (c) e uma camada de FeT₄MPyP na presença de oncocalexona (e). Para comparação, voltamogramas cíclicos para o eletrodo de Cv modificado com uma bicamada de FeTSPc/FeT₄MPyP na ausência (d) e presença (f) de oncocalexona, em tampão fosfato, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Velocidade de varredura: $0,025 \text{ V s}^{-1}$. 115
- Figura 49. Influência do pH na resposta do sensor para a redução da oncocalexona ($3,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) em VOQ. Análises conduzidas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Potencial de salto: $0,002 \text{ V}$, f : 80 Hz e α : $0,03 \text{ V}$, $n = 3$ 118
- Figura 50. Influência da solução tampão na resposta do sensor para redução da oncocalexona ($3,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$), em VOQ. Análises realizadas em solução tampão $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. Potencial de salto: $0,002 \text{ V}$, f : 80 Hz e α : $0,03 \text{ V}$, $n = 3$ 119
- Figura 51. Influência da concentração de tampão fosfato, pH 7,0, sobre a corrente de pico obtida por VOQ com o sensor para oncocalexona ($3,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$). Potencial de salto: $0,002 \text{ V}$, f : 80 Hz e α : $0,03 \text{ V}$, $n = 3$ 120
- Figura 52. Variação da corrente de pico em relação à frequência utilizada para a redução da oncocalexona, em VOQ, com amplitude fixa em $0,03 \text{ V}$. Eletrodo de Cv modificado com uma bicamada de FeTSPC/FeT₄MPyP em tampão fosfato ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0). Potencial de salto: $0,002 \text{ V}$, $n = 3$ 121
- Figura 53. Variação da corrente de pico em relação à amplitude de pulso utilizada para a redução da oncocalexona, em VOQ, com frequência fixa em 100 Hz. Eletrodo de Cv modificado com uma bicamada de FeTSPC/FeT₄MPyP em tampão fosfato ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0). Potencial de salto: $0,002 \text{ V}$, $n = 3$ 122

- Figura 54. VOQ para a eletrorredução da Oncocalixona utilizando eletrodo de Cv modificado com uma bicamada de FeTSPC/FeT₄MPyP em tampão fosfato (0,05 mol L⁻¹, pH 7,0), obtida em condições otimizadas para a faixa de concentração de (1) 0,005, (2) 0,044, (3) 0,098, (4) 0,198, (5) 0,299, (6) 0,503, (7) 0,704, e (8) 1,2×10⁻⁶ mol L⁻¹. Potencial de salto: 0,002 V, *f*: 100 Hz e *α*: 0,05 V. 123
- Figura 55. Curva analítica obtida, em VOQ, para a determinação da oncocalixona utilizando eletrodo de Cv modificado com uma bicamada de FeTSPC/FeT₄MPyP sob condições otimizadas, nas concentrações descritas na Figura 54. Tampão fosfato (0,05 mol L⁻¹, pH 7,0), potencial de salto: 0,002 V, *f*: 100 Hz e *α*: 0,05 V, *n* = 3. 124
- Figura 56. Densidade dos spins de elétrons desemparelhados do ânion-radical da oncocalixona. ... 126
- Figura 57. Espectros de ESR para o ânion-radical da oncocalixona: experimental (A), simulado (B) e sobreposto (C). 127
- Figura 58. Voltamograma de pulso diferencial com correção de linha de base (*v* = 0,010 V s⁻¹) de uma solução de ssDNA em tampão acetato etanólico, 20% (v/v), pH 4,5, em eletrodo de carbono vítreo. ES = eletrólito suporte, G = Guanina, A = Adenina. 128
- Figura 59. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para o ssDNA (♦), 0,3 g L⁻¹, [tampão acetato etanólico, (20 %, v/v), pH 4,5] em presença de 10 (♦), 20 (♦), 40 (♦), 60 (♦), 80 (♦), 100 (♦), 200 (♦) e 400 (♦) ×10⁻⁶ mol L⁻¹ de oncocalixona. Para comparação, oncocalixona, *c* = 40×10⁻⁶ mol L⁻¹, em ausência de ssDNA foi analisada (♦). Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹) e contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,010 V s⁻¹. 129
- Figura 60. Dependência da corrente de pico anódico (*I_p*) da base guanina, do ssDNA, em relação a concentração de oncocalixona. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹) e contra-eletrodo: fio de platina, *r*: 0,9785. 130
- Figura 61. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para 1,0×10⁻⁴ mol L⁻¹ de Guanina (♦) [tampão acetato etanólico (20 %, v/v), pH 4,5] em presença de 10 (♦), 20 (♦), 40 (♦), 60 (♦), 80 (♦), 100 (♦), 200 (♦) e 400 (♦) ×10⁻⁶ mol L⁻¹ de oncocalixona. Para comparação, 40×10⁻⁶ mol L⁻¹ de oncocalixona foi analisado na ausência de guanina (♦). Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹) e contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,010Vs⁻¹. 132
- Figura 62. Dependência da corrente de pico anódico (*I_p*) da base guanina, em relação à concentração de oncocalixona. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹) e contra-eletrodo: fio de platina. 133

- Figura 63. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para o poliA (♦) [tampão acetato etanólico (20%, v/v), pH 4,5] em presença de 10 (♦), 20 (♦), 40 (♦), 60 (♦), 80 (♦), 100 (♦) e 200 (♦) $\times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de onocalixona. Para comparação, $4,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de onocalixona na ausência de poliA foi analisada (♦). Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹) e contra-eletródo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,010 V s⁻¹..... 134
- Figura 64. Dependência da corrente de pico anódico (I_p) da base adenina do poliA, em relação à concentração de onocalixona. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹) e contra-eletródo: fio de platina. 135
- Figura 65. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para o ssDNA (♦) [tampão acetato etanólico (20%, v/v), pH 4,5] em presença de 10 (♦), 20 (♦), 40 (♦), 60 (♦), 80 (♦), 100 (♦), 200 (♦) e 400 (♦) $\times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de α -Lapachona. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹) e contra-eletródo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,010 V s⁻¹..... 136
- Figura 66. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de onocalixona (♦) [tampão acetato etanólico (20%, v/v), pH 4,5] em presença de 0,003 (♦), 0,006 (♦), 0,011 (♦), 0,016 (♦), 0,022 (♦), 0,027 (♦) e 0,050 (♦) g L⁻¹ de ssDNA. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, velocidade de varredura: 0,010 V s⁻¹. 137
- Figura 67. Gráfico do $\log(I_{\text{DNA-Onco}}/I_{\text{Onco-I}_{\text{DNA-Onco}}})$ vs. $\log(1/[DNA])$ usado para calcular a constante de associação do complexo DNA-Onocalixona. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, coef. linear: 1,8015, coef. angular: 1,4491, r : 0,9796..... 138
- Figura 68. Voltamograma cíclico para biflorina $c = 1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ a 100 mV s⁻¹. Meio: tampão acetato etanólico (40%, v/v), pH 4,5. Eletrodo de trabalho: Cv, referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹), contra-eletródo: fio de platina. 139
- Figura 69. Voltamogramas cíclicos da biflorina com variação da velocidade de varredura, em tampão acetato etanólico (40%, v/v), pH 4,5. Velocidades analisadas: 10 (♦), 35 (♦), 50 (♦), 100 (♦), 200 (♦), 300 (♦), 400 (♦), 500 (♦), 750 (♦) e 1000 (♦) mV s⁻¹. Concentração da biflorina na cela eletroquímica: $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹), contra-eletródo: fio de platina. 140
- Figura 70. Gráficos representativos do comportamento voltamétrico (VC) da biflorina com ênfase na dependência da corrente de pico com o aumento da velocidade de varredura ($I_{p,c}$ vs. $v^{1/2}$), r :

- 0,9772 (A) e na dependência do potencial com aumento linear da velocidade ($E_{p,c}$ vs. $\log v$) (B). Meio prático, tampão acetato etanólico (40%, v/v), pH 4,5, vs. $Ag|AgCl|Cl^-$ (0,1 mol L⁻¹), eletrodo de trabalho: carbono vítreo..... 141
- Figura 71. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para o ssDNA (♦) [tampão acetato etanólico, (40%, v/v), pH 4,5] em presença de 10 (♦), 20 (♦), 60 (♦), 100 (♦) e 200 (♦) $\times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de Biflorina. Para comparação, 100×10^{-6} mol L⁻¹ de biflorina em ausência de ssDNA foi analisada (♦). Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: $Ag|AgCl|Cl^-$ (0,1 mol L⁻¹) e contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,010 V s⁻¹..... 142
- Figura 72. Dependência da corrente de pico anódica (I_p) da base guanina, no ssDNA, em relação à concentração de biflorina em solução. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: $Ag|AgCl|Cl^-$ (0,1 mol L⁻¹) e contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,010 V s⁻¹. 143
- Figura 73. Dependência dos potenciais de pico anódico (E_p) de Guanina e Adenina, no ssDNA, em relação à concentração de biflorina, obtida por VPD. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: $Ag|AgCl|Cl^-$ (0,1 mol L⁻¹), contra-eletrodo: fio de platina e velocidade de varredura: 0,010 V s⁻¹..... 144
- Figura 74. Voltamogramas com correção de linha de base para $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de Guanina (♦) [tampão acetato etanólico (40%, v/v), pH 4,5] em presença de 10 (♦), 20 (♦), 60 (♦), 100 (♦) e 200 (♦) $\times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de biflorina. Para comparação, 100×10^{-6} mol L⁻¹ de biflorina em ausência de guanina foi analisada (♦). Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: $Ag|AgCl|Cl^-$ (0,1 mol L⁻¹) e contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,010 V s⁻¹..... 145
- Figura 75. Dependência da corrente de pico anódica (I_p) da guanina, em relação à concentração de biflorina em solução. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: $Ag|AgCl|Cl^-$ (0,1 mol L⁻¹) e contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,010 V s⁻¹..... 146
- Figura 76. Dependência do potencial de pico anódico (E_p) da guanina em relação à concentração de biflorina, obtida por VPD. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: $Ag|AgCl|Cl^-$ (0,1 mol L⁻¹) e contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,010 V s⁻¹. 146
- Figura 77. Voltamogramas com correção de linha de base para $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de Adenina (♦) [tampão acetato etanólico (40%, v/v), pH 4,5] em presença de 10 (♦), 20 (♦), 40 (♦), 100 (♦) e 200 (♦) $\times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de biflorina. Para comparação, análise de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de biflorina em ausência de adenina (♦). Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: $Ag|AgCl|Cl^-$ (0,1 mol L⁻¹) e contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,010 V s⁻¹. 147

- Figura 78. Dependência do potencial de pico anódico (E_p) da adenina em relação à concentração de biflorina, obtido em VPD. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo. Referência: $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{Cl}^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: $0,010 \text{ V s}^{-1}$ 148
- Figura 79. Voltamogramas com correção de linha de base para o ácido poliG (\blacklozenge) [tampão acetato etanólico (40%, v/v), pH 4,5] em presença de 10 (\blacklozenge), 20 (\blacklozenge), 40 (\blacklozenge), 60 (\blacklozenge), 100 (\blacklozenge) e 200 (\blacklozenge) $\times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de biflorina. Para comparação, biflorina na ausência de poliG foi conduzida na concentração de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (\blacklozenge). 149
- Figura 80. Dependência do potencial de pico anódico (E_p) da base guanina, presente no poliG, em relação a concentração de biflorina, obtido em VPD. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo. Referência: $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{Cl}^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: $0,010 \text{ V s}^{-1}$ 150
- Figura 81. Voltamogramas com correção de linha de base para o ácido poliA (\blacklozenge) [tampão acetato etanólico (40%, v/v), pH 4,5] em presença de 10 (\blacklozenge), 20 (\blacklozenge), 40 (\blacklozenge), 60 (\blacklozenge), 100 (\blacklozenge) e 200 (\blacklozenge) $\times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de biflorina. Para comparação, biflorina na ausência de poliA foi analisada na concentração de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (\blacklozenge). 151
- Figura 82. Dependência da corrente de pico anódica (I_p) da base adenina, presente no ácido poliA, em relação à concentração de biflorina em solução. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{Cl}^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: $0,010 \text{ V s}^{-1}$ 151
- Figura 83. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de biflorina (\blacklozenge) [tampão acetato etanólico (40%, v/v), pH 4,5] em presença de $0,006$ (\blacklozenge), $0,016$ (\blacklozenge), $0,050$ (\blacklozenge), $0,070$ (\blacklozenge) e $0,085$ (\blacklozenge) g L^{-1} de ssDNA. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, Velocidade de varredura: $0,010 \text{ V s}^{-1}$ 153
- Figura 84. Gráfico do $\log(I_{\text{DNA-BFL}}/I_{\text{BFL}} - I_{\text{DNA-BFL}})$ vs. $\log(1/[\text{DNA}])$ usado para calcular a constante de associação do complexo DNA- Biflorina. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, coef. linear: $1,5722$, coef. angular: $0,6303$, r : $0,9911$ 154
- Figura 85. Voltamograma cíclico da juglona $c = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Meio: tampão acetato etanólico (20%, v/v), pH 7,0. Velocidade de varredura: $0,1 \text{ V s}^{-1}$, eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{Cl}^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). 155
- Figura 86. Voltamograma de pulso diferencial, com correção de linha de base, para a oxidação da juglona ($2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em meio prótico, tampão acetato etanólico (20%, v/v) pH 4,5.

Amplitude de pulso: 0,05 V, velocidade de varredura: 0,01 V s ⁻¹ , eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag AgCl Cl ⁻ (0,1 mol L ⁻¹).....	156
Figura 87. Voltamogramas de pulso diferencial para 1,0 ×10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de juglona em função do pH da solução. Valores de pH analisados: 0,8 (♦), 2,5 (♦), 3,22 (♦), 3,85 (♦), 4,83 (♦), 6,85 (♦), 7,96 (♦), 9,18 (♦), 10,06 (♦) e 12,36 (♦). Meio: tampão fosfato etanólico (20%, v/v). Amplitude de pulso: 0,05 V, velocidade de varredura: 0,005 V s ⁻¹ , eletrodo de referência: Ag AgCl Cl ⁻ (0,1 mol L ⁻¹), contra-eletrodo: fio de platina.....	157
Figura 88. Gráfico de Ep vs. pH para os potenciais de pico obtidos para a redução da juglona em voltametria de pulso diferencial. Meio: tampão fosfato etanólico (20%, v/v).	158
Figura 89. Representação esquemática para o equilíbrio ácido-base do grupo fenolato da juglona.	158
Figura 90. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para o ssDNA (♦) [tampão acetato etanólico (20%, v/v), pH 4,5] em presença de 10 (♦), 60 (♦), 100 (♦), 200 (♦) e 400 (♦) ×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de juglona (J). Para comparação, juglona em ausência de ssDNA foi conduzido na concentração de 2,0×10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ (♦) em solução tampão. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag AgCl Cl ⁻ (0,1 mol L ⁻¹), contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,01 Vs ⁻¹	159
Figura 91. Dependência da corrente de pico anódica (I _p) da base guanina (do ssDNA) em relação à concentração da juglona, em VPD. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag AgCl Cl ⁻ (0,1 mol L ⁻¹), contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,01 V s ⁻¹	160
Figura 92. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para 1,0 ×10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ da guanina (♦) [tampão acetato etanólico (20%, v/v), pH 4,5] em presença de 10 (♦), 20 (♦), 40 (♦), 60 (♦), 80 (♦), 100 (♦), 200 (♦) e 400 (♦) ×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de juglona. Para comparação, juglona em ausência de guanina foi analisada na concentração de 4,0 ×10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ (♦). Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag AgCl Cl ⁻ (0,1 mol L ⁻¹), contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,01 V s ⁻¹	161
Figura 93. Dependência da corrente de pico anódica (I _p) da base guanina em relação à concentração da juglona, em VPD. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag AgCl Cl ⁻ (0,1 mol L ⁻¹), contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,01 V s ⁻¹	161
Figura 94. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para 1,0 ×10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ da de Adenina (♦) [tampão acetato etanólico (20%, v/v), pH 4,5] em presença de 10 (♦), 20 (♦), 40 (♦), 60 (♦), 80 (♦), 100 (♦), 200 (♦) e 400 (♦) ×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de juglona. Para comparação,	

juglona em ausência de adenina foi analisada na concentração de $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (♦). Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{Cl}^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: $0,01 \text{ V s}^{-1}$ 162

Figura 95. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para o poliA (♦) [tampão acetato etanólico (20%, v/v), pH 4,5] em presença de 10 (♦), 20 (♦), 40 (♦), 60 (♦), 100 (♦) e 200 (♦) $\times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de juglona. Para comparação, juglona em ausência de adenina foi analisada na concentração de $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (♦). Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{Cl}^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: $0,01 \text{ V s}^{-1}$ 163

Figura 96. Dependência da corrente de pico anódica (I_p) da base adenina, do poliA, em relação a concentração da juglona, em VPD. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{Cl}^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: $0,01 \text{ V s}^{-1}$ 164

Figura 97. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de juglona (♦) [tampão acetato etanólico (20%, v/v), pH 4,5] em presença de $0,003$ (♦), $0,011$ (♦), $0,027$ (♦), $0,05$ (♦), $0,07$ (♦) e $0,085$ (♦) g L^{-1} de ssDNA. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{Cl}^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: $0,01 \text{ V s}^{-1}$ 165

Figura 98. Gráfico do $\log(I_{\text{DNA-Jug}}/I_{\text{Jug}} - I_{\text{DNA-Jug}})$ vs. $\log(1/[\text{DNA}])$ usado para calcular a constante de associação do complexo DNA-Juglona. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, coef. linear: 1,3547, coef. angular: 1,1805, r : 0,9948..... 166

Figura 99. A) Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de α -Lapachona (♦) [tampão acetato etanólico (20%, v/v), pH 4,5] em presença de $0,006$ (♦), $0,011$ (♦), $0,016$ (♦), $0,022$ (♦), $0,027$ (♦) $0,050$ (♦) e $0,070$ (♦) g L^{-1} de ssDNA. B) Gráfico do $\log(I_{\text{DNA-}\alpha\text{-Lap}}/I_{\alpha\text{-Lap}} - I_{\text{DNA-}\alpha\text{-Lap}})$ vs. $\log(1/[\text{DNA}])$ usado para calcular a constante de associação do complexo DNA- α -Lapachona. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{Cl}^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: $0,01 \text{ V s}^{-1}$, coef. linear: 0,98394, coef. angular: 0,45219, r : 0,95628. 167

Figura 100. A) Voltamogramas Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de Doxorubicina (♦) [tampão acetato etanólico (20%, v/v), pH 4,5] em presença de $0,006$ (♦), $0,011$ (♦), $0,016$ (♦), $0,022$ (♦), $0,027$ (♦) $0,050$ (♦) e $0,070$ (♦) g L^{-1} de ssDNA. B) Gráfico do $\log(I_{\text{DNA-Doxo}}/I_{\text{Doxo}} - I_{\text{DNA-Doxo}})$ vs. $\log(1/[\text{DNA}])$ usado para calcular a constante de associação do complexo DNA-Doxorubicina. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo,

referência: Ag AgCl Cl ⁻ (0,1 mol L ⁻¹), contra-eletródo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,01 V s ⁻¹ , coef. linear: 2,3601, coef. angular: 2,0155, r: 0,9803.	167
Figura 101. Voltamogramas de pulso diferencial para a redução das quinonas Q1 (♦), Q2 (♦), Q3 (♦), Q4 (♦), Q5 (♦), Q6 (♦), Q7 (♦) e Q9 (♦), na concentração de 4,76 × 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ [tampão fosfato etanólico (40%, v/v), pH 7,0]. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag AgCl Cl ⁻ (0,1 mol L ⁻¹), contra-eletródo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,005 V s ⁻¹	169
Figura 102. Voltamogramas cíclicos para a redução das quinonas Q1 (♦), Q2 (♦), Q3 (♦), Q4 (♦), Q5 (♦), Q6 (♦), Q7 (♦) e Q9 (♦), na concentração de 4,76×10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ [tampão fosfato etanólico (40%, v/v), pH 7,0]. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag AgCl Cl ⁻ (0,1 mol L ⁻¹) e contra-eletródo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,1 V s ⁻¹	170
Figura 103. Relação entre potenciais de pico catódico (E _{plc}) e concentração letal (CL ₉₀) em relação à atividade moluscicida obtida para cada quinona.....	172
Figura 104. Relação entre potenciais de pico catódicos (E _{plc}) e concentração letal (CL ₉₀) em relação a atividade larvicida obtida para cada quinona.	172
Figura 105. Relação da atividade citotóxica da juglona e derivados em diferentes linhagens de células (concentração inibitória, CI ₅₀) e sua correlação com os potenciais de pico catódicos (E _{plc}) das quinonas em questão.	174

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sumário dos estudos realizados com as quinonas no presente trabalho.	32
Tabela 2. Representação Esquemática do Potencial Aplicado e dos Processos Resultantes em Voltametria Cíclica (Adaptado de Bard e Faulkner, 2001; Greef <i>et al.</i> , 1985).....	38
Tabela 3. Testes diagnósticos em VC para processos reversíveis (a), irreversíveis (b) e quase-reversíveis (c) (Adaptado de Greef <i>et al.</i> , 1985).	41
Tabela 4. Atividades larvicidas (contra <i>A. aegypti</i>) e moluscidas (contra <i>B. glabrata</i>) de alguns derivados quinônicos (Ribeiro <i>et al.</i> , 2009). DL ₅₀ : dose letal com 50% de mortes, DL ₉₀ : dose letal com 90% de mortes.....	65
Tabela 5. Atividades citotóxicas da juglona e seus derivados, em relação a linhagens de células tumorais em relação a células mononucleares de sangue periférico e eritrócitos (Montenegro <i>et al.</i> 2010). CI: concentração inibitória, CE: concentração efetiva, Nd: não determinado.....	66
Tabela 6. Vantagens e desvantagens de diferentes tipos de biossensores baseados em DNA (Suman e Kumar, 2008).	78
Tabela 7. Comparações dos limites de detecção para diferentes técnicas eletroquímicas através do uso de sensores de DNA.....	84
Tabela 8. Estruturas de algumas quinonas analisadas no presente trabalho.	89
Tabela 9. Preparo do tampão fosfato (Adaptado de Perrin, 1974; Christian, 2004).....	102
Tabela 10: Influência das concentrações de FeTSPc e FeT ₄ MPyP, usadas para a preparação do filme, sobre a corrente de pico obtida com o sensor para oncoicalixona ($3,0 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹) em solução de tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹), pH 7,0, em VOQ, ($n = 3$).....	117
Tabela 11. Constantes de acoplamento hiperfinas para o ânion-radical da oncoicalixona.	125
Tabela 12. Constantes de associação com DNA para algumas substâncias analisadas.	168
Tabela 13. Atividades larvicidas (contra <i>A. aegypti</i>) e moluscidas (contra <i>B. glabrata</i>) das quinonas.	171

Tabela 14. Atividades citotóxicas da juglona e seus derivados (Montenegro *et al.* 2010) e a correlação com os potenciais de redução dessas quinonas. CI: concentração inibitória, CE: concentração efetiva, Nd: não determinado. 173

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

A = a área do eletrodo (cm^2),
AMP = adenosina monofosfato
Amp = amperometria
B-16 = linhagem de células cancerosas de murinos (melanoma)
BFL = biflorina
CEM = linhagem de células leucêmicas
CE = concentração efetiva
 CL_{10} = concentração letal suficiente para matar 10% de uma espécie
 CL_{50} = concentração letal suficiente para matar 50% de uma espécie
 CL_{90} = concentração letal suficiente para matar 90% de uma espécie
CMP = monofosfato de citidina
CoTSPc = ftalocianina tetrassulfonada de cobalto
 $\text{Cu}(\text{acac})_2$ = acetilacetionato de cobre
 C_v = carbono vítreo
 D_o = coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)
DL = dose letal (mesmo que concentração letal)
 DL_{90} = dose letal suficiente para matar 90% de uma espécie
dsDNA = DNA em dupla-fita
E-DNA = sensor eletroquímico de DNA
 E_F = nível energético de Fermi
 E_{pc} = potencial de redução catódico
 $E_{1/2}$ = potencial de meia onda
 E_{redox} = potencial redox
 E_0 = potencial com $[\text{H}^+] = 1 \text{ mol L}^{-1}$, e $n = 1$
EO = estresse oxidativo
EQM = eletrodo quimicamente modificado
ERN = espécies reativas de nitrogênio
ERO = espécies Reativas de Oxigênio
 E_{sw} = amplitude do pulso na onda quadrada
ESR = Electron Spin Resonance (Ressonância de Spin do Elétron)
 f = frequência
FePor = porfirina de ferro
FeT₄MPyP = tetra-(*N*-metil-4-piridil)-porfirina de ferro
FeTSPc = ftalocianina tetrassulfonada de ferro
FEM = força eletromotriz
FAPy-G = 6-diamino-5-formamido-4-hidroxipirimidina
GMP = monofosfato de guanosina

GSH = glutationa
HCT-8 = linhagem de células cancerosas do cólon humano
HFCC = constante de acoplamento hiperfina (hyperfine coupling constant)
HL60 = linhagem de células leucêmicas
HOMO = orbital molecular ocupado de mais alta energia
HRP = horseradish peroxidase
Hz = Hertz
IC₅₀ = concentração inibitória mínima de 50%
 i_{pc} = corrente de pico catódica
 i_{pa} = corrente de pico anódica
Jug = juglona
L₄ = quarto instar (estágio larval)
LD = limite de detecção
LiTCNQ = tetracianoquinodimetano de lítio
LOD = "limit of detection" = limite de detecção
LOQ = "limit of quantification" = limite de quantificação
LQ = limite de quantificação
LUMO = orbital molecular desocupado de mais baixa energia
MCH = 6-mercapto-1-hexanol
MCF-7 = linhagem de células do adenocarcinoma torácico humano
M(TRP) = meso-tetra (4-piridil)porfirinas coordenadas a quatro complexos de [Ru(bipy)₂Cl]⁺
MTT = brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
 n = número de elétrons
NADH = nicotinamida adenina dinucleotídeo
NiTSPc = ftalocianina tetrassulfonada de níquel
OM = orbital molecular
Onco = oncocalixona
Ox = espécie oxidada
PCR = "polymerase chain reaction" = reação em cadeia via polimerase
pH = potencial hidrogeniônico
pKa = o negativo do logaritmo da constante de acidez, K_a
poliA = ácido poliadenílico
poliG = ácido poliguanílico
ppm = partes por milhão
Red = espécie reduzida
RNA = ácido ribonucléico
RPE = ressonância paramagnética de elétron
SD = standard deviation (desvio padrão)
SH-DNA = DNA tiolado
SH-OEG = oligonucleotídeos tiolados

SOD = superóxido dismutase

SP = espiroiminodi-hidantoína

ssDNA = DNA fita-simples

SWCNT = "single-wall carbon nanotube" = nanotubos de carbono de parede única

TCNE = tetracianoetileno

TCNQ = tetracianoquinodimetano

TE-EO = transferência de elétrons-estresse oxidativo

TMP = monofosfato de timidina

TPPS = ânion meso-tetra-(4-sulfonatofenil)porfirinato

VC = voltametria cíclica

VCA = voltametria de corrente alternada

VOQ = voltametria de onda quadrada

VPD = voltametria de pulso diferencial

v = velocidade de varredura.

τ = período

$1/\tau$ = frequência da onda quadrada

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO DO TRABALHO	31
2. INTRODUÇÃO	33
2.1. ELETROQUÍMICA: ASPECTOS GERAIS.....	33
2.1.1. <i>Equação de Nernst e Energia Livre</i>	36
2.2. TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS	38
2.2.1. <i>Voltametria Cíclica (VC)</i>	38
2.2.2. <i>Voltametria de Pulso Diferencial (VPD)</i>	42
2.2.3. <i>Voltametria de Onda Quadrada (VOQ)</i>	43
2.3. ESR (RESSONÂNCIA DE SPIN DO ELÉTRON)	46
2.3.1. <i>Fundamento do Método</i>	46
2.4. PARÂMETROS ELETROQUÍMICOS E ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	47
2.5. QUINONAS: ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS E MECANISMOS GERAIS	56
2.5.1. <i>Oncocalixona</i>	59
2.5.2. <i>Juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona)</i>	61
2.5.3. <i>Biflorina</i>	63
2.5.4. <i>Naftoquinonas Derivadas da Juglona</i>	64
2.6. PROCESSOS REDOX E PH: DETERMINAÇÃO DE PKA	67
2.7. ELETRODOS MODIFICADOS	68
2.8. BIOCENSORES DE DNA.....	73
3. OBJETIVOS.....	86
3.1. GERAIS.....	86
3.2. ESPECÍFICOS.....	86
4. METODOLOGIA	87
4.1. SUBSTÂNCIAS E SOLUÇÕES	87
4.2. PROCEDIMENTOS GERAIS	90
4.2.1. <i>Estudos Eletroquímicos</i>	90
4.2.2. <i>Análises com DNA</i>	91
4.2.2.1. <i>Preparo de Solução Tampão</i>	91
4.2.2.2. <i>Preparo de Solução Estoque da Quinona Analisada</i>	91
4.2.2.3. <i>Preparo de Solução de ssDNA</i>	91
4.2.2.4. <i>Análise da Interação do ssDNA com as Quinonas Oncocalixona, Biflorina e Juglona</i>	92
4.2.2.5. <i>Estudo Voltamétrico da Interação DNA-quinona (Oncocalixona, Biflorina e Juglona) e</i> <i>Determinação da Constante de Associação</i>	93

4.2.2.6. Preparo de Solução de Guanina e Adenina	94
4.2.2.7. Análise da Interação entre as Bases Guanina e Adenina com Diferentes Quinonas (Oncocalixona, Biflorina e Juglona)	94
4.2.2.8. Preparo de Solução de Ácido Poliguanílico (poliG) e Poliadenílico (poliA)	94
4.2.2.9. Análise da Interação entre os Ácidos Poliguanílico (poliG) e Poliadenílico (poliA) com as Quinonas	95
4.2.3. Análises Eletroquímicas da Oncocalixona	95
4.2.3.1. Análises em Meio Aprótico em Voltametria Cíclica	95
4.2.3.2. Análises em Meio Prótico em Voltametria Cíclica	96
4.2.3.3. Desenvolvimento de um Sensor para Oncocalixona	96
4.2.3.3.1. Substâncias e Soluções.....	96
4.2.3.3.2. Medidas Voltamétricas.....	98
4.2.3.3.3. Construção do Sensor	98
4.2.3.3.4. Otimização dos Parâmetros Experimentais.....	99
4.2.3.3.5. Construção da Curva Analítica	100
4.2.3.4. ESR (Ressonância de Spin do Elétron).....	100
4.2.3.4.1. Procedimento Experimental.....	100
4.2.4. Análises Eletroquímicas da Biflorina	101
4.2.5. Análises Eletroquímicas da Juglona.....	102
4.2.5.1. Determinação do pKa da Juglona Através da Análise do pH.....	102
4.2.5.1.1. Preparo de Soluções de Tampão Fosfato	102
4.2.5.1.2. Preparo de Solução Estoque da Juglona	102
4.2.5.1.3. Estudo do Comportamento Eletroquímico da Juglona em Diferentes Valores de pH.....	103
4.2.6. Análises Eletroquímicas de Quinonas e Bioensaios	103
4.2.6.1. Estudo da Atividade Moluscicida	104
4.2.6.2. Estudo da Atividade Larvicida.....	105
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	107
5.1. PARTE 1. ANÁLISE ELETROQUÍMICA DA ONCOCALIXONA	107
5.1.1. Análises em Meio Aprótico em Voltametria Cíclica	107
5.1.2. Análises em Meio Prótico em Voltametria Cíclica	111
5.1.3. Desenvolvimento de um Sensor para a Oncocalixona em VOQ	114
5.1.3.1. Redução Eletrocatalítica da Oncocalixona no Eletrodo Modificado em VC	114
5.1.3.2. Influência da Concentração de FeTSPc e FeT ₄ MPyP na Resposta do Sensor	116
5.1.3.3. Influência do pH, Solução Tampão e Concentração do Tampão na Resposta do Sensor	117
5.1.3.4. Influência da Frequência (f) e Amplitude de Potencial (α) em VOQ.....	120

5.1.3.5. Caracterização Analítica	122
5.1.4. Estudos com Ressonância de Spin de Elétron (ESR)	124
5.1.5. Análises com DNA.....	128
5.1.5.1. Análise da Interação da Oncocalixona com ssDNA	129
5.1.5.2. Análise da Interação da Oncocalixona com as Bases Guanina e Adenina.....	131
5.1.5.3. Análise da Interação da Oncocalixona com os Ácidos Poliguanílico (poliG) e Poliadenílico (poliA).....	133
5.1.5.4. Análise de um Controle Negativo (α -Lapachona) com ssDNA.....	135
5.1.5.5. Análise Voltamétrica da Interação entre Oncocalixona-DNA e Determinação da Constante de Associação em VPD	136
5.2. PARTE 2. ANÁLISE ELETROQUÍMICA DA BIFLORINA	139
5.2.1. Análises em Meio Prótico	139
5.2.2. Análises com DNA.....	142
5.2.2.1. Análise da Interação da Biflorina com ssDNA	142
5.2.2.2. Análise da Interação da Biflorina com as Bases Guanina e Adenina.....	144
5.2.2.3. Análise da Interação da Biflorina com os Ácidos Poliguanílico (poliG) e Poliadenílico (poliA)	148
5.2.2.4. Análise Voltamétrica da Interação entre Biflorina-DNA e Determinação da Constante de Associação, em VPD.....	152
5.3. PARTE 3. ANÁLISE ELETROQUÍMICA DA JUGLONA	155
5.3.1. Análise Eletroquímica da Juglona	155
5.3.2. Análise da Influência do pH da Solução no Potencial de Pico de Redução da Juglona e Determinação do pKa	156
5.3.3. Análises com DNA.....	159
5.3.3.1. Análise da Interação da Juglona com ssDNA.....	159
5.3.3.2. Análise da Interação da Juglona com as Bases Guanina e Adenina	160
5.3.3.3. Análise da Interação da Juglona com os Ácidos Poliguanílico (poliG) e Poliadenílico (poliA)	162
5.3.3.4. Análise Voltamétrica da Interação entre Juglona-DNA e Determinação da Constante de Associação, por VPD	164
5.3.4. Estudos de Correlação da Atividade Moluscicida e Larvicida em Relação à Estrutura e o Potencial de Redução de Algumas Quinonas	168
6. CONCLUSÕES	175
7. PERSPECTIVAS.....	176
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	177
9. GLOSSÁRIO	189
10. ATIVIDADES EXTRAS	191
11. PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS.....	192

1. APRESENTAÇÃO DO TRABALHO

O presente trabalho apresenta introdução, objetivos e metodologia descritos de forma geral. Já o capítulo 5, de resultados e discussão, para facilitar a compreensão foi dividido em três partes: a primeira relata o estudo eletroquímico da onocalixona, bem como o desenvolvimento de um sensor analítico para a mesma, além da análise de sua interação com o DNA e suas respectivas bases e determinação da constante de associação para o complexo onocalixona-DNA; a segunda parte refere-se ao estudo eletroquímico da biflorina, sua interação com o DNA, seguida da determinação da constante de associação para o complexo biflorina-DNA. A terceira parte refere-se à determinação do pKa da juglona via métodos eletroquímicos, além da investigação da interação da mesma com o DNA e bases constituintes, da determinação da constante de associação para o complexo juglona-DNA, com análise bioeletroquímica de outras naftoquinonas bioativas (incluindo a juglona), com resultados eletroquímicos correlacionados com atividades biológicas, registradas na literatura.

Tabela 1. Sumário dos estudos realizados com as quinonas no presente trabalho.

Partes do Trabalho	Quinonas	VC	VPD	ssDNA	Guanina	Adenina	PoliG	PoliA	Determinação Analítica	Análises Biológicas
1	Oncocalixona	X	X	X	X	X	X	X	X	
	α -Lapachona		X	X						
2	Biflorina	X	X	X	X	X	X	X		
3	Juglona (Q1)	X	X	X	X	X	X	X		X
	5-Acetoxy-1,4-naftoquinona (Q2)	X	X							X
	5-Metoxi-1,4-naftoquinona (Q3)	X	X							X
	2-Bromo-5-hidroxi-1,4-naftoquinona (Q4)	X	X							X
	2-Bromo-5-acetoxy-1,4-naftoquinona (Q5)	X	X							X
	2-Bromo-5-metoxi-1,4-naftoquinona (Q6)	X	X							X
	3-Bromo-5-hidroxi-1,4-naftoquinona (Q7)	X	X							X
3-Bromo-5-metoxi-1,4-naftoquinona (Q9)	X	X							X	

2. INTRODUÇÃO

A eletroquímica está presente no nosso dia-a-dia. O corpo humano não poderia existir sem o ato de respirar oxigênio e convertê-lo em água, por um processo eletroquímico que gera energia (a cadeia respiratória). Células biológicas trocam massa e energia através da membrana em processos eletroquímicos sob a influência da diferença dos potenciais elétricos. A eletroquímica fornece técnicas de monitoramento de reações químicas, de medidas de propriedades de soluções, tais como o pH, medidas do pKa, monitoramento da atividade cerebral e do coração, além de contribuir em análise ambiental e em praticamente todas as matrizes. A miniaturização de eletrodos tem criado a área de pesquisa denominada “eletroquímica *in vivo*” e/ou *in situ*, que está direcionada ao entendimento das atividades biológicas, tais como descobrir como os neurotransmissores modulam a atividade do canal iônico no cérebro, entre outras atividades e/ou na pesquisa de poluentes diretamente na fonte. Outro ponto importante é a utilização de sensores em série para o monitoramento simultâneo de diferentes espécies. O decréscimo em tamanho, a amplificação de sinais, o aumento da robustez, a automação e a combinação de ferramentas eletroanalíticas com outras tecnologias, constituem avanços extremamente encorajadores.

A eletroquímica, em termos simples, é a ciência das reações de transferência de carga elétrica, que ocorrem sob a influência de um gradiente de potencial eletroquímico, muito freqüentemente, em uma interface heterogênea.

2.1. Eletroquímica: Aspectos Gerais

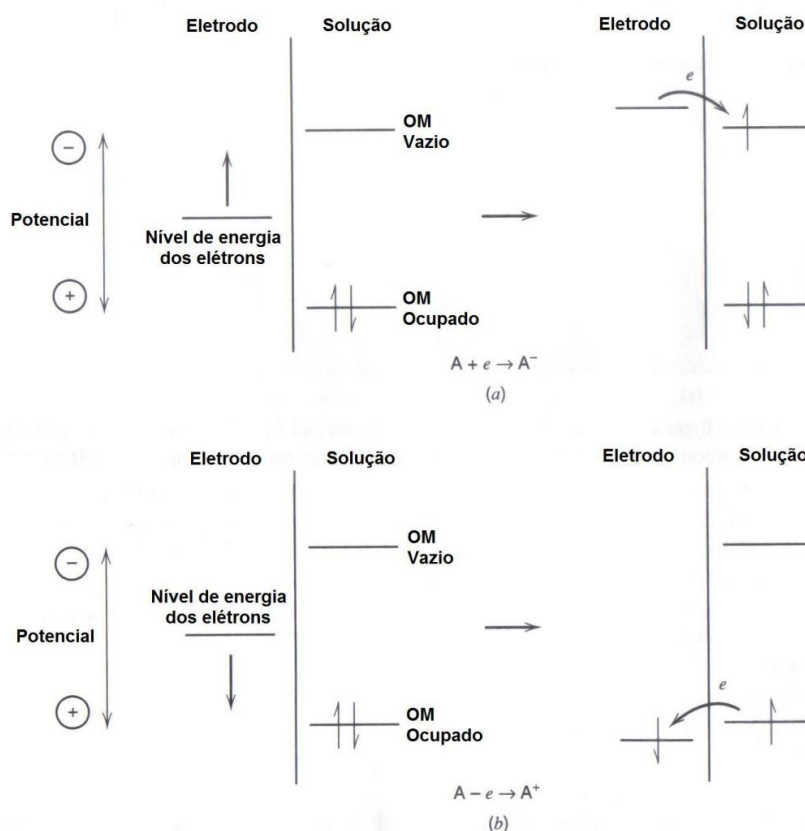
Os primeiros estudos eletroquímicos datam do final do século XVIII, realizados por Galvani e posteriormente por Volta, por meio da observação da passagem de eletricidade pela perna de uma rã. Tais observações implicaram em estudos posteriores, utilizando variação de potencial, culminando, desta forma, na descoberta da pilha voltaica no fim do século XVIII, além da descoberta da eletrólise da água por Nicholson e Carlisle, no início do século XIX, com a liberação de hidrogênio e oxigênio. Já em meados do século XIX, surgiram as Leis de Faraday,

com introdução dos termos íon, cátion, ânion, eletrodo, eletrólito, entre outros, onde um sistema eletroquímico seria composto por, no mínimo, dois eletrodos separados por um condutor eletrolítico (Ticianelli e Gonzalez, 2005).

O fenômeno de passagem de corrente elétrica através de uma célula eletroquímica provoca um desequilíbrio no sistema que pode ser caracterizado pelos seguintes fenômenos:

- Ocorre um par de reações nos eletrodos (transferência de carga).
- É observada a movimentação de espécies na solução eletrolítica (condução iônica).
- Surge o fenômeno de polarização eletródica (deslocamento dos potenciais dos eletrodos) (**Figura 1**).

Figura 1. Representação dos processos de (a) redução e (b) oxidação de uma espécie A, em solução. Os orbitais moleculares (OM) das espécies A mostrados são o OM ocupado de mais alta energia (HOMO) e o OM vazio de mais baixa energia (LUMO).



Fonte: Bard e Faulkner, 2001.

O eletrodo pode atuar como doador (para a redução) ou receptor (para a oxidação) de elétrons transferidos para/ou de espécies em solução. Para uma redução, há um conteúdo energético mínimo de que devem dispor os elétrons a serem transferidos, antes que a transferência de elétrons ocorra. Há necessidade de similaridade energética e simetria favorável dos orbitais envolvidos na transferência de elétrons. O comportamento dos elétrons em eletrodos metálicos pode ser compreendido, em parte, pela análise do nível energético de Fermi (E_F). Os elétrons atingem a máxima deslocalização possível em metais; muitas vezes, eles são exemplificados como elétrons que praticamente flutuam em um mar de cargas positivas. Nos metais, toda a condução de elétrons é essencialmente equivalente, pois os elétrons podem trocar de lugar um com o outro. No entanto, eles não têm a mesma energia, devido à limitação da mecânica quântica que diz que dois elétrons de um mesmo sistema (nesse caso, o metal) não podem ter o mesmo conjunto de números quânticos. Portanto, para uma peça de metal, haverá muitos níveis energéticos próximos e os patamares de energia podem ser considerados como um *continuum* virtual, ocupados pelos elétrons disponíveis. Esses níveis energéticos não são fixos e podem ser modificados pela variação do potencial elétrico aplicado (**Figura 1**). Conforme a posição do nível de Fermi, em eletrodos, o processo de transferência de elétrons pode ser termodinamicamente favorecido. Pela análise da **Figura 1a**, o E_F do metal é menos energético do que o LUMO (orbital molecular desocupado de menor energia) da espécie eletroativa oxidada (Ox), sendo termodinamicamente desfavorável à transferência de elétrons do eletrodo para a molécula; contrariamente ao que se observa do lado direito, onde ocorre a redução da espécie Ox, porque os níveis energéticos E_F e o LUMO de Ox são similares. Para uma oxidação, há um conteúdo energético máximo que o nível de Fermi no eletrodo precisa ter de forma a receber elétrons de espécies em solução: esse corresponde a um potencial suficientemente positivo (em volts) (**Figura 1b**) (Bard e Faulkner, 2001).

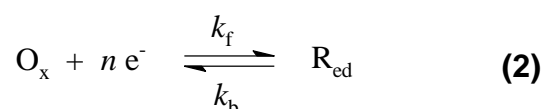
Células eletroquímicas em que correntes faradáicas fluem são classificadas como células galvânicas (operam de modo a produzir energia elétrica) ou eletrolíticas (consomem energia elétrica para produzir reação química), com utilização da equação de Faraday (Bard e Faulkner, 2001).

$$Q = \frac{m \cdot 96487 \cdot n}{MM} \quad (1)$$

Em que Q é a carga, m é a massa eletrolisada, n é o número de elétrons envolvido no processo e MM a massa molecular da espécie eletroativa.

2.1.1. Equação de Nernst e Energia Livre

A equação que relaciona a energia livre com os efeitos de concentração das espécies envolvidas nos potenciais de célula é a equação desenvolvida por Walter Nernst, em 1889. Para uma reação eletródica, o equilíbrio eletroquímico (**Eq. 2**):



é caracterizado pela equação de Nernst (**Eq. 3**):

$$E = E^{0'} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{\text{Ox}^*}}{a_{\text{Red}^*}} \quad (3)$$

Em que: a_{Ox^*} e a_{Red^*} são as atividades das formas Ox e Red no seio da solução, $E^{0'}$ é o potencial formal, R é a constante dos gases ($8,316 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T é a temperatura em Kelvins, n é o número de mols de elétrons associados ao processo de oxidação/redução e F é a constante de Faraday (96.485 coulombs por mol de elétrons).

Se as espécies oxidadas e reduzidas envolvidas numa reação eletródica se encontram em equilíbrio termodinâmico na superfície do eletrodo, a equação de Nernst pode ser aplicada. A reação eletródica é então conhecida como uma reação *reversível*, pois, obedece à condição de reversibilidade eletroquímica.

A equação de Nernst é muito utilizada para estimar a força eletromotriz (*fem*) das células em condições diferentes do padrão, sendo, desta forma, usada em

biologia para estimar a diferença de potencial entre membranas de células biológicas, como os neurônios, e também, para medidas de concentração das espécies envolvidas nas reações eletródicas (Atkins e Jones, 2007; Bard e Faulkner, 2001; Brady, 1990).

A cinética eletródica é influenciada não apenas pela própria reação eletródica como também pelo transporte de espécies para e do interior da solução. A difusão é o movimento de íons ou espécies neutras devido à existência de gradientes de potencial químico ou gradientes de concentração. Em um sistema eletroquímico, o fenômeno de difusão pode aparecer como consequência da reação eletródica. Como a reação ocorre apenas na interface eletrodo/solução e consome o reagente na mesma região, sua concentração torna-se menor quando comparada com aquela do interior da solução. Quanto maior é a corrente, maior será o consumo de reagente e, portanto, maior será o decréscimo da concentração até que, no limite, para corrente muito elevada, a concentração superficial tenderá a zero. Em tais circunstâncias, o fenômeno difusional, que é consequência dos gradientes de concentração, pode controlar o processo.

Além da difusão, mais dois processos de transferência de massa entre a solução e a superfície do eletrodo podem ocorrer. Um desses processos é a migração de partículas carregadas por ação de um campo elétrico. O outro é a convecção, um processo mecânico, que ocorre devido à movimentação da solução (usando-se um agitador magnético e uma barra magnética, por exemplo). O processo de migração é minimizado pela adição de um eletrólito inerte (eletrólito de suporte) à solução em uma concentração pelo menos 100 vezes maior do que a substância eletroativa. Esse eletrólito não interfere na reação eletródica e transporta quase toda a corrente na célula, eliminando problemas de resistência da solução e minimizando potenciais de resistência do potencial total da célula. O processo de convecção pode ser eliminado mantendo-se a solução em repouso. Assim, apenas o processo de difusão será responsável pelo transporte de massa (De Paula, 2006).

2.2. Técnicas Eletroquímicas

Três importantes técnicas em eletroquímica, a voltametria cíclica, a voltametria de onda quadrada e a voltametria de pulso diferencial, muito utilizadas no desenvolvimento do presente trabalho são descritas a seguir.

2.2.1. Voltametria Cíclica (VC)

Dentre as diversas técnicas eletroquímicas existentes, a técnica mais comumente utilizada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos é a voltametria cíclica. A eficiência desta técnica está na sua habilidade em fornecer, rapidamente, informações sobre as reações de transferência de elétrons, sobre a termodinâmica de processos redox, sobre a cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons, a possibilidade de investigar a reatividade química das espécies eletrogeradas e reações químicas acopladas a processos adsorptivos, além de auxiliar na elucidação do mecanismo eletródico analisado (Brett e Brett 1996; Bard e Faulkner, 2001).

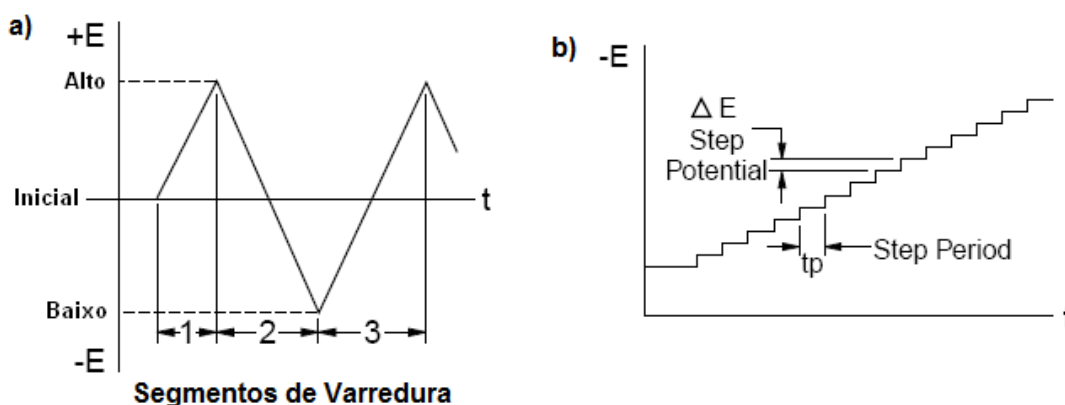
A VC é uma técnica de varredura de potencial, em que o potencial aplicado ao eletrodo é variado numa velocidade conhecida e, ao atingir o potencial final desejado, a varredura é revertida para o valor inicial, na mesma velocidade. Como resposta a essa perturbação, um par de picos, catódico e anódico pode ser obtido (**Tabela 2**), para sistemas reversíveis (Greef *et al.*, 1985).

Tabela 2. Representação Esquemática do Potencial Aplicado e dos Processos Resultantes em Voltametria Cíclica (Adaptado de Bard e Faulkner, 2001; Greef *et al.*, 1985).

Forma do Potencial Aplicado	Voltamogramas Cíclicos Resultantes	
	Processo Reversível	Processo Irreversível

A forma de aplicação do potencial, em voltametria cíclica, está representada na **Tabela 2** e na **Figura 2a**, onde o potencial é modificado ou variado linearmente com o tempo, no eletrodo de trabalho estacionário em uma solução sem agitação. A técnica de voltametria cíclica “staircase” é utilizada como contraponto a voltametria cíclica linear, no sentido de minimizar a contribuição da corrente capacitiva na corrente total. Porém, o potencial é aplicado na forma de escada (staircase, **Figura 2b**), com pequenos degraus de potenciais (da ordem de 10 mV) e tempo de duração pequeno (50 ms), sendo a corrente medida apenas no final deste intervalo (Miaw *et al.*, 1988; Bolt, 1997; Ticianelli e Gonzalez, 2005; Bard e Faulkner, 2001; Brett e Brett, 1996).

Figura 2. Formas de aplicação de potencial para a voltametria cíclica: a) potencial com varredura linear e b) potencial do tipo escada (staircase).



Fonte: Bolt, 1997.

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

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

$$i_{pc} = (2,69 \times 10^5) n^{2/3} A D_0^{1/2} \nu^{1/2} C_0 \quad (4)$$

Sendo que n é o número mols de elétrons envolvidos no processo, A é a área do eletrodo (cm^2), D_0 é o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) e C_0 é a concentração da espécie em solução (mol cm^{-3}), ν é a velocidade de varredura (V s^{-1}) (Eq. 4).

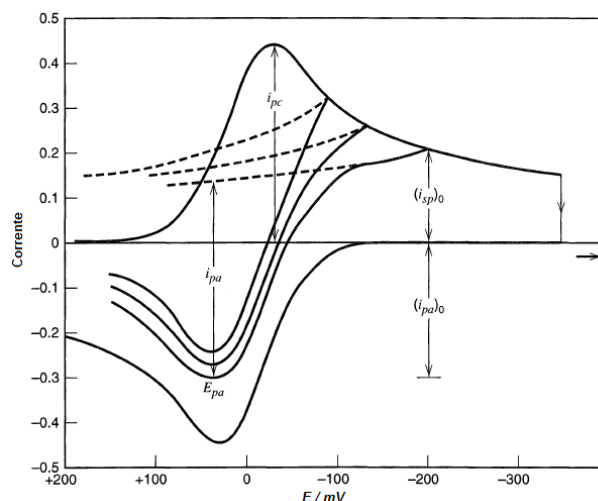
Para uma reação reversível, a corrente de pico varia linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, a razão entre a corrente de pico anódico e catódico será igual a 1 e independente de ν , o potencial de pico não apresenta variação com a velocidade de varredura de potencial e a razão $i_p/\nu^{1/2}$ é constante e independe de ν (Bard e Faulkner, 2001; Brett e Brett, 1996).

Para calcular a razão entre as correntes de pico i_{pa}/i_{pc} , a equação descrita por R. Nicholson pode ser utilizada (Bard e Faulkner, 2001) (Eq. 5),

$$\frac{i_{pa}}{i_{pc}} = \frac{(i_{pa})_0}{(i_{pc})_0} + \frac{(0,485) \cdot (i_{sp})_0}{(i_{pc})_0} + 0,086 \quad (5)$$

onde devem ser consideradas as intensidades das correntes $(i_{pa})_0$, $(i_{pc})_0$ e $(i_{sp})_0$ desde a corrente zero, sendo desta forma, descritas na Figura 3.

Figura 3. Voltamograma cíclico, descrito por Nicholson, detalhando as correntes de pico em relação à corrente zero.



Quando a velocidade de transferência de carga é lenta comparada com a velocidade de varredura, as concentrações das espécies oxidadas (O_x) e reduzidas (R_{ed}) não serão mais função apenas do potencial, não possuindo, portanto um comportamento nernstiano. Nestas circunstâncias, a equação que descreve a corrente de pico (i_{pc}) é dada por:

$$i_{pc} = (2,99 \times 10^5) n(\alpha n)^{1/2} A C_0 D_0^{1/2} v^{1/2} \quad (6)$$

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

Os testes diagnósticos para a caracterização dos processos descritos em voltametria cíclica são apresentados na **Tabela 3**. Em uma análise qualitativa, na maioria das vezes, o perfil da onda pode dar indício de processo reversível, como a presença de um par de picos (catódico e anódico) de mesma altura, com potenciais de pico separados por uma distância de $59/n$ mV (n = número de elétrons), caso as espécies oxidadas e reduzidas sejam estáveis. Por outro lado, um processo irreversível pode ser caracterizado pela evidência da completa ausência do pico reverso, apesar de esse não ser o único critério de análise, como descrito anteriormente (Greef *et al.*, 1985).

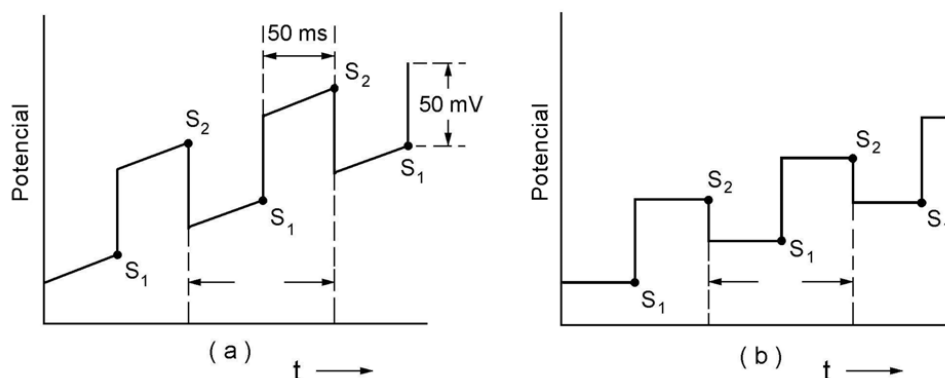
Tabela 3. Testes diagnósticos em VC para processos reversíveis (a), irreversíveis (b) e quase-reversíveis (c) (Adaptado de Greef *et al.*, 1985).

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

2.2.2. Voltametria de Pulso Diferencial (VPD)

A voltametria de pulso diferencial é uma técnica muito usada em medidas em níveis traço, de espécies orgânicas e inorgânicas, em que, o degrau de potencial é a base deste tipo de voltametria (Wang, 2000b). Na voltametria de pulso diferencial, pulsos de amplitude fixos sobrepostos a uma rampa de potencial crescente são aplicados ao eletrodo de trabalho, sendo que a forma e os sinais de excitação captados dependem do tipo de aparelho utilizado, podendo ser tanto analógico quanto digital (**Figura 4**). Nos equipamentos analógicos, uma sobreposição de pulsos periódicos sobre uma rampa linear é verificada (**Figura 4a**), já em equipamentos digitais, há uma combinação de um pulso de saída com um sinal em degrau (**Figura 4b**).

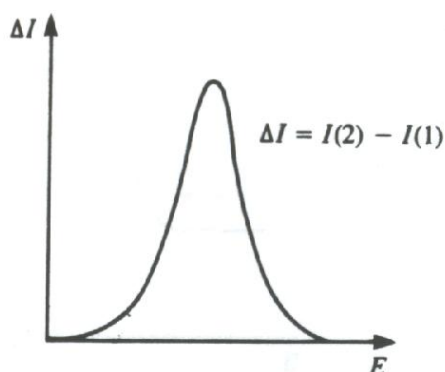
Figura 4. Representação esquemática da aplicação do potencial em função do tempo em VPD, tanto para instrumentos analógicos (a) quanto para instrumentos digitais (b). Amostragem da corrente em S_1 e S_2 , sendo registrada a diferença entre essas correntes.



Fontes: Bard e Faulkner, 2001; Brett e Brett, 1996.

Em VPD, a corrente é medida duas vezes, sendo uma antes da aplicação do pulso (S_1) e outra ao final do pulso (S_2), onde a primeira corrente é instrumentalmente subtraída da segunda. Em seguida, a diferença das correntes é plotada em função do potencial aplicado, e o voltamograma resultante consiste de picos de corrente de forma gaussiana, cujas áreas são diretamente proporcionais à concentração do analito (**Figura 5**) (Brett e Brett, 1996).

Figura 5. Perfil corrente-potencial esquemático para VPD.



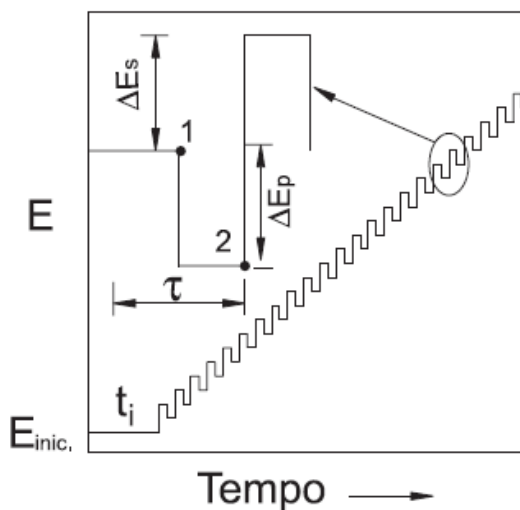
Fonte: Adaptado de Brett e Brett, 1996.

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

2.2.3. Voltametria de Onda Quadrada (VOQ)

Na voltametria de onda quadrada (VOQ) é aplicado ao eletrodo de trabalho, uma onda quadrada simétrica de amplitude ΔE_p sobreposta a uma rampa de potencial na forma de escada (staircase) caracterizada por uma amplitude ΔE_s , largura a e período τ , como representado na **Figura 6** (Bard e Faulkner, 2001; Brett e Brett, 1996).

Figura 6. Esquema básico para a voltametria de onda quadrada.

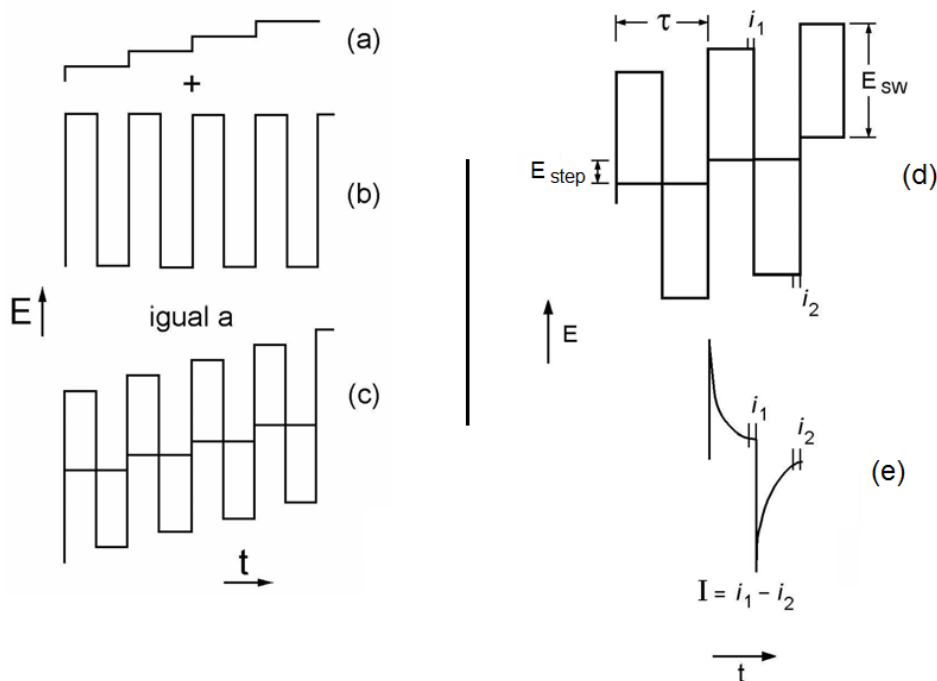


Fonte: Souza *et al.*, 2003.

A amostragem da corrente ocorre duas vezes, uma ao final do pulso direto, quando a direção do pulso é igual à direção da varredura e outro ao final do pulso reverso [que ocorre no meio do “degrau” (step) da onda staircase], onde a direção do pulso é contrária à direção da varredura. Esta dupla amostragem da corrente, assim como na voltametria de pulso diferencial, garante uma minimização da contribuição da corrente capacitiva sobre a corrente total analisada.

De forma mais detalhada, a programação de potencial usada na voltametria de onda quadrada pode ser vista na **Figura 7**. Uma onda quadrada simétrica (**Figura 7b**) é superposta sobre uma rampa de potencial em forma de degraus (**Figura 7a**) de tal forma que o pulso direto da onda quadrada coincida com o início do degrau da rampa (**Figura 7c**). O pulso reverso da onda quadrada por sua vez coincide com a metade do degrau (salto) da rampa. Os parâmetros tempo e potencial aplicado são mostrados nas **Figuras 7d** e **7e**, onde τ é o tempo de um ciclo de onda quadrada e também de um ciclo da rampa em degraus. A frequência da onda quadrada em Hz é $1/\tau$. E_{sw} é a amplitude do pulso de onda quadrada em mV, onde $2 \times E_{sw}$ é a amplitude pico a pico (amplitude do pico direto ao reverso) (Bard e Faulkner, 2001; Brett e Brett, 1996, Souza *et al.*, 2003).

Figura 7. Seqüência potencial vs. tempo (E vs. t) usada em VOQ. Parâmetros tempo e potencial aplicados em voltametria de onda quadrada, onde: τ = tempo de um ciclo de onda quadrada; $1/\tau$ = freqüência da onda quadrada em Hz; E_{sw} = amplitude de pulso da onda quadrada (em mV); E_{step} (E_{salto} ou “step potential”) = potencial (em mV) de salto de rampa de potencial em degraus sendo $2E_{sw}$ a amplitude de pico a pico da onda quadrada (em mV).



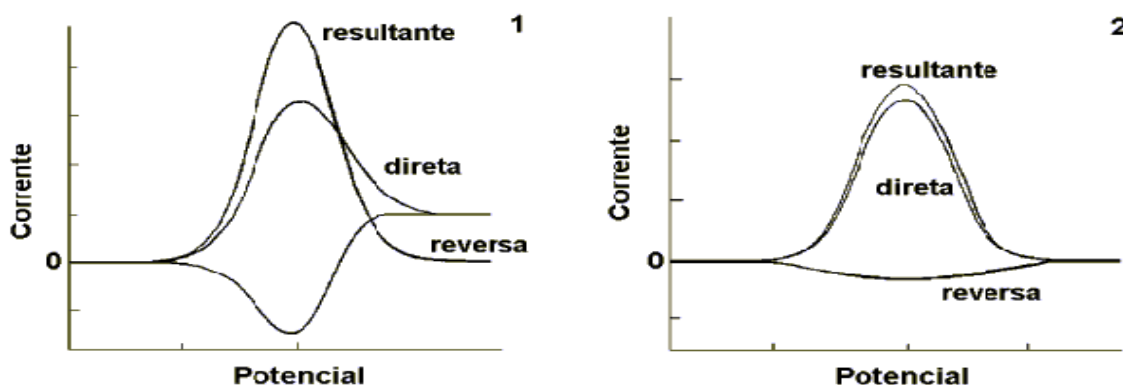
Fonte: Souza *et al.*, 2003.

E_{step} é o potencial de salto da rampa de potencial em degraus (“step” potential). Desta forma, a velocidade de varredura v para uma análise em VOQ pode ser calculada segundo a equação:

$$v \text{ (mV s}^{-1}\text{)} = [E_{step} \text{ (mV)} / \tau \text{ (s)}] \quad (7)$$

A **Figura 8** apresenta os voltamogramas teóricos associados a: 1) um sistema reversível e 2) um sistema irreversível, com a separação observada das correntes direta, reversa e resultante (Souza *et al.*, 2003).

Figura 8. Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada onde: 1) representa um processo redox de um sistema reversível e 2) de um sistema irreversível.



Fonte: Adaptado de Souza *et al.*, 2003.

A sensibilidade desta técnica é comparável à proveniente da voltametria de pulso diferencial, sendo a sua maior vantagem, a velocidade de aquisição dos dados. Freqüências de 1 a 100 ciclos de onda quadrada por segundo permitem o uso de velocidades de varredura de potencial, extremamente rápidas. Enquanto na voltametria de pulso diferencial, a velocidade de varredura varia de 1 a 10 mV s^{-1} , na voltametria de onda quadrada esta velocidade varia de 100 a 1000 mV s^{-1} , isto diminui o tempo de análise de cerca de 3 a 5 minutos para alguns poucos segundos (3 a 10 s), sem haver perda da resolução dos picos (Bard e Faulkner, 2001; Brett e Brett, 1996, Souza *et al.*, 2003).

2.3. ESR (Ressonância de Spin do Elétron)

2.3.1. Fundamento do Método

A Ressonância de Spin do Elétron (ESR), também conhecida como Ressonância Paramagnética do Elétron (RPE), é o nome dado ao processo de absorção ressonante de microondas por átomos, íons ou moléculas paramagnéticas, com ao menos um elétron desemparelhado e na presença de um campo magnético estático. Esta técnica detecta a transição de um elétron entre os níveis de energia

associados com as duas possíveis orientações do spin eletrônico em um campo magnético. Pode comprovar a estrutura estática de sistemas sólidos e líquidos e é também muito utilizada no estudo de processos dinâmicos, sendo de grande aplicabilidade e de extrema importância para definições mecanísticas em eletroquímica (Carey e Sundberg, 2007).

2.4. Parâmetros Eletroquímicos e Atividade Biológica

As análises eletroquímicas, com uso das voltametrias (voltametrias de varredura linear, cíclica, pulso diferencial, onda quadrada, entre outras) têm assumido um importante lugar no arsenal da química analítica para a identificação e quantificação de muitas moléculas de importância farmacêutica e biológica.

Muitos processos fisiológicos importantes são baseados nas cadeias de oxirredução envolvendo sucessivos processos catalisados por enzimas, onde se encontra muita similaridade entre reações eletroquímicas e biológicas no que diz respeito às vias de transferência de elétrons (TE). Sendo assim, os estudos eletroquímicos podem fornecer uma quantidade enorme de evidências relacionadas aos mecanismos dos processos de transferência biológicas de elétrons (Squella *et al.*, 2006).

A necessidade de simular as condições biológicas é um fator importante a ser considerado nas análises eletroquímicas, tendo em vista que o ambiente celular pode ser tanto hidrofílico quanto lipofílico. Os processos de redução/oxidação podem ser realizados em meio não-aquoso, mimetizando a situação em sistemas lipofílicos, ou em meio aquoso, correspondendo às situações em muitos fluidos biológicos (Livertoux *et al.*, 1996; De Abreu *et al.*, 2002; Hillard *et al.*, 2008). Outro fator importante a ser considerado, está relacionado ao conteúdo de O₂ da célula que, em alguns tecidos, como no caso de tumores sólidos, podem conter regiões com baixa quantidade de oxigênio (hipóxia), situações geralmente geradas por consequência de um pobre e desorganizado suprimento de sangue nas células. Alguns tumores, como os carcinomas pulmonares sólidos são hipóxicos e seu ambiente redox é mais reduzido, enquanto outros, como os de mama e próstata, proliferam em condições de desbalanço redox pró-oxidativo (Wardman *et al.*, 2001; Asche, 2006). Desta forma, a quantidade de oxigênio, bem como o pH do meio, influencia profundamente

as reações eletroquímicas biológicas e, portanto, devem ser considerados nas análises que simulam ambientes biológicos.

Em relação aos parâmetros eletroquímicos, os potenciais de redução ou de oxidação de algumas substâncias, que são obtidos por meio de técnicas eletroquímicas, podem fornecer informações sobre a viabilidade dos processos de transferência de elétrons (TE) *in vivo* ou *in vitro*. Algumas correlações já divulgadas na literatura entre E_{pc} (potencial de redução catódico), E_m (potencial a meia altura de onda) ou E_{redox} (potencial redox), $(E_{pc} + E_{pa})/2$ (para sistemas reversíveis) ou $E_{pc} - E_{pc/2}$ (para sistemas irreversíveis), e atividades biológicas (De Abreu *et al.*, 2002) demonstram a relevância de estudos eletroquímicos como ferramentas úteis que ajudam na elucidação do mecanismo de ação de fármacos e no planejamento de compostos biologicamente ativos.

A versatilidade da metodologia eletroquímica permite simular a grande variedade de ambientes biológicos, em que diferentes valores de pH, conteúdo de oxigênio na célula eletroquímica e solventes de propriedades diversas podem ser manipulados para essa finalidade. Tais análises podem ser observadas nos tópicos seguintes.

a) Estudos eletroanalíticos de substâncias biologicamente ativas

Uma das aplicações da eletroquímica está relacionada aos estudos eletroanalíticos de endobióticos e fármacos, para quantificação em líquidos biológicos ou outras finalidades. A presença de um grupo eletroativo é pré-requisito para seu uso em eletroanálise. Desta forma, detectores eletroquímicos usados em métodos analíticos, como HPLC ou biossensores, têm sido extensivamente usados e tem papel importante nas análises de endobióticos (Squella *et al.*, 2006).

O comportamento eletroquímico de determinadas classes de substâncias, pode ser completamente distinto, pelo fato de que mudanças estruturais afetam curvas voltamétricas de diferentes maneiras, podendo causar deslocamentos nos potenciais redox, provocar mudanças no mecanismo eletródico, na reversibilidade química e eletroquímica e na cinética reacional. O efeito de grupos substituintes numa série de substâncias derivadas de um mesmo núcleo pode ser na maioria das vezes, relacionado com parâmetros eletroquímicos. Essa correlação permite

estender o limite das medidas experimentais e, portanto, predizer propriedades redox de um grupo bem mais amplo de compostos (Squella *et al.*, 2006).

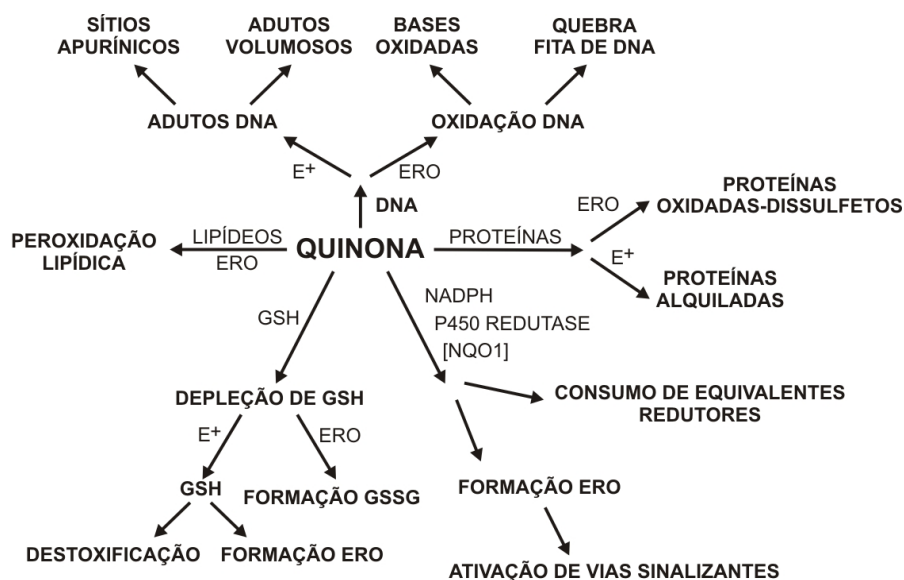
Partindo do princípio da relevância sobre o conhecimento dos potenciais redox de substâncias eletroativas com atividades biológicas em potencial, sabe-se que dentre as principais classes de grupos farmacológicos eletroquimicamente ativos, destacam-se as quinonas e seus análogos. A atuação de quinonas em relação ao câncer e sua correlação com parâmetros eletroquímicos têm sido extensivamente estudadas por diversos pesquisadores na última década (Squella *et al.*, 2006).

b) Determinação dos mecanismos de ação de fármacos

As técnicas eletroanalíticas têm sido usadas para esclarecer os mecanismos de ação de fármacos, com grande contribuição na análise de radicais livres. O grande valor da eletroquímica no estudo destes sistemas redox é devido ao uso de sistemas químicos relativamente limpos, além de ser relativamente fácil de controlar, podendo ser estudados em soluções apróticas e aquosas, em que se permite avaliar o comportamento de radicais livres gerados em sistemas biológicos (Squella *et al.*, 2006).

Uma larga variedade de moléculas (naturais ou sintéticas) tem a capacidade de, após TE, gerar espécies oxigenadas tóxicas ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , HO^{\bullet}), denominadas Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), que, em excesso, são responsáveis pelo estresse oxidativo (EO), ou se comportar como agentes alquilantes do DNA ou de outras macromoléculas fisiologicamente importantes. Muitos destes comportamentos característicos são observados em relação às quinonas (O'Brien *et al.*, 1991), onde os principais mecanismos moleculares de ação biológica e farmacológica são esquematizados na **Figura 9** (Bolton *et al.*, 2000).

Figura 9. Sumário dos potenciais mecanismos moleculares citotóxicos para quinonas, com destaque para a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) importante na via de oxidação do DNA, e o papel da glutatona (GSH) e de NAD(P)H:quinona oxidorredutase (NQO1) nas vias de destoxificação celular por meio de eliminação de derivados quinônicos tóxicos (hidroquinonas).



Fonte: Adaptado de Bolton *et al.*, 2000.

Um número significativo de substâncias fisiologicamente ativas mostra valor de potencial mais positivo do que $-0,5$ V (vs. ENH – Eletrodo Normal de Hidrogênio), sendo ideal para captura de elétrons a partir de doadores biológicos (enzimas) ou através de modificações metabólicas, fornecendo derivados facilmente redutíveis. Uma atividade ótima, relacionada à geração do estresse oxidativo, pode ser alcançada quando o potencial de redução monoelétrônico da substância se situa na faixa intermediária entre a faixa dos redutores celulares (cerca de $-0,4$ V vs. ENH) e através da reação O_2/O_2^{\bullet} em cerca de $-0,2$ V vs. ENH (em pH fisiológico $\sim 7,0$), embora essa faixa possa se estender ligeiramente por efeitos de concentração ou por efeitos cinéticos de rápida re-oxidação dos íons-radicais intermediários (De Moura, 2008).

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, no qual está relacionado à transferência de elétrons/estresse

oxidativo, geração *in situ* de espécies tóxicas (EROs, ERNs), interação com endobióticos, entre outros.

c) Transferência de elétrons (TE) e estresse oxidativo (EO)

O conhecimento do processo de “transferência de elétrons/estresse oxidativo” (TE-EO) é importante no entendimento da ação de fármacos e no desenvolvimento de novas drogas (Wardman, 2001). O oxigênio é uma espécie química bastante requerida em muitas reações metabólicas no organismo. Porém, oxigênio, óxido nítrico e seus intermediários ativados, EROs (espécies reativas de oxigênio) e ERNs (espécies reativas de nitrogênio), podem reagir com componentes celulares resultando na degradação ou inativação de moléculas essenciais, gerando o estresse oxidativo celular. Todavia, o estresse oxidativo não é simplesmente uma consequência indesejável da vida aeróbica, podendo representar um importante princípio de defesa química dos organismos contra invasores, sendo gerados por granulócitos neutrofílicos durante a fagocitose, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor (De Abreu *et al.*, 2002).

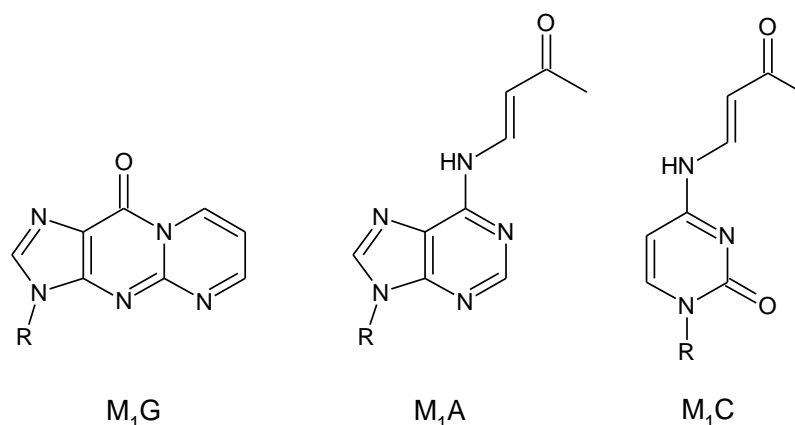
Há uma evidência crescente do envolvimento de TE-EO no mecanismo de ação de uma grande variedade de compostos fisiologicamente ativos. A exposição de células a EROs e ERNs gera uma variedade de produtos e padrões de danos, que são consistentes com ataques de radical hidroxila a lipídios, proteínas, açúcares e bases do DNA (Valko *et al.*, 2007). Na **Figura 10**, as principais vias de formação de EROs e seus efeitos em macromoléculas podem ser observadas, tendo destaque o processo de peroxidação lipídica (reações 14 a 19), o papel da glutathiona (GSH, reações 4, 9, 10, 13 e 17) e outros antioxidantes (vitamina E, vitamina C e ácido lipóico) na manutenção da homeostase.

Figura 10. Vias de formação de EROs, o processo de peroxidação lipídica e o papel da glutathiona (GSH) e outros antioxidantes (Vitamina E, Vitamina C, ácido lipóico) na manutenção do estresse oxidativo. Reação 1: formação do ânion radical superóxido pelo processo de redução de oxigênio molecular mediado por NAD(P)H e xantina oxidase ou por compostos reativos redox, como o composto semi-ubiquinona da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. Reação 2: transformação do radical superóxido pela superóxido dismutase (SOD) a H_2O_2 . Reação 3: seqüestro de peróxido de hidrogênio pela enzima

glutationa peroxidase (GPx) com GSH como doador de elétrons. Reação 4: redução da glutatona oxidada (GSSG) a GSH pela enzima glutatona redutase (Gred) com uso de NADPH como doador de elétrons. Reação 5: Reação de Fenton pela quebra do peróxido de hidrogênio a radical hidroxila reativo por meio de alguns metais de transição (Fe^{2+} , Cu^+ , entre outros). Reação 6: geração de um radical lipídico (L^{\cdot}) pela abstração de um elétron de um ácido graxo poli-insaturado (LH)O pelo radical hidroxila. Reação 7: interação do radical lipídico (L^{\cdot}) com oxigênio molecular para geração de um radical peroxil lipídico (LOO^{\cdot}). A não redução do radical peroxil lipídico (LOO^{\cdot}) por antioxidantes leva ao processo de peroxidação lipídica (reações 18-23 e 15-17). Reação 8: redução do radical peroxil lipídico (LOO^{\cdot}) dentro da membrana pela forma reduzida da vitamina E (T-OH) resultando na formação do hidroperóxido lipídico e um radical da vitamina E (T-O $^{\cdot}$). Reação 9: regeneração da vitamina E pela vitamina C, onde o radical da vitamina E (T-O $^{\cdot}$) é reduzido de volta a vitamina E (T-OH) pelo ácido ascórbico (a forma fisiológica do ascorbato é o monoânion ascorbato, AscH^-) deixando pra trás o radical ascorbil ($\text{Asc}^{\cdot-}$). Reação 10: regeneração da vitamina E por GSH, onde o radical da vitamina E oxidada (T-O $^{\cdot}$) é reduzido por GSH. Reação 11: glutatona oxidada (GSSG) e o radical ascorbil ($\text{Asc}^{\cdot-}$) são reduzidos de volta a GSH e monoânion ascorbato, AscH^- , respectivamente, pelo ácido dihidrolipóico (DHHLA) que é convertido por ele mesmo a ácido α -lipóico (ALA). Reação 12: regeneração de DHHLA a partir de ALA usando NADPH. Reação 13: hidropoxidases lipídicas são reduzidas a alcoóis e dioxigênio por GPx usando GSH como doador de elétron. *Processo de peroxidação lipídica:* Reação 14: reação rápida de hidroperóxidos lipídicos com Fe^{2+} para formação de radicais alcoxilas lipídicos (LO^{\cdot}), ou lenta com Fe^{3+} para formação de radicais peroxil (LOO^{\cdot}). Reação 15: radical alcoxila lipídico (LO^{\cdot}), derivado do ácido aracdônico, conduz reação de ciclização para formar um anel hidroperóxido de seis membros. Reação 16: anel hidroperóxido de seis membros conduz mais reações (envolvendo cisões β) para formar 4-hidroxi-nonenal. Reação 17: 4-hidroxi-nonenal se torna num aduto inócuo glutatila (GST, glutatona S-transferase). Reação 18: Um radical peroxil localizado na posição interna do ácido graxo pode reagir por ciclização para produzir um peróxido cíclico adjacente a um radical carbono-centrado. Reação 19: Este radical pode então tanto ser reduzido para formar um hidroperóxido ou pode conduzir a uma segunda ciclização para formar um peróxido bicíclico que depois se junta ao dioxigênio e a redução rende uma molécula estruturalmente análoga ao endoperóxido. Reação 20: o composto formado é um produto intermediário para a produção de malondialdeído. Reações 21, 22 e 23: malondialdeído pode reagir com as bases do DNA, Citosina, Adenina e Guanina para formar adutos M1C, M1A e M1G, respectivamente.

podem conduzir a um número de reações, incluindo fragmentação de ligações C-C, resultante da quebra da fita simples do DNA. Vale ressaltar que o estresse oxidativo severo pode causar dano ou morte celular, como consequência de defesa antioxidante insuficiente (Squella, 2006).

Figura 11. Exemplos de produtos mutagênicos gerados a partir da peroxidação lipídica por meio da reação do malondialdeído (MDA) com as bases guanina, adenina e citosina na formação dos adutos M₁G, M₁A e M₁C.

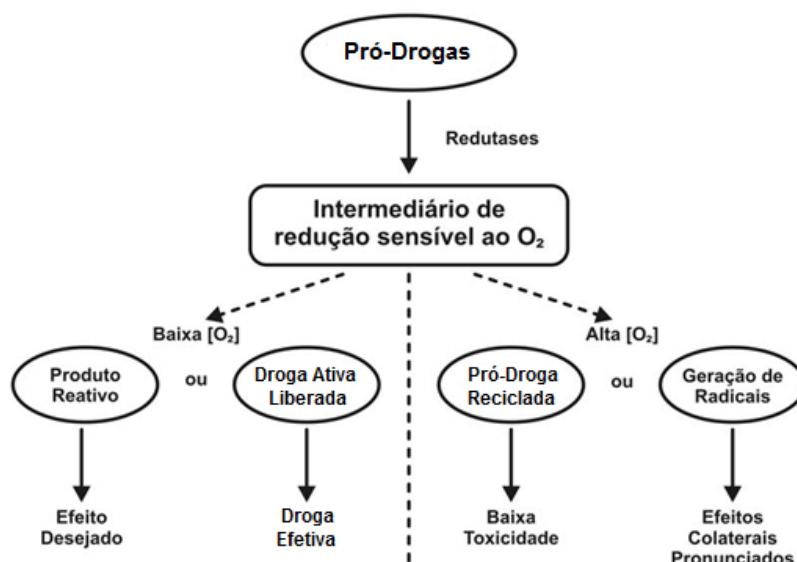


Fonte: Valko *et al.*, 2007.

d) Alquilação Biorredutiva

A alquilação biorredutiva é outro processo redox que descreve o efeito de compostos que expressam seu modo de ação farmacológica como agentes alquilantes após sofrerem redução *in vivo*. A grande variedade de agentes alquilantes empregados clinicamente se comporta como armadilhas eletrofílicas para nucleófilos moleculares, podendo incluir aminoácidos, como a cisteína, lisina, tirosina e treonina, e as nucleobases do DNA e RNA (Rajski e Williams, 1998). As pró-drogas são normalmente empregadas para esse fim e a sua ativação ocorre através de processos redox. A predominância desse processo depende do conteúdo de oxigênio dos sistemas biológicos envolvidos (**Figura 12**) e do ambiente redox celular, que no caso de células cancerosas, o balanço redox pode ser alterado em relação às células normais. Essa diferença pode ser estratégica em relação ao desenvolvimento de agentes ativados por reações redox, que podem se tornar seletivos aos alvos, como no caso de alguns tumores hipóxicos (Wardman *et al.*, 2001).

Figura 12. Representação esquemática de mecanismos pelos quais pró-drogas ativadas por biorredução exercem suas atividades farmacológicas por meio da ativação seletiva em hipóxia ou ativação em condições normais, com geração do estresse oxidativo.



Fonte: Adaptado de Wardman *et al.*, 2001.

No que diz respeito ao DNA como alvo, é geralmente aceito que a formação de ligações cruzadas entre-fitas represente de longe o mais tóxico de todos os eventos alquilantes. Como consequência, agentes causadores de ligações cruzadas entre-fitas compreendem uma classe extremamente importante de agentes clínicos importantes. A interação de fármacos com o DNA, através de uso de biossensores, está entre os mais importantes aspectos dos estudos biológicos no descobrimento de fármacos e no processo de desenvolvimento farmacêutico (Rauf *et al.*, 2005).

A eletroquímica de biossensores de DNA permite a avaliação e predição de interações com DNA e de danos causados ao mesmo por compostos perigosos a saúde, por meio do uso de técnicas voltamétricas para a geração *in situ* de intermediários reativos, que interagem com o DNA. A ocorrência de danos oxidativos ao dsDNA leva à quebra das ligações de hidrogênio e a abertura da dupla-hélice, provocando o contato das bases com a superfície do eletrodo, permitindo a detecção eletroquímica dos danos oxidativos, por meio do monitoramento da oxidação das bases. As características eletroquímicas destes biossensores de DNA têm sido muito estudadas e têm provido novas descobertas no desenvolvimento racional de fármacos que podem levar a um melhor entendimento do mecanismo de interação

entre os fármacos e o DNA (La-Scalea *et al.*, 2002; Mascini *et al.*, 2005). Desta forma, a eletroquímica é uma ferramenta complementar no estudo do mecanismo de interação biomolecular de fármacos, demonstrando uma aproximação entre a química analítica e a química medicinal. Maiores detalhes sobre os biossensores serão fornecidos no item 2.8, pág. 73.

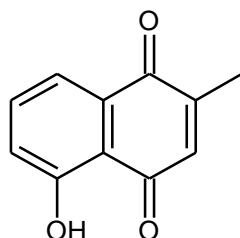
e) Estudos de Citotoxicidade

A metodologia eletroquímica tem sido considerada uma ferramenta quantitativa útil para a descoberta da citotoxicidade de fármacos via estudo da reatividade *in situ* de intermediários eletrogerados frente à endobióticos. Tais estudos são realizados principalmente com glutathione, derivados tiólicos e ácidos nucleicos. O procedimento quantitativo para calcular as constantes de interação entre ânions-radicaís eletroquimicamente gerados de drogas extensivamente usadas e xeno/endobióticos pode ser feito por meio do uso da voltametria cíclica. Tal método se baseia na diminuição da razão entre a corrente de pico direta e reversa (I_{pa}/I_{pc}) de sistemas reversíveis depois da adição de determinado endobiótico (Squella *et al.*, 2006).

2.5. Quinonas: Atividades Farmacológicas e Mecanismos Gerais

Quinonas estão envolvidas na cadeia biológica de transferência de elétrons, localizadas nas membranas das mitocôndrias, tanto em bactérias aeróbias (Collins, 1994), quanto em cloroplastos, e nos processos de respiração celular e fotossíntese nas plantas. São compostos largamente distribuídos na natureza, estando associadas a atividades biológicas diversas, dentre elas, a atividade anticâncer. Embora, haja muitos agentes clinicamente importantes contendo núcleo quinônico com atividade anticâncer (antraciclina, mitoxantrona, entre outras), há necessidade de testes para descobertas continuadas. A literatura relata, em artigos sucessivos, novas atividades biológicas para quinonas, como a plumbagina (Kitagawa *et al.*, 2004; Silva Jr. *et al.*, 2010; Molfetta *et al.*, 2005; Ough *et al.*, 2005; Andrade-Neto, 2004; Chen *et al.*, 2004) (**Figura 13**).

Figura 13. Plumbagina, naftoquinona derivada da planta *Plumbago zeylanica*.

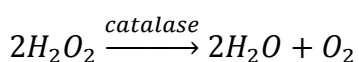
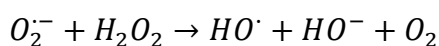
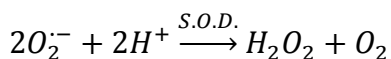
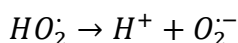
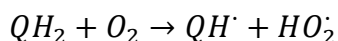
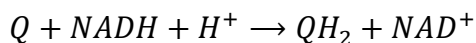


Fonte: Tiwari *et al.*, 2002.

Do ponto de vista toxicológico, as quinonas podem ser tanto oxidantes quanto eletrofílicas, conferindo uma alta reatividade às mesmas. Do ponto de vista biológico, o DNA representa o principal alvo destes compostos, uma vez que, muitas delas, pertencem aos grupos de intercaladores e/ou agentes alquilantes, e/ou inibidores de topoisomerasas (Yamashita *et al.*, 1991) sendo sua toxicidade atribuída à habilidade de conduzir reações de óxido-redução reversíveis (Bachur *et al.*, 1979).

Em meio biológico, a redução monoelétrica de quinonas resulta na formação de semiquinonas, que podem reagir com o oxigênio molecular, formando o ânion-radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que sofre subsequente desproporcionamento e protonação para formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (**Figura 14**).

Figura 14. Atuação de quinonas na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e detoxificação, pelo emprego de catalase e superóxido-dismutase (SOD).



Fontes: Schaffer *et al.*, 2001; Valko *et al.*, 2007; Lown *et al.*, 1982.

O ânion-radical superóxido também pode reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} e então, reagir com o Fe^{2+} para gerar o radical hidroxila (HO^\bullet) (Reação de Fenton), sendo, a espécie reativa responsável pelo dano oxidativo, pois não é capturada (destoxificada) por qualquer enzima presente no meio celular. Por meio de um mecanismo eficiente de redução da quinona a semiquinona, ocorre um ciclo redox, que tem como consequência o estresse oxidativo, resultante do consumo desproporcionado de equivalentes redutores celulares e a geração das espécies oxigenadas reativas (O_2^\bullet , H_2O_2 , HO^\bullet) (Schaffer *et al.*, 2001; Valko *et al.*, 2007; Lown *et al.*, 1982).

A redução com transferência de dois elétrons, catalisada por enzimas, é geralmente considerada como um caminho desintoxicante, desde que a hidroquinona resultante seja conjugada e excretada. No entanto, a hidroquinona resultante pode se desproporcionar e gerar espécies oxigenadas ativas, ou levar a reações de rearranjo para formar espécies alquilantes reativas (alquilação biorredutiva). Ambos os caminhos podem provocar danos celulares e consequente toxicidade (Valko *et al.*, 2007; Lown *et al.*, 1982).

A citotoxicidade das quinonas pode ter consequências benéficas ou deletérias através de vários mecanismos, podendo incluir ciclagem redox, arilação, intercalação na dupla hélice do DNA, geração de sítios radiculares específicos, interferência na respiração mitocôndrica, inibição enzimática, entre outros, sendo que em todos esses casos, o mecanismo de ação, *in vivo*, requer a biorredução das quinonas como primeira etapa de ativação (Frydman *et al.*, 1997).

Em termos de métodos eletroquímicos, o uso de meios específicos permite a obtenção de semiquinonas ou hidroquinonas. Em meio aprótico, ocorrem duas etapas de transferência monoelétrica enquanto em meio aquoso, há transferência bieletrônica, em uma única etapa (Crawford *et al.*, 1996).

Apesar da complexidade da química da célula/tecido e da multiplicidade dos sistemas enzimáticos responsáveis pela redução de quinonas *in vivo*, é possível comparar estudos eletroquímicos realizados *in vitro* (em solventes apróticos e próticos) e estabelecer relações estrutura/atividade biológica, eletroquímica/atividade biológica, utilizando as informações obtidas no desenvolvimento de fármacos efetivos para a ação desejada. No caso de quinonas, foram encontradas correlações positivas entre potenciais redox e efeitos inibitórios em alguns tipos de vírus e em citotoxicidade (Koyama *et al.*, 2001). Tendo em vista o que foi exposto, as

ferramentas eletroquímicas podem fornecer valiosos parâmetros para uso em química medicinal, seja com uso de solventes apróticos, quanto próticos, através da análise de valores de E_{redox} , relacionados aos processos reversíveis, (Hillard *et al.*, 2008).

2.5.1. *Oncocalixona*

As plantas são depósitos de moléculas orgânicas bioativas. Várias classes de compostos naturais são farmacologicamente ativas e servem como fármacos e/ou levam ao desenvolvimento de fármacos. *Auxemma oncocalyx* Taub. (**Figura 15**) é uma árvore nativa brasileira, característica da vegetação xerofítica presente na região nordeste. É comumente chamada de “pau branco”.

Figura 15. *Auxemma oncocalyx*.



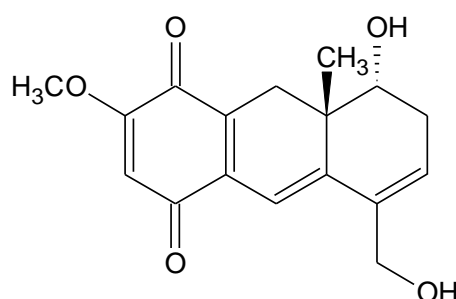
Fonte: Autor, 2011.

A investigação química dos extratos do cerne de *A. oncocalyx* resultou no isolamento e caracterização de várias quinonas terpênicas incomuns e hidroquinonas com estrutura de 16 carbonos (Pessoa *et al.*, 1993; Pessoa *et al.*, 2004; Pessoa *et al.*, 1995, Marques *et al.*, 2000). Estes metabólitos secundários, que parecem ser típicos do gênero, foram isolados em uma série homóloga, diferindo em seu grau de oxidação, oxigenação (éter ou álcool), rearranjo e ciclização intramolecular das cadeias naturais terpênicas. Com um padrão geral, todos os compostos possuem um grupo metoxila na posição C-2 e várias deles, um

grupo metila angular β -orientado, ligado ao C-8a, além de uma configuração *cis* para os anéis B/C.

Oncocalixona A (**Figura 16**), *rel*-8 α -Hidroxi-5-hidroximetil-2-metoxi-8a β -metil-7,8,8a,9-tetraidro-1,4-antracenodiona, um sólido amorfo vermelho escuro, foi o primeiro composto isolado do extrato de *A. oncocalyx*. Este metabólito secundário, que foi obtido em quantidades significativas, é responsável pela coloração escura do cerne desta planta.

Figura 16. Oncocalixona A (*rel*-8 α -Hidroxi-5-hidroximetil-2-metoxi-8a β -metil-7,8,8a,9-tetraidro-1,4-antracenodiona).



Fontes: Pessoa *et al.*, 1993; Pessoa *et al.*, 2004; Pessoa *et al.*, 1995, Marques *et al.*, 2000.

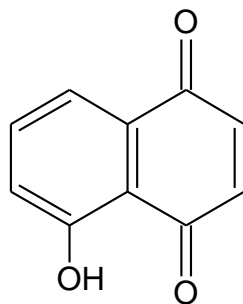
Uma série de propriedades farmacológicas foi atribuída à oncocalixona, como analgésico, citotóxico, anti-inflamatório, antioxidante e causador de inibição da ativação plaquetária (Pessoa *et al.*, 2004; Costa-Lotuf *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2004). A oncocalixona também tem demonstrado atividade antitumoral diferenciada contra os tumores de murinos: Ehrlich carcinoma, sarcoma 180 e Leucemia L1210. Outras atividades farmacológicas foram também descritas para a fração das quinonas obtidas do extrato de *A. oncocalyx*.

As atividades biológicas apresentadas pela oncocalixona A têm fornecido modelos importantes para a síntese de potenciais novos compostos biologicamente ativos e, devido à sua importância fitoterápica (Hamburguer, 1991; Cardellina, 2002), um maior ímpeto foi gerado no intuito de se identificar seu modo de atuação biológico, tendo em vista seu uso contra agentes causadores de neoplasias.

2.5.2. Juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona)

As plantas possuem diversos componentes que são de imenso valor nutricional e medicinal, dentre eles, as quinonas, alvo de estudos extensivos, tendo mostrado que algumas delas apresentaram excelente atividade antitumoral, como já comentado (tópico 2.5) (Reinicke *et al.*, 2005). Alguns estudos mostraram que derivados 1,4-naftoquinônicos possuidores de ao menos um grupo hidroxila fenólico são potentes inibidores de enzimas topoisomerases, sendo usadas clinicamente em terapias contra cânceres sólidos (Plyta *et al.*, 1998). Outros estudos mostraram que a presença de substituintes hidroxila em 1,4-naftoquinonas, modula a toxicidade em hepatócitos de ratos, decrescendo nas séries 5,8-di-hidroxi-1,4-naftoquinona (naftazarina), 5-hidroxi-1,4-naftoquinona (juglona), 1,4-naftoquinona, 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (lausona), concluindo ainda que a citotoxicidade estaria relacionada à diminuição da concentração de glutatona ou outros tióis biologicamente ativos devido à ciclagem redox enzimática das naftoquinonas (Ollinger e Brunmark, 1991).

Figura 17. Juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona).



Fonte: Sugie *et al.*, 1998.

A juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona) (**Figura 17**) é um pigmento que ocorre como um produto natural nas raízes, folhas, cascas de nozes, casca do caule e madeira da noqueira preta (*Juglans nigra* L.), noqueira européia (*Juglans regia* L.) e noqueira branca (*Juglans cinerea* L.), plantas da família Juglandaceae (**Figura 18**).

Figura 18. Família Juglandaceae (*Juglans regia* L.).

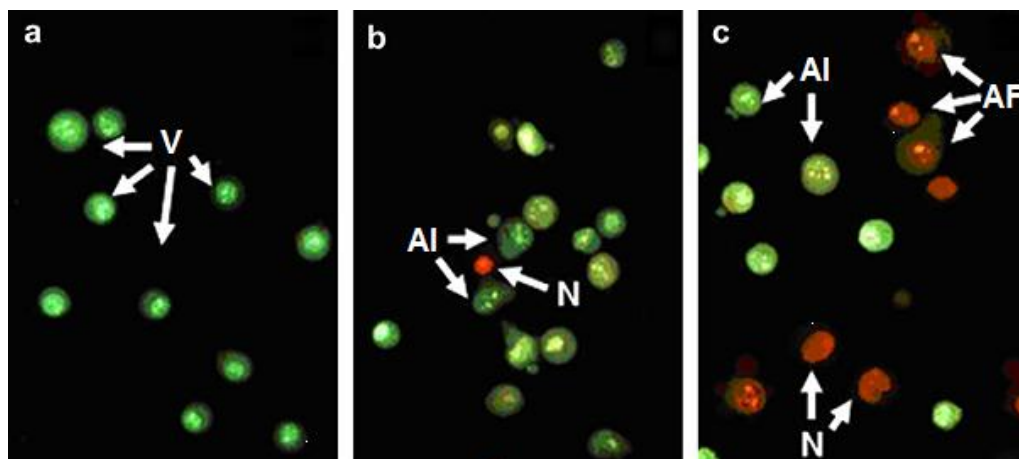


Fonte: Retirado de <http://www.meemelink.com> em 11/04/10.

Preparações herbais de noqueiras têm sido extensivamente usadas na medicina popular para o tratamento de acne, doenças inflamatórias, infecções cutâneas, infecções bacterianas, virais e fúngicas bem como o câncer. As noqueiras contém juglona como o principal componente, com outros constituintes como a α -hidrojuglona (1,4,5-tri-hidroxinaftaleno) e seu glicosídeo β -hidrojuglona, juntamente com ácido cafeico, ácido elágico, hiperina e caempferol. Foram relatadas que preparações herbais de noqueiras suprimem o crescimento de adenocarcinomas mamários espontâneos em ratos albinos suíços (Aithal *et al.*, 2009).

Sugie e colaboradores (1998) descobriram que a juglona reduz a formação de azoximetano induzido em tumores intestinais em ratos F344 e concluiu que juglona poderia ser um promissor agente quimiopreventivo. Outro trabalho demonstrou que a juglona tem um potencial efeito genotóxico e citotóxico através da indução do estresse oxidativo, danos a membrana celular e ação clastogênica, levando a morte celular tanto por apoptose, quanto por necrose em culturas de melanomas (**Figura 19**) (Aithal *et al.*, 2009).

Figura 19. Mudanças morfológicas induzidas por juglona determinadas pelo corante acridina laranja/brometo de etídio. a) controle mostrando células vivas (V) b) $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de Juglona por 12 h mostrou células com apoptose inicial (AI) bem como baixa porcentagem de células necróticas (N) c) 10×10^{-3} mol L⁻¹ de Juglona por 12 h mostrou alta porcentagem de células com apoptose final (AF) e necróticas (N) bem como células com apoptose inicial (AI).



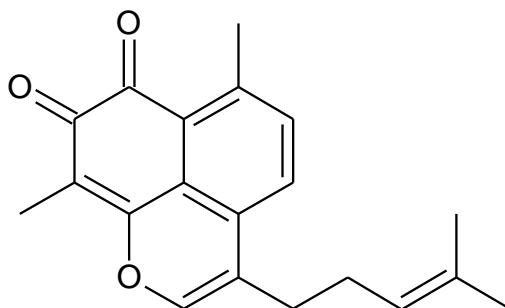
Fonte: Adaptado de Aithal *et al.*, 2009.

Murakami e colaboradores (2010) sugeriram que a toxicidade da juglona deve-se à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) via reação da semiquinona com oxigênio. Xu e colaboradores (Xu *et al.*, 2010) estudaram seu efeito em células HL-60 e demonstraram a morte por apoptose, via mitocondrial, enquanto Klaus e colaboradores trabalharam com queratinócitos e verificaram danos oxidativos (Klaus *et al.*, 2010). Em termos eletroquímicos, a juglona tem sido estudada, tanto como monômero, como precursor polimérico (Rubin *et al.*, 2010).

2.5.3. Biflorina

A biflorina é uma *orto*-naftoquinona prenilada (6,9-dimetil-3-(4-metil-3-pentenil)nafta[1,8-*bc*]-piran-7,8-diona) (**Figura 20**), facilmente isolada das raízes de *Capraria biflora*, um arbusto perene distribuído nas Américas do Sul e do Norte, com forte atividade antibiótica contra germes gram-positivo e álcool-ácido resistentes e contra alguns fungos (Lima *et al.*, 1958; Serpa, 1958).

Figura 20. Biflorina (6,9-dimetil-3-(4-metil-3-pentenil)nafta[1,8-*bc*]-piran-7,8-diona).



Fontes: Lima *et al.*, 1958; Serpa, 1958.

A biflorina é citotóxica contra várias linhagens de células tumorais com IC_{50} na faixa de 0,43 a 14,61 $\mu\text{g mL}^{-1}$: CEM e HL60 (leucemia humana), B-16 (melanoma de murinos), HCT-8 (colon humano) e MCF-7 (adenocarcinoma torácico humano) (Vasconcellos *et al.*, 2010). Recentemente, Vasconcellos e colaboradores (2007), relataram a atividade antitumoral da biflorina em ratos transplantados com sarcoma 180 e Erhlich carcinoma, indicando uso clínico promissor para a biflorina como agente antitumoral. Por outro lado, também sugeriram que efeitos celulares causados pela biflorina são dependentes da concentração, uma vez que em baixas concentrações, apresenta significativa atividade protetora e antioxidante contra efeitos citotóxicos, genotóxicos, mutagênicos e contra a peroxidação lipídica intracelular induzida por H_2O_2 em linhagens de células de mamíferos, sendo estas propriedades atribuídas a sua propriedade em sequestrar radicais hidroxila. Em contrapartida, em concentrações elevadas (acima de 250 $\mu\text{g mL}$), a biflorina mostrou ser citotóxica e genotóxica (Vasconcellos *et al.*, 2010).

2.5.4. Naftoquinonas Derivadas da Juglona

Alguns derivados naftoquinônicos, com destaque para os derivados halogenados, têm apresentado atividade biológica significativa, frente a larvas do mosquito *Aedes aegypti*, vetor responsável pela disseminação da dengue, bem como ao molusco *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário, responsável pela disseminação da equistossomose (**Tabela 4**) (Ribeiro *et al.*, 2009) e ainda atividades antitumorais (**Tabela 5**) (Montenegro *et al.*, 2010).

Tabela 4. Atividades larvicidas (contra *A. aegypti*) e moluscicidas (contra *B. glabrata*) de alguns derivados quinônicos (Ribeiro *et al.*, 2009). DL₅₀: dose letal com 50% de mortes, DL₉₀: dose letal com 90% de mortes.

COMPOSTOS	Larvicida (mg L ⁻¹)	Moluscicida (mg L ⁻¹)
5-Hidroxi-1,4-naftoquinona (juglona) (Q1)*	DL ₅₀ 3,587 DL ₉₀ 6,641	DL ₅₀ 1,4748 DL ₉₀ 9,3520
5-Acetoxi-1,4- naftoquinona (Q2)**	DL ₅₀ 4,553 DL ₉₀ 7,993	DL ₅₀ 1,2131 DL ₉₀ 3,7744
5-Metoxi-1,4-naftoquinona (Q3)**	DL ₅₀ 7,919 DL ₉₀ 10,833	DL ₅₀ 2,4587 DL ₉₀ 6,2519
2-Bromo-5-hidroxi-1,4- naftoquinona (Q4)**	DL ₅₀ 1,391 DL ₉₀ 2,501	DL ₅₀ 1,1813 DL ₉₀ 4,4042
2-Bromo-5-acetoxi-1,4- naftoquinona (Q5)**	DL ₅₀ 1,170 DL ₉₀ 4,550	DL ₅₀ 0,9480 DL ₉₀ 2,2050
2-Bromo-5-metoxi-1,4- naftoquinona (Q6)**	DL ₅₀ 9,703 DL ₉₀ 16,999	DL ₅₀ 0,7459 DL ₉₀ 1,5630
3-Bromo-5-hidroxi-1,4- naftoquinona (Q7)**	DL ₅₀ 0,873 DL ₉₀ 1,417	DL ₅₀ 2,4941 DL ₉₀ 5,6543
3-Bromo-5-acetoxi-1,4- naftoquinona (Q8)**	DL ₅₀ 7,287 DL ₉₀ 10,445	DL ₅₀ 0,8932 DL ₉₀ 1,6589
3-Bromo-5-metoxi-1,4- naftoquinona (Q9)**	DL ₅₀ 5,752 DL ₉₀ 12,453	DL ₅₀ 0,8932 DL ₉₀ 1,6589

*Estrutura da juglona, página 61.

**Estrutura das quinonas, página 89.

Tabela 5. Atividades citotóxicas da juglona e seus derivados, em relação a linhagens de células tumorais em relação a células mononucleares de sangue periférico e eritrócitos (Montenegro *et al.* 2010). CI: concentração inibitória, CE: concentração efetiva, Nd: não determinado.

	MTT CI_{50} $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)					Hemólise CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
	HL-60	MDAMB 435	SF-295	HCT-8	PBMC	
Q1	0,78 (4,5) (0,48-1,25)	Nd	Nd	Nd	Nd	>200
Q2	1,98 (9,2) 1,69 – 2,33	1,35 (6,2) 1,03 – 1,77	1,82 (8,4) 1,6 – 2,07	1,11 (5,1) 0,77-1,6	Nd	>200
Q3	0,31 (1,7) 0,23 – 0,43	0,72 (3,8) 0,62 – 0,95	0,88 (4,7) 0,72 – 1,07	0,85 (4,5) 0,71-1,05	0,69 (3,7) 0,49 – 0,99	>200
Q4	1,08 (4,3) 0,93 – 1,23	1,39 (5,5) 1,06 – 1,82	1,6 (6,3) 1,29 – 1,99	1,62 (6,4) 1,12-2,35	Nd	>200
Q5	2,31 (7,8) 1,86 – 2,89	1,85 (6,3) 1,37 – 2,5	1,81 (6,1) 1,47 – 2,23	1,58 (5,3) 1,32-1,86	Nd	>200
Q6	2,99 (11,2) 2,4 – 3,7	2,36 (8,8) 1,84 – 3,03	2,2 (8,2) 1,02 – 4,71	2,35 (8,8) 1,59 – 3,46	Nd	>200
Q7	1,52 (6,0) 1,04 – 2,25	2,26 (8,9) 1,48 – 3,42	2,92 (11,5) 2,31 – 3,69	2,23 (8,8) 1,78 – 2,79	Nd	>200
Q8	2,33 (7,9) 1,79 – 3,04	2,48 (8,4) 1,84 – 3,35	2,30 (8,6) 1,82 – 2,91	2,61 (7,8) 1,81 – 3,77	Nd	>200
Q9	1,93 (7,2) 1,54 – 2,42	1,73 (6,5) 1,38 – 2,16	1,41 (5,3) 1,18 – 1,67	1,54 (5,8) 1,08 – 2,19	Nd	>200
Dox	0,02 (0,03) 0,01 – 0,02	0,48 (0,8) 0,34 – 0,66	0,23 (0,4) 0,19 – 0,25	0,01 (0,02) 0,01 – 0,02	0,97 (1,7) 0,52 – 1,80	Nd

Linhagens celulares: HL-60 (Leucemia promielocítica humana), SF-295 (Glioblastoma humano), HCT-8 (Carcinoma de cólon humano), PBMC (células mononucleares sanguíneas periféricas). Dox (doxorubicina)

O estudo eletroquímico das mesmas pode ser relacionado a essas atividades biológicas dando correlação positiva ou não.

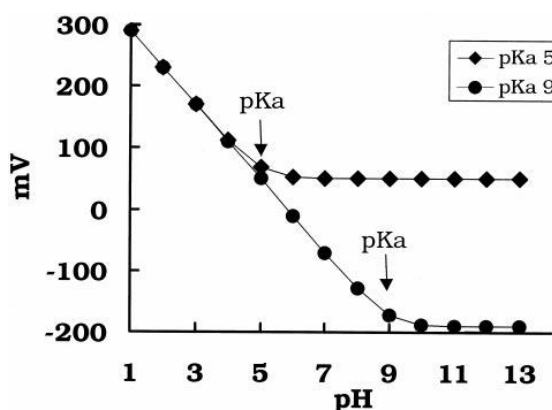
2.6. Processos Redox e pH: Determinação de pKa

O pH influencia diretamente no comportamento eletroquímico de compostos que trazem em sua estrutura grupos ionizáveis. O pKa ou coeficiente de ionização é uma das principais propriedades físico-químicas de moléculas capazes de alterar seu perfil farmacoterapêutico. Ele descreve a extensão da ionização de grupos funcionais, sendo este parâmetro, de grande importância em algumas áreas, como o desenvolvimento de fármacos, onde o conhecimento do estado de ionização de um grupo funcional é, muitas vezes, essencial para entender as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de novos fármacos (Lima *et al.*, 2002; Avdeef *et al.*, 1999).

Para medir valores de pKa, é necessário expor a substância a um ambiente com mudanças de pH bem definidas, com monitoramento de uma propriedade particular que sofre modificação em função do estado de ionização da molécula.

O uso de técnicas eletroquímicas pode ser de fundamental importância na determinação de valores de pKa. Esse tipo de análise só pode ser efetuado, se a molécula apresentar grupo passível de sofrer reações de oxirredução, onde o potencial de redução/oxidação da substância seria analisado em função da variação do pH. Tal variação pode ser exemplificada na **Figura 21**, em que a dependência do pH para dois pares redox diferentes pode ser demonstrada, com uma das espécies apresentando pKa 5 e a outra apresentando pKa 9 (Schafer e Buettner, 2001).

Figura 21. Potencial de redução de pares redox dependentes do pH em função do pH. Duas espécies com diferentes valores de pKa, mas com mesmo potencial de semi-reação em condições-padrão.



2.7. Eletrodos Modificados

O termo eletrodo quimicamente modificado (EQM) foi introduzido na eletroquímica por Murray e colaboradores em 1975 (Moses *et al.*, 1975) para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas, deliberadamente imobilizadas em suas superfícies, com o objetivo de pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução. A modificação da superfície do eletrodo sendo uma forma de impor e controlar sua reatividade e/ou seletividade, possibilita o desenvolvimento de eletrodos para vários propósitos e aplicações.

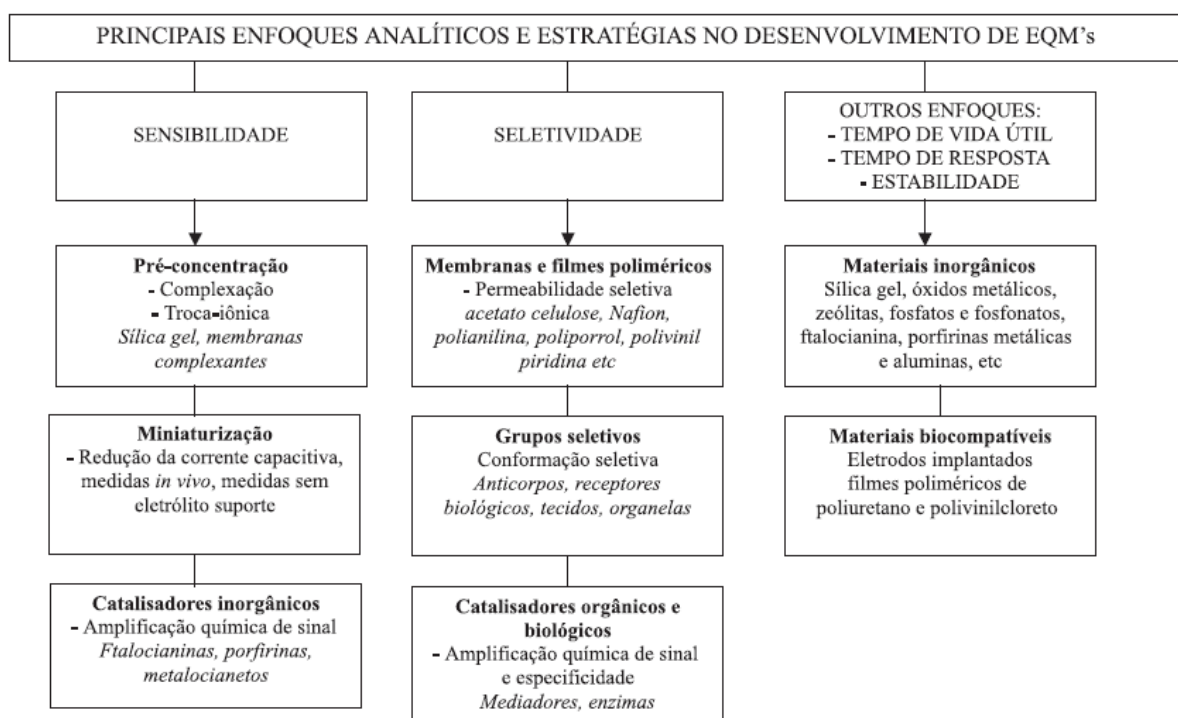
Os primeiros trabalhos envolvendo a preparação de eletrodos com superfícies modificadas surgiram no início da década de 70 por Lane e Hubbard (Lane e Hubbard, 1973). Estes pesquisadores adsorveram na superfície de eletrodos de platina várias olefinas funcionalizadas, explorando a propensão de grupos alcenos quimisorverem-se sobre este metal, verificando a capacidade do ácido 3-alil-salicílico coordenar ao ferro seletivamente, em função do potencial aplicado. Já em 1975, foi publicado um trabalho descrevendo a construção de um eletrodo quiral para eletrossíntese de álcoois, além de aminoácidos opticamente ativos terem sido covalentemente ligados à superfície de um eletrodo de carbono vítreo, via grupos carboxila (Watkins *et al.*, 1975).

A modificação química de eletrodos é um campo de interesse crescente em química analítica. Já na eletroquímica, foi demonstrado que eletrodos quimicamente modificados possuem vantagens distintas em relação aos eletrodos convencionais em muitas áreas de aplicação, que incluem eletrocatalise e sensores eletroquímicos (Luz *et al.*, 2004). O principal objetivo dessa modificação é pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução como uma forma de alterar a reatividade e seletividade do sensor base, favorecendo assim, o desenvolvimento de eletrodos para vários fins e aplicações, desde a catalise de reações orgânicas e inorgânicas até a aceleração da velocidade de transferência de elétrons em moléculas de interesse (Pereira *et al.*, 2002).

A maioria das aplicações analíticas de EQM envolve técnicas voltamétricas ou amperométricas. Do ponto de vista analítico, a sensibilidade e/ou a seletividade de uma determinação deve aumentar com a utilização de um EQM para que seu uso

seja justificado. Isto pode ser obtido por meio de um ou mais dos seguintes fenômenos: pré-concentração, eletrocatalise e exclusão de interferentes (**Figura 22**). Em geral, a obtenção de sensibilidades mais altas ocorre por pré-concentração da espécie de interesse ou por eletrocatalise, sendo que a aplicação de qualquer um destes princípios resulta em inerente aumento da seletividade. (Pereira *et al.*, 2002).

Figura 22. Principais enfoques analíticos e estratégias no desenvolvimento de EQM's.



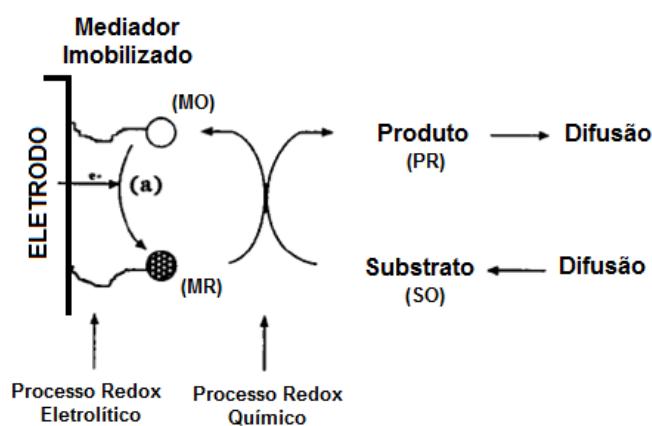
Fonte: Retirado de Pereira *et al.*, 2002.

Em relação à eletrocatalise, o objetivo é reduzir a energia de ativação em uma reação envolvendo transferência de elétrons. A oxidação ou redução de um substrato que apresenta uma cinética de transferência de elétrons lenta, à superfície do eletrodo, é mediada por um sistema redox que pode trocar elétrons mais rapidamente com o eletrodo e o substrato (processo EC - eletroquímico-químico) ou na ordem inversa (processo CE - químico-eletroquímico), reduzindo o sobrepotencial de ativação. O sobrepotencial de ativação é o potencial adicional a E^0 , necessário para vencer a barreira de ativação de uma dada eletrólise, em um dado eletrodo, e manter a reação a uma dada velocidade. A redução do sobrepotencial de ativação aumenta a seletividade da medida porque permite a aplicação de potenciais de

operação mais baixos, sendo que a especificidade da reação está inversamente relacionada à magnitude do potencial aplicado, reduzindo, ou mesmo eliminando, a possibilidade de que os potenciais de eletrólise de outras espécies presentes sejam atingidos (Oni *et al.*, 2005).

Os mediadores redox podem ser espécies orgânicas (quinonas, tetratiofulvaleno; tetracianoquinodimetano, entre outros), compostos organometálicos (ferrocenos, ftalocianinas, óxidos de rutênio, metaloporfirinas, etc) ou enzimas. Estas espécies atuam em solução ou no caso de EQM, imobilizadas à superfície do eletrodo, podendo ser utilizado mais de um mediador. Na **Figura 23** é mostrado o princípio de ação de um mediador imobilizado na superfície de um EQM, em um processo de redução (a) de um substrato.

Figura 23. Princípio de atuação de um mediador redox imobilizado à superfície de um EQM usado para eletrocatalise. (a) Processo de redução, MO – Mediador Oxidado, MR – Mediador Reduzido, SO – Substrato Oxidado, PR – Produto Reduzido.



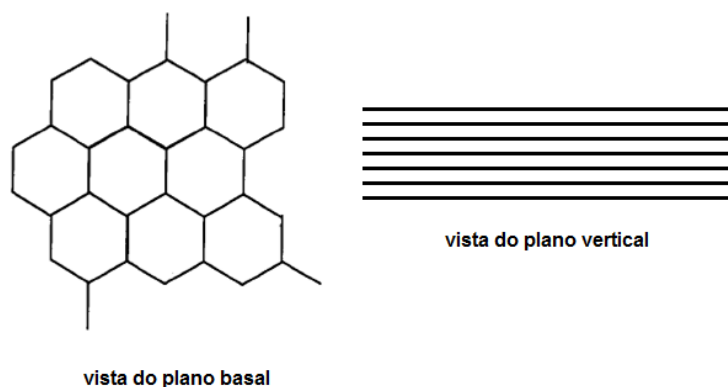
Fonte: Autor, 2011.

Na preparação do EQM, a escolha do material para o eletrodo base, cuja superfície sofrerá a modificação, é um aspecto muito importante a ser considerado. O material constituinte do eletrodo deve apresentar características eletroquímicas apropriadas e também ser adequado para o método de imobilização selecionado. Entre os materiais convencionais encontram-se o ouro, platina, carbono vítreo, mercúrio na forma de filme e pasta de carbono, sendo menos usuais, carbono vítreo

reticulado, fibras de carbono, material plástico condutor e vidros condutores (Pereira *et. al.*, 2002).

Em relação ao método de imobilização do modificador no eletrodo, a adsorção (quimiossorção) é a maneira mais simples de fixar um modificador ao substrato do eletrodo base, consistindo na dissolução do agente modificador em um solvente apropriado, e na exposição, em geral por imersão, do eletrodo a esta solução. Outra maneira é dispor esta solução, com o auxílio de uma micropipeta, sobre a superfície a ser modificada, com posterior evaporação do solvente. Embora os primeiros estudos envolvendo adsorção (Lane e Hubbard) tenham utilizado eletrodos de platina, a maioria dos trabalhos subsequentes com adsorção foi realizada com eletrodos de grafite e carbono vítreo (Aleixo *et al.*, 1993). Eletrodos de carbono apresentam a capacidade particular de quimiossorver reagentes que possuam sistemas de elétrons π estendidos, como no caso de compostos orgânicos aromáticos. Esta adsorção é devida à forte interação entre o plano basal (**Figura 24**) do eletrodo de carbono e o sistema de elétrons π da molécula aromática.

Figura 24. Plano basal (plano da folha) e plano vertical (plano perpendicular à folha) da superfície do eletrodo de carbono.

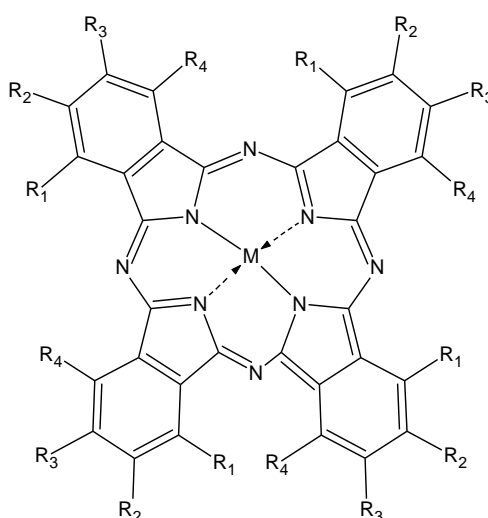


Fonte: Autor, 2011.

A eficiência dos catalisadores desenvolvidos atualmente tem sido atribuída à sua capacidade de induzir a redução de alguns compostos orgânicos por promoverem a transferência de elétrons entre a superfície do eletrodo e as espécies eletroativas em solução, de forma mais rápida. Desta forma, uma grande variedade de compostos tem sido usada como mediadores na transferência de elétrons, na

oxidação como na redução de várias moléculas-alvo (Luz *et al.*, 2005; Revenga-Parra *et al.*, 2005), caso das metalofalocianinas (**Figura 25**), nas quais, exibem excelentes propriedades físico-químicas (Mckeown, 1998), como alta estabilidade térmica e eficiência catalítica para um grande número de moléculas (Ozoemena *et al.*, 2001; Filanovsky, 1999).

Figura 25. Ftalocianina: $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$, ftalocianina tetrassulfonada: $R_1 = R_2 = R_4 = H$ e $R_3 = SO_3^-$, $M =$ Cobalto, Níquel, Ferro ou Cobre.

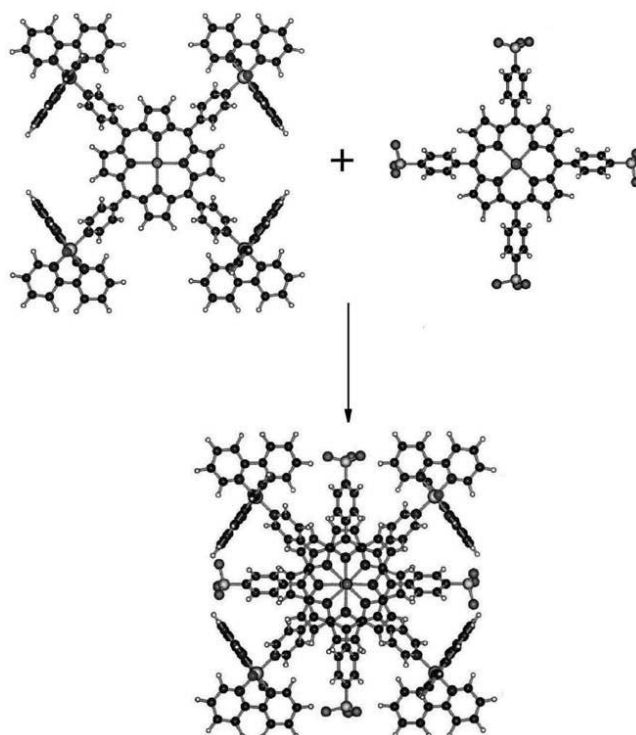


Fonte: Mckeown, 1998.

Em relação às metaloporfirinas, elas têm sido extensivamente empregadas em modificações de superfícies de eletrodos, por causa de suas extraordinárias propriedades eletroquímicas e eletrocatalíticas (Biesaga *et al.*, 2000). Adicionalmente, eletrodos revestidos com porfirinas exibiram várias características distintas, como alta capacidade catalítica e forte ligação com a superfície do eletrodo, provendo sensores analíticos com alta sensibilidade e estabilidade prolongada (Deng e Dong, 1996). Entre os derivados porfirínicos, as meso-tetra (4-piridil)porfirinas coordenadas a quatro complexos de $[Ru(bipy)_2Cl]^+$, $M(TRP)$, tem recebido grande atenção (Angnes *et al.*, 1996; Azevedo *et al.*, 1998) com uso de filmes eletrostaticamente organizados com camadas alternadas de $Co(TRP)$ catiônicos e $Zn(TPPS)$ aniônicos (TPPS = ânion meso-tetra-(4-sulfonatofenil)porfirinato) (**Figura 26**). Este tipo de combinação proveu uma união de interações eletrônicas estéricas e eletrostáticas, fornecendo um filme mais condutor

e homogêneo e também um sensor mais reprodutível e durável para sulfitos e nitritos (Azevedo *et al.*, 1999).

Figura 26. Representação estrutural de Co(TRP), Zn(TPPS) e do seu respectivo par iônico.



Fonte: Adaptado de Rocha *et al.*, 2002.

Está bem estabelecido que sensores e biossensores têm um papel importante na determinação de vários analitos de interesse industrial, clínico, ambiental e farmacológico. Neste sentido, eletrodos modificados são particularmente adequados não só para determinações analíticas, mas também para a investigação de processos e mecanismos físico-químicos, tanto de espécies orgânicas quanto inorgânicas.

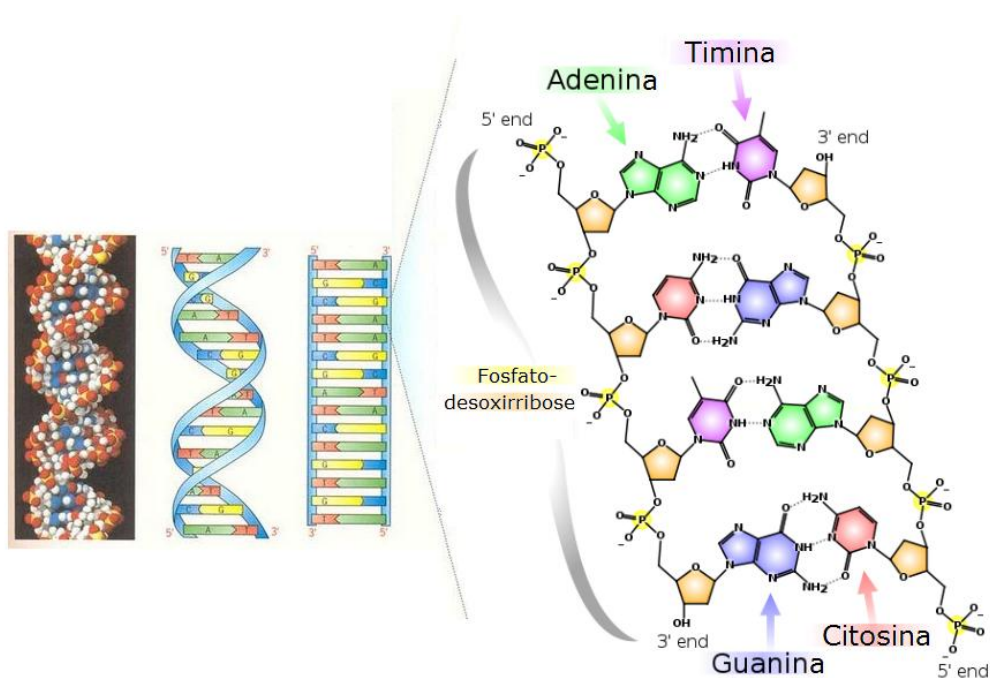
2.8. Biossensores de DNA

A investigação eletroquímica das propriedades elétricas dos ácidos nucleicos e fitas do DNA (ácido desoxirribonucleico) é constante. As eletroatividades do DNA e

RNA têm sido relatadas desde a década de 50, onde mudanças na estrutura do DNA foram utilizadas para estudar sua desnaturação, renaturação e danos causados ao mesmo. Na década de 90, inicia-se o desenvolvimento de sensores de DNA e suas diversas aplicações, que vão desde a detecção de sequências específicas de DNA à detecção de substâncias capazes de interagir com suas bases a partir da mudança na resposta eletroquímica do sensor (Palecek, 2009). Sabendo-se que os elétrons podem migrar através da hélice do DNA para a solução, as análises eletroquímicas dos ácidos nucleicos e seus constituintes podem fornecer informações sobre o mecanismo envolvido nas reações biológicas, tais como: o envelhecimento, a formação e o reparo da lesão oxidativa no DNA.

O DNA é uma macromolécula estruturalmente polimórfica que dependendo da sequência de nucleotídeos e/ou condições-ambientes pode adotar uma variedade de conformações (**Figura 27**). A estrutura de dupla hélice consiste de duas fitas, formadas por grupos fosfatos e pentoses ligadas alternadamente por uma ponte fosfodiéster, que mantém a continuidade da fita (Brett *et al.*, 1998; Rauf *et al.*, 2005).

Figura 27. DNA em dupla fita (double-strand DNA) com representação detalhada do interior hidrofóbico do DNA destacando as fitas formadas pelos nucleotídeos interligados e suas respectivas bases.

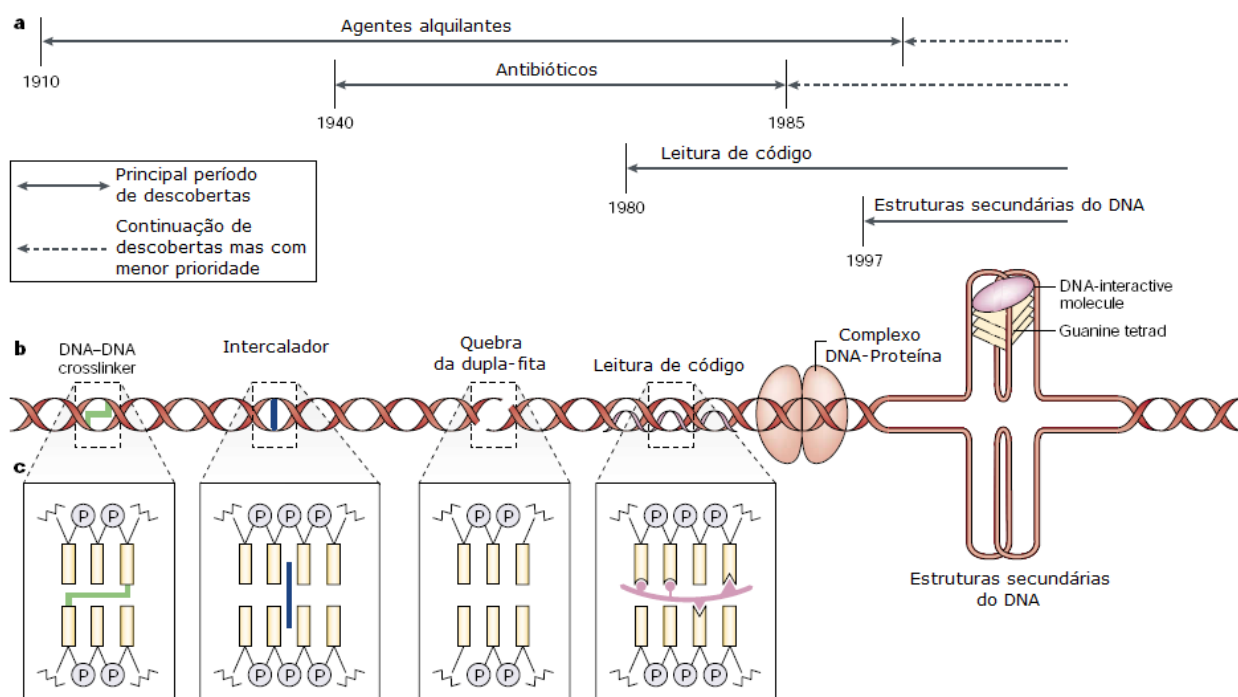


Fontes: Adaptado de <http://manipulacaodavida.blogspot.com> e <http://theuniversalmatrix.com/pt-br/artigos/?p=639>, acessado em 15/12/2010).

Por outro lado, as duas cadeias da dupla fita estão associadas por ligações de hidrogênio entre as bases púricas (adenina e guanina) e pirimídicas (citosina e timina), formando assim, os nucleotídeos. Cada nucleotídeo é formado por um grupo fosfato, um açúcar (desoxirribose) e uma das quatro bases nitrogenadas (**Figura 27**) (Brett *et al.*, 1998; Rauf *et al.*, 2005).

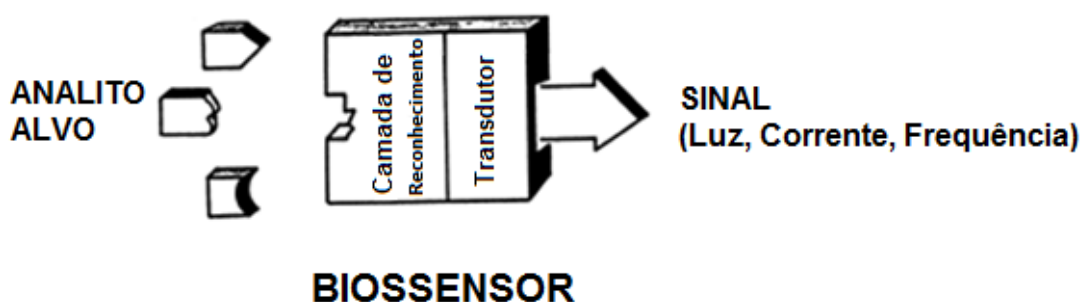
O DNA pode ser modificado por meio de interação com agentes citotóxicos, representando uma lesão bioquímica muito grave, podendo levar ao surgimento de algumas doenças. Tais interações podem ser eletrostáticas, que geralmente são inespecíficas e envolvem os grupos formadores das fitas do DNA (fosfato-pentose) através da intercalação entre os pares de bases, tanto quanto covalentes, (Rauf, 2005) provocando modificações diretas nas bases constituintes do DNA (Boussicault e Robert, 2008). Os processos de intercalação e de ligação nas fendas são os mecanismos mais comuns (**Figura 28**) (Pindur *et al.*, 2005).

Figura 28. Classes de agentes DNA-interativos e suas interações moleculares com DNA. a) Linha do tempo para a descoberta e evolução de agentes DNA-interativos até o presente. b) Ilustração dos tipos de modificação que podem se formar no DNA, incluindo ligações cruzadas, intercalação, clivagem da fita do DNA, e moléculas leitoras de códigos genéticos. A hélice do DNA é também mostrada associada com proteínas, como a topoisomerase II, e com estruturas secundárias do DNA (guanina-quádrupla). c) Detalhes dos modelos, mostrando os diferentes tipos de modificação do DNA.



Um biossensor é um pequeno dispositivo que possui propriedades biológicas de reconhecimento para uso em bioanálise. Cada dispositivo conta com um elemento de reconhecimento biológico ligado a um transdutor físico que converte o sinal biológico em sinal elétrico, sendo proporcional à concentração do analito (Sharma *et al.*, 2003). Biossensores eliminam a necessidade de preparação da amostra e portanto oferecem grande oportunidades para várias aplicações analíticas *in situ* com medidas rápidas e relativo baixo-custo. Para o desenvolvimento de um biossensor é essencial a presença de elementos sensíveis, os quais podem ser células inteiras, anticorpos, enzimas ou ácidos nucléicos que irão formar a camada de reconhecimento que estará integrada com o transdutor via imobilização por adsorção, ligação cruzada ou covalente (**Figura 29**).

Figura 29. Constituintes de um biossensor analítico.



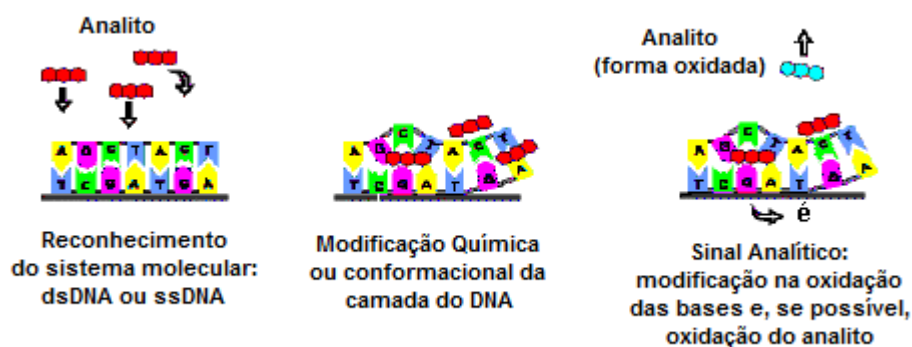
Fonte: Wang, 2000a.

Os biossensores têm se tornado muito populares, nos últimos anos. Novas pesquisas e desenvolvimento nesse campo tiveram importante papel na vida cotidiana. Seus usos variam desde o monitoramento contínuo de processos biológicos e sintéticos, na química industrial e clínica, aos campos de análise de alimentos, do ambiente e no monitoramento e diagnóstico da saúde humana.

Atualmente, os mais fascinantes e promissores sensores são os imunossensores baseados nas reações de afinidade entre anticorpo e antígeno, além dos sensores de DNA, que são baseados na hibridização de oligonucleotídeos do ssDNA (Blonder *et al.*, 1997; Arora *et al.*, 2007; Prabhakar, *et al.*, 2007). Já os biossensores de DNA (**Figura 30**) têm sido aplicados com sucesso tanto para determinação eletroanalítica de fármacos, quanto para o estudo da interação dos

mesmos com o DNA (Rauf *et al.*, 2005). Eles permitem avaliar e prever interações pela observação da ligação das substâncias-alvo com o DNA.

Figura 30. Modo de atuação do biossensor de DNA. O analito se insere entre as fitas do DNA modificando sua conformação levando a exposição das bases, que por sua vez, serão passíveis de oxidação anódica.



Fonte: Montanari, 2009.

Por sua vez, os transdutores são classificados de acordo com seus parâmetros de medida, podendo ser amperométricos (corrente medida sob potencial constante), potenciométricos (potencial medido a corrente constante), piezoelétricos (medidas de mudança em massa), térmicos (medidas de mudanças na temperatura) ou ópticos (detectam mudanças na transmissão de luz) (**Tabela 6**).

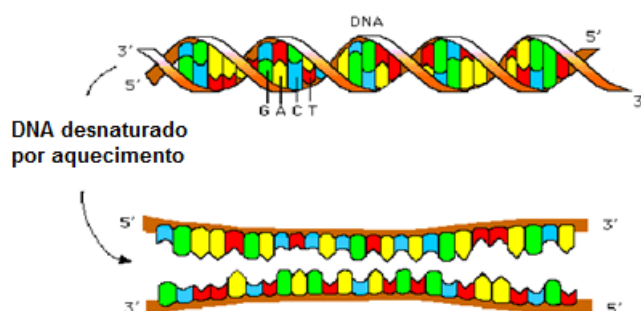
As técnicas analíticas usuais requerem muitas etapas, muito trabalho, tempo e equipamentos caros, ao passo que os biossensores são rápidos, simples, econômicos e podem ser usados em áreas remotas onde a facilidade do uso de instrumentos sofisticados não está disponível (Ho *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2001).

Tabela 6. Vantagens e desvantagens de diferentes tipos de biossensores baseados em DNA (Suman e Kumar, 2008).

Tipo	Princípio	Vantagens	Desvantagens
1. Óptico a) Fibra óptica	Baseado na onda evanescente, permite medidas de ligantes na superfície da fibra.	Medidas remotas <i>in-situ</i> , sensibilidade inerente do caminho óptico.	Equipamento de alto custo e não portátil.
b) Interferometria a Laser	Guias de ondas planares tem campo evanescente responsável pela mudança no índice de refração.	Altamente sensível, detecta até uma célula.	Suscetibilidade à interferência de turbidez.
2. Eletroquímico a) Condutimétrico b) Potenciométrico c) Amperométrico	Mudança na condutância Potencial elétrico Redução/Oxidação.	Rápido, baixo custo.	Solução altamente tamponada pode interferir.
3. Piezoelétrico	Oscilação dos cristais de quartzo em frequência definida, ligação de um analito para mudar a massa do cristal, conseqüentemente oscilação da frequência.	Alta sensibilidade, rápido.	Nível de sensibilidade em célula única não foi demonstrado.
4. Colorimétrico/Strip	Surgimento de cor.	Não requer nenhum instrumento.	Não quantitativo.
5. Biochip de DNA	Baseado na estrutura da molécula	Método quantitativo	Instrumento requerido não muito acessível (ex. GeneChip System, Affymetrix. Wang, 2000a).

Há quase quarenta anos, foram iniciados diversos estudos relacionados ao comportamento eletroquímico do DNA, bem como os efeitos de sua adsorção em diversos tipos de eletrodos (Palecek, 2009). A maioria desses estudos centra-se na análise, identificação estrutural de ácidos nucléicos e a relação entre o comportamento polarográfico do DNA, com sua conformação em solução, observando-se as diferenças nas respostas eletroquímicas existentes entre o DNA em dupla-fita (*double-strand*, dsDNA), em fita-simples (desnaturado, *single-strand*, ssDNA) (**Figura 31**) e o degradado (Palecek, 1996; Jelen *et al.*, 1997; Brett *et al.*, 1997; Rauf *et al.*, 2005).

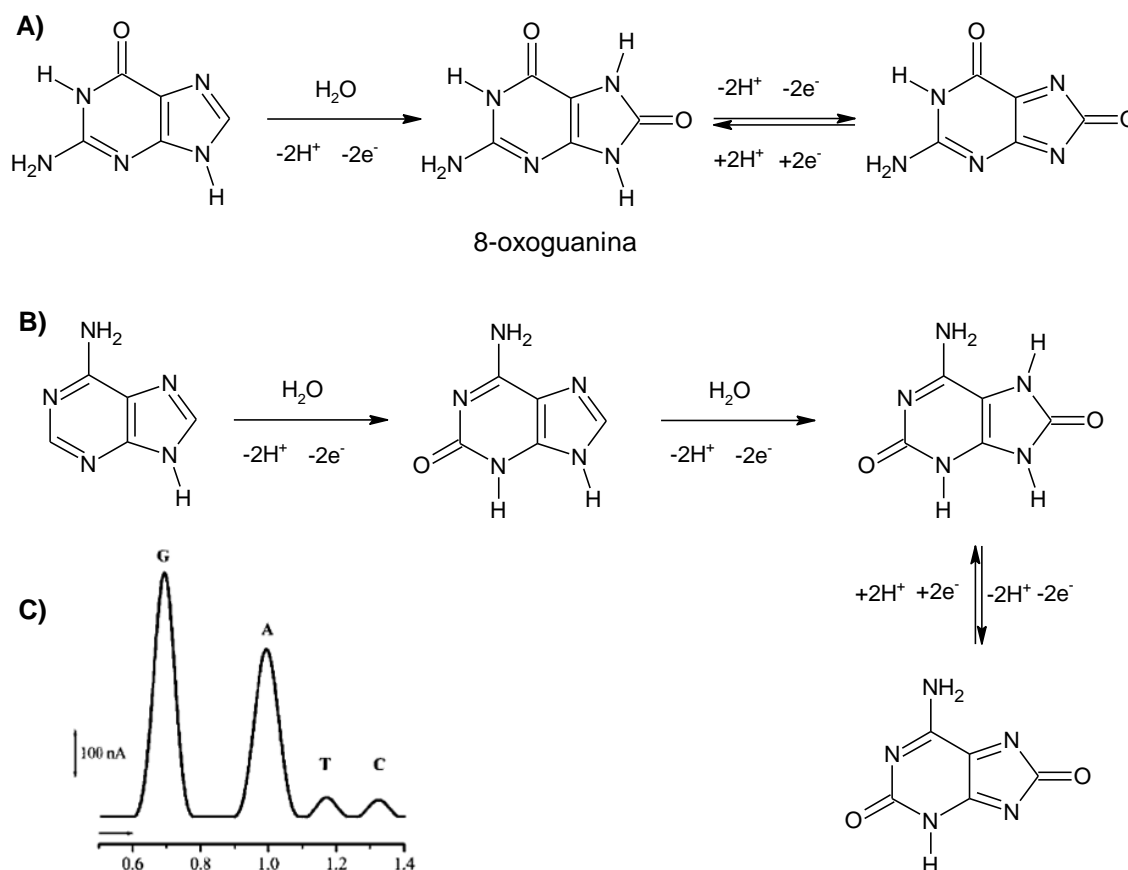
Figura 31. Representação esquemática da desnaturação por aquecimento do DNA fita-dupla (dsDNA) para formação do DNA fita-simples (ssDNA).



Fonte: Autor, 2011.

A eletrooxidação do DNA está relacionada à oxidação dos resíduos das bases púricas (adenina e guanina), sendo as bases pirimídicas (timina e citosina) eletroinativas nessas condições. De modo geral, em pH 7,4, guanina é oxidada em +0,7 V (vs. Ag/AgCl) e adenina em +0,97 V (**Figura 32**).

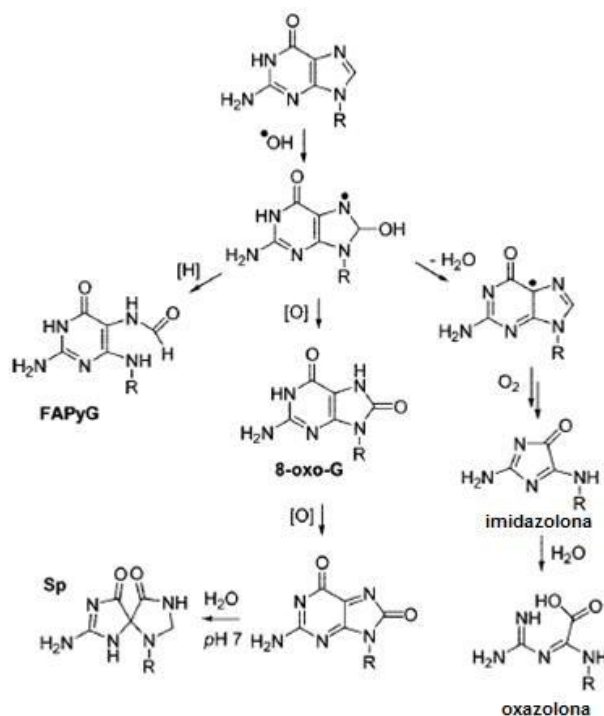
Figura 32. Mecanismo de oxidação para a Guanina (A) e Adenina (B). (C) Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para uma mistura equimolar com $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de guanina, adenina, timina e citosina em tampão fosfato, pH 7,4, em eletrodo de carbono vítreo.



Fonte: Adaptado de Boussicault e Robert, 2008.

Entre as bases constituintes do DNA, a guanina é a mais facilmente oxidável sob condições variadas, que incluem a presença de radicais hidroxila (OH^\bullet) e radicais derivados (radicais alcóxido, radicais alquilperóxido, ânion-radical superóxido O_2^\bullet), peroxinitrito ONOO^- , radicais sulfóxido como SO_4^\bullet e oxigênio simples (Figura 33).

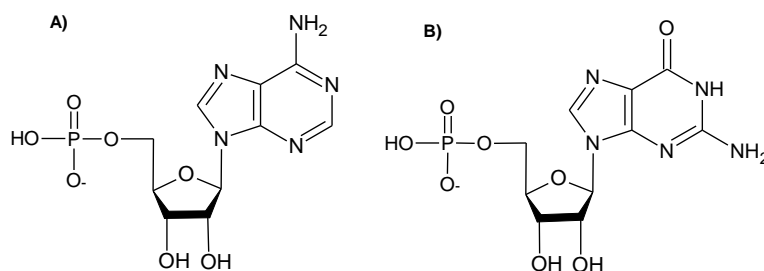
Figura 33. Oxidação da guanina na presença de radicais hidroxilas.



Fonte: Adaptado de Boussicault e Robert, 2008.

Guanina pode ser também oxidada na presença de complexos de metais de transição ou moléculas intercalativas sob condições fotoquímicas ou irradiação ultravioleta direta e também, na superfície de eletrodos em análises eletroquímicas. Estas reações levam a produtos finais como a 8-oxo-7,8-diidro-2'-desoxiguanosina (8-oxo-desoxiguanosina ou 8-oxo-dG), mutagênica, ou a outras lesões mutagênicas, como a 2,6-diamino-5-formamido-4-hidroxipirimidina (FAPy-G), imidazolona, oxazolona ou espiroiminodi-hidantoína (Boussicault e Robert, 2008) (**Figura 33**).

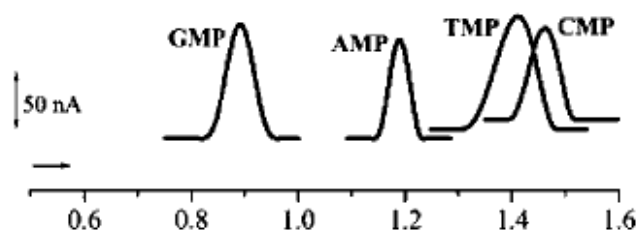
Figura 34. A) Ácido Adenílico (Adenosina Monofosfato - AMP). B) Ácido Guanílico (Guanosina Monofosfato - GMP).



Fonte: Autor, 2011.

Em contrapartida, análises com os nucleotídeos poliguanina (guanosina-5-monofosfato, GMP) e poliadenina (adenosina-5-monofosfato, AMP) (**Figura 34**) têm demonstrado que os picos de oxidação são deslocados para potenciais mais positivos em comparação com as bases (**Figura 35**), o que pode ser atribuído a um efeito indutivo proporcionado pelo substituinte açúcar-fosfato no nucleotídeo. Além do deslocamento dos potenciais, uma diminuição da altura de pico é observada, o qual pode ser justificado por um menor coeficiente de difusão e por um possível aumento nas energias de reorganização associadas com a transferência de carga nessas espécies (Boussicault e Robert, 2008).

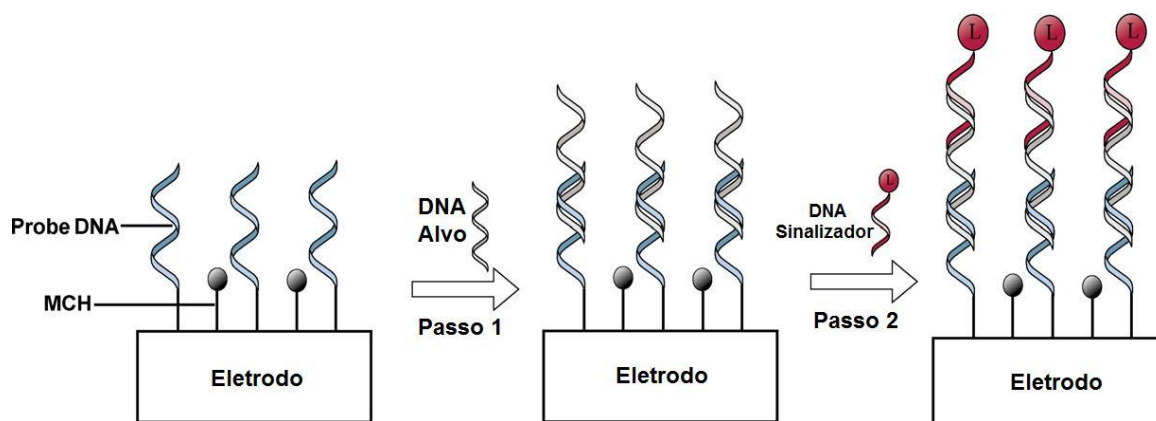
Figura 35. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de guanosina-5-monofosfato (GMP), $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de adenosina-5-monofosfato (AMP), $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de timidina-5-monofosfato (TMP) e $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de citidina-5-monofosfato (CMP). Tampão fosfato, pH 7,4, em eletrodo de carbono vítreo pré-condicionado.



Fonte: Adaptado de Boussicault e Robert, 2008.

Os métodos utilizados para o preparo de um biossensor podem ser divididos em dois grupos principais: os sistemas marcados (labeled) e os sistemas não-marcados (label-free). Os sistemas marcados usam um componente ativo redox que transduz o evento de hibridização do DNA, uma vez que a molécula ativa pode estar imobilizada no eletrodo/DNA, ou estar em solução, tendo em vista que os compostos que se associam ao DNA, podem, geralmente, se ligar à fenda menor ou maior no dsDNA, intercalar entre as duas fitas, ou se ligar as bases expostas no ssDNA. Os métodos que usam sistemas marcados podem ser de alguns tipos: indicadores redox e ligantes de fendas do DNA, transferidores de cargas, método sanduíche e probes marcados (**Figura 36**).

Figura 36. Esquema de um sensor de DNA usando o método sanduíche. Um eletrodo modificado com ssDNA é hibridizado com uma sequência do DNA-alvo (passo 1) e então um DNA sinalizador marcado é adicionado (passo 2). A presença da probe redox na superfície do eletrodo serve para formar a ligação com o DNA-alvo. MCH (6-mercaptop-1-hexanol) serve para reduzir a adsorção não-específica.



Fonte: Autor, 2011

Os sistemas não-marcados, por sua vez, detectam o evento de hibridização através de uma mudança nas propriedades físicas da camada de reconhecimento resultando, desta forma, numa mudança no sinal elétrico. Este método pode ser realizado tanto por oxidação direta ou através do uso de polímeros condutores associados com impedância eletroquímica, quanto por dispositivos que detectam efeitos de campo associados ao DNA.

Alguns trabalhos recentes descrevem o uso de métodos diversificados para a detecção de mudanças no DNA baseados na hibridização, com ênfase nos limites de detecção alcançados. Alguns limites de detecção para os diferentes métodos de transdução são dados na **Tabela 7**.

Tabela 7. Comparações dos limites de detecção para diferentes técnicas eletroquímicas através do uso de sensores de DNA.

Categoria	Método	Objetivo/Detecção	T. Eletroquímica	LD	Referências
Sanduíche	Nanopartículas de ouro carregadas com DNA	Adenosina	VC	$1,8 \times 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$	Zhang <i>et al.</i> , 2008a
	DNA Tiolado (SH-DNA)/ Oligonucleotídeos tiolados (SH-OEG)	Mudanças em Nucleotídeos	VC	$1,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$	Wan <i>et al.</i> , 2010
	Nanotubos de carbono de parede única (SWCNT)	Hibridização do DNA	VPD	$2,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$	Zhang <i>et al.</i> , 2009
Probes Marcados	“Triple Stem DNA Probe”, Azul de Metileno	Mudanças em Nucleotídeos	VCA	$5,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$	Xiao <i>et al.</i> , 2009
	DNA pseudoaglomerado	Sequências Específicas de DNA	VCA	$2,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$	Cash <i>et al.</i> , 2009
	Digoxigenina, E-DNA	Sequências Específicas de Nucleotídeos	Amp	$1,0 \times 10^{-14} \text{ mol L}^{-1}$	Liu <i>et al.</i> , 2008
Marcação Enzimática	Enzima HRP, SH-OEG	Sequências Específicas de Nucleotídeo	Amp	$1,0 \times 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$	Zhang <i>et al.</i> , 2008b
	Peroxidase, 4-cloronaftol	<i>Chlamidia trachomatis</i>	VC	$6,0 \times 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$	Won <i>et al.</i> , 2008
Oxidação Direta	Inosina modificada (Probe), microRNA	mRNA	VPD	$5,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$	Lusi <i>et al.</i> , 2009
	Inosina, amostras de PCR (alvos sintéticos ou desnaturados)	Sequências Específicas de DNA	VPD	$8,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$	Ozkan-Ariksoysal <i>et al.</i> , 2008

Algumas décadas de pesquisa fazendo uso de estratégias de detecção eletroquímica têm permitido avanços relevantes no que diz respeito ao uso de DNA como biossensores, bem como na identificação da hibridização do mesmo em sistemas eletroquímicos. Avanços nas técnicas de marcação do DNA têm permitido o alcance de limites de detecção muito baixos (na faixa de fM), sendo capazes de proporcionar seletividade notável, tal como a detecção de várias sequências de genes em meios complexos.

Várias aplicações de métodos eletroquímicos relacionados ao DNA têm sido demonstradas atualmente, uma vez que a detecção da hibridização do mesmo tem fornecido informações significativas dos processos bioquímicos que ocorrem no eletrodo. Tais aplicações incluem o estudo das interações fármaco-DNA, interações proteína-DNA e detecção de pequenas moléculas. Muitas classes de substâncias são capazes de interagir diretamente com o DNA, caso das quinonas e seus derivados (Babula *et al.*, 2009), atuando por intercalação entre os pares de bases da dupla hélice, conferindo a estas moléculas e seus análogos uma importante atividade anticâncer, através da inibição do processo de divisão celular. Agentes intercalantes de DNA tem uso clínico estabelecido e em geral atuam alterando as propriedades do pareamento das bases do mesmo (Almeida *et al.*, 2005), podendo, desta forma, ser estudados via biossensor de DNA, a partir do qual é esperada uma contribuição na elucidação do mecanismo de ação dessas substâncias, tendo em vista, o desenvolvimento racional de novos fármacos (Rauf *et al.*, 2005).

A facilidade na detecção destes processos bioquímicos proporcionadas pela hibridização eletroquímica do DNA, por meio de biossensores, constitui um guia para pesquisas atuais e futuras, em que a necessidade do entendimento das mudanças genéticas celulares, devido à ação de agentes exógenos, faz-se necessária nos próximos anos.

3. OBJETIVOS

3.1. Gerais

Investigar a bioeletroquímica de quinonas e correlacionar com atividades biológicas/farmacológicas.

3.2. Específicos

- Realizar o estudo eletroquímico da oncocalixona, juglona e biflorina, utilizando técnicas tais como voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial.
- Realizar análise eletroquímica da interação de algumas quinonas bioativas e derivados (oncocalixona, juglona e biflorina) com ssDNA e suas respectivas bases.
- Determinar a constante de associação para o complexo DNA-Quinona (oncocalixona, juglona e biflorina) formado por meio de análise eletroquímica.
- Determinar o pKa da juglona, utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial.
- Desenvolver métodos de quantificação da oncocalixona em concentrações nanomolares, utilizando sensor eletroquímico.
- Realizar a análise eletroquímica de uma série de quinonas bioativas visando a comparação dos parâmetros eletroquímicos com os dados obtidos em bioensaios moluscidas contra *Biomphalaria glabrata*, larvicidas frente a *Aedes aegypti* e antitumorais em diferentes linhagens celulares.

4. METODOLOGIA

4.1. Substâncias e Soluções

Todas as substâncias utilizadas no presente trabalho foram de grau analítico:

- Fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), ácido acético (CH_3COOH), acetato de sódio (CH_3COONa), etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), hidróxido de sódio (NaOH), ácido clorídrico (HCl), dimetil formamida (DMF), TBABF_4 e acetonitrila (CH_3CN), foram adquiridos de Merck, Rio de Janeiro, Brasil.
- Ácido desoxirribonucléico (dsDNA), sal de sódio Tipo I, altamente polimerizado de Calf Tymus, estocado 2–8 °C, conteúdo de sódio 6,2% e água 13%, foi adquirido de Sigma, São Paulo, Brasil.
- Guanina (98%) e adenina (99%) (**Figura 27**, pg. 74), sal de potássio do ácido poliguanílico e sal de potássio do ácido poliadenílico (**Figura 34**, pg. 81), foram adquiridos de Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil.
- **Oncocalixona A** ($\text{MM } 302 \text{ g mol}^{-1}$, p.f. 207-208°C): quinona cedida pela Profa. Dra. Otília Pessoa, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará em Fortaleza, Brasil, em colaboração com o Laboratório de Eletroquímica do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas. A substância em questão foi isolada das partes da madeira da planta *Auxemma oncocalyx* coletada no estado do Ceará, e purificada de acordo como descrito por Pessoa e colaboradores (Pessoa et al., 1993; Pessoa et al., 1995; Pessoa et al., 2004) (**Figura 16**, pg. 60).
- **Juglona (Q1)** (5-hidroxi-1,4-naftoquinona, $\text{MM } 174,16 \text{ g mol}^{-1}$, P.F. 161-163 °C): quinona adquirida de Sigma-Aldrich, Brasil e usada sem tratamento posterior (**Figura 17**, pg. 61).

- **Biflorina** (6,9-dimetil-3-(4-metil-3-pentenil)nafta[1,8-*bc*]-piran-7,8-diona, MM 308 g mol⁻¹): quinona cedida para análise pela pesquisadora Marne C. Vasconcellos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas em colaboração com o Laboratório de Eletroquímica do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas. A substância em questão foi isolada das partes da madeira da planta *Capraria biflora* coletada no estado do Ceará, e purificada de acordo como descrito por Fonseca e colaboradores (**Figura 20**, pg. 64) (Fonseca *et al.*, 2003).
- **Outras Quinonas Analisadas:** α -lapachona, 5-acetoxi-1,4-naftoquinona (Q2), 5-metoxi-1,4-naftoquinona (Q3), 2-bromo-5-hidroxi-1,4-naftoquinona (Q4), 2-bromo-5-acetoxi-1,4-naftoquinona (Q5), 2-bromo-5-metoxi-1,4-naftoquinona (Q6), 3-bromo-5-hidroxi-1,4-naftoquinona (Q7), 3-bromo-5-metoxi-1,4-naftoquinona (Q9), foram cedidas pela Dra. Maria Teresa Molina, do Instituto de Química Médica – Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madri, Espanha (**Tabela 8**).

Tabela 8. Estruturas de algumas quinonas analisadas no presente trabalho.

SUBSTÂNCIA	ESTRUTURA
α -Lapachona	
5-Acetoxi-1,4-naftoquinona (Q2)	
5-Metoxi-1,4-naftoquinona (Q3)	
2-Bromo-5-hidroxi-1,4-naftoquinona (Q4)	
2-Bromo-5-acetoxi-1,4-naftoquinona (Q5)	
2-Bromo-5-metoxi-1,4-naftoquinona (Q6)	
3-Bromo-5-hidroxi-1,4-naftoquinona (Q7)	
3-Bromo-5-metoxi-1,4-naftoquinona (Q9)	

As soluções tampões utilizadas nas análises eletroquímicas em VC, VPD e VOQ, foram preparados com água purificada em um sistema Milli-Q Millipore (18

Mohm), com seus valores de pH medidos em pH-metro com eletrodo de vidro combinado, modelo Quimis Q400A.

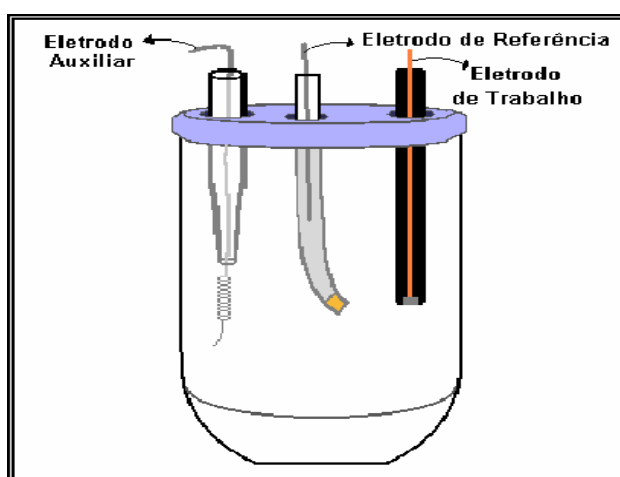
4.2. Procedimentos Gerais

4.2.1. Estudos Eletroquímicos

As análises eletroquímicas em voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada foram realizadas em um potenciostato Autolab PGSTAT-30, Echo Chemie (Utrecht, Holanda) acoplado a um computador com o software GPES 4.9.

Para estas análises, foi utilizada uma cela eletroquímica contendo 5,0 mL do eletrólito suporte (tampão utilizado na análise), com eletrodo de $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{Cl}^{-1}$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) como referência, um fio de platina como auxiliar e eletrodo de carbono vítreo (3 mm) como eletrodo de trabalho (**Figura 37**). Para análises na região da redução e em meio aprótico, oxigênio foi removido por meio de borbulhamento de argônio ou nitrogênio na solução, durante 5 a 10 min.

Figura 37. Esquema representativo da cela eletroquímica e dos eletrodos utilizados.



Fonte: Autor, 2011.

4.2.2. Análises com DNA

4.2.2.1. Preparo de Solução Tampão

Nas análises com ssDNA, foi utilizado como eletrólito suporte, solução tampão acetato (pH 4,5, força iônica $0,2 \text{ mol L}^{-1}$) (Perrin, 1974), preparada com água purificada em um sistema Milli-Q Millipore e fervida, com o intuito de eliminar eventuais microrganismos que pudessem modificar a estrutura do DNA. Para o preparo do tampão foram adicionado 0,717 mL de ácido acético glacial e 0,59 g de acetato de sódio em 100 mL de água fervida.

Nas análises eletroquímicas da oncocalexona em meio prótico foi utilizado como eletrólito suporte solução de tampão fosfato (pH 7,0, força iônica 0,2) (Perrin, 1974), preparada com água purificada em um sistema Milli-Q Millipore. Para o preparo do tampão foram adicionados 0,471 g de fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) e 0,785 g de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) em 100 mL de água. O valor de pH da solução foi medido em pH-metro modelo Quimis Q400A.

4.2.2.2. Preparo de Solução Estoque da Quinona Analisada

Para o estudo com DNA, uma solução estoque de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de cada quinona em análise foi preparada em tampão em meio etanólico (20%, v/v) devido à baixa solubilidade delas em meio aquoso.

Nos estudos da interação de cada quinona (oncocalexona, biflorina, juglona e α -lapachona) com ssDNA, na análise da região da oxidação em VPD, foram adicionadas alíquotas da solução estoque, no intuito de se obter concentrações finais na cela eletroquímica de $1,0 \times 10^{-5}$ a $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Tal análise visou verificar a mudança nas correntes e nos potenciais de oxidação das bases do ssDNA, em relação à variação de concentração da substância analisada.

4.2.2.3. Preparo de Solução de ssDNA

A solução de ssDNA, utilizada nas análises de interação com as quinonas em VPD, foi preparada dissolvendo 3,0 mg de dsDNA (calf thymus) em 1,0 mL de ácido clorídrico ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) dispostos em um tubo de ensaio fechado, sendo aquecido em

banho-maria (100 °C) por 1 h. Após esse período, a solução foi neutralizada com 1,0 mL de hidróxido de sódio (1,0 mol L⁻¹) e completado o volume para 10 mL com tampão acetato, pH 4,5, contendo 20% (v/v) de etanol, obtendo uma solução final com concentração de 0,3 g L (De Abreu *et al.*, 2008; De Moura, 2008).

4.2.2.4. Análise da Interação do ssDNA com as Quinonas Oncocalixona, Biflorina e Juglona

Para a análise da interação de cada substância com ssDNA, em VPD, foram adicionados à cela eletroquímica, 5,0 mL de solução de ssDNA preparada previamente. Em seguida, uma única varredura foi realizada na faixa de 0 a +1,4 V (Ag|AgCl|Cl⁻, 0,1 mol L⁻¹). Os parâmetros voltamétricos utilizados foram: amplitude de pulso = 50 mV, potencial de salto (step potential) = 10 mV, velocidade de varredura = 10 mV s⁻¹ e tempo de modulação = 50 ms. Dois picos correspondentes à oxidação das bases guanina e adenina puderam ser observados. Após a primeira varredura, o eletrodo foi lavado, polido e retornado à solução de ssDNA. Esta etapa foi repetida ao menos três vezes, sendo verificado se as correntes de oxidação, bem como os potenciais de oxidação das respectivas bases, permaneciam similares. Depois da etapa de limpeza da superfície do eletrodo, o mesmo foi inserido na cela contendo ssDNA e a substância a ser analisada, nas concentrações de 1,0×10⁻⁵ mol L⁻¹ a 4,0×10⁻⁴ mol L⁻¹, e, desta forma, sendo repetido o experimento em VPD (De Abreu *et al.*, 2008; Diculescu *et al.*, 2005). Uma última etapa foi empregada nas análises em VPD, por meio do uso de um eletrodo de carbono vítreo limpo imerso em uma solução de 4,0×10⁻⁵ mol L⁻¹ da quinona em questão. A corrente de pico de oxidação de cada quinona, em experimentos individuais, foi usada para comparação com as obtidas com o ssDNA, em presença e ausência de cada uma.

Os resultados obtidos nesses experimentos foram comparados com um controle negativo (α -lapachona), analisado nas mesmas condições mencionadas acima.

4.2.2.5. Estudo Voltamétrico da Interação DNA-quinona (Oncocalixona, Biflorina e Juglona) e Determinação da Constante de Associação

Para a determinação voltamétrica da constante de associação entre cada quinona e ssDNA, foi necessária a avaliação da variação de corrente de redução referente à quinona analisada, em VPD, por meio do aumento da concentração de ssDNA presente na solução contida na cela eletroquímica. Os parâmetros voltamétricos utilizados nesta análise foram: amplitude de pulso = 50 mV, potencial de salto (step potential) = 10 mV, velocidade de varredura = 10 mV s⁻¹ e tempo de modulação = 50 ms, faixa de potencial analisada: 0,3 a -0,4 V (Ag|AgCl|Cl⁻, 0,1 mol L⁻¹).

Uma única varredura foi realizada na solução da quinona de concentração 0,02×10⁻³ mol L⁻¹ (preparada previamente, de acordo com o tópico preparo de solução estoque) contida na cela eletroquímica. Após a primeira varredura, o eletrodo foi lavado, polido e retornado à solução da quinona. Esta etapa foi repetida ao menos três vezes, para a verificação da similaridade entre a corrente de redução obtida na primeira varredura e nas subsequentes. Depois da etapa de limpeza da superfície do eletrodo, o mesmo foi inserido na cela contendo a quinona com adições sucessivas de ssDNA, nas concentrações de 3,0 a 50,0 µg mL⁻¹, sendo repetido o experimento após cada mudança de concentração (Tian *et al.*, 2008; Carter *et al.*, 1989). A variação da corrente de pico de redução, bem como a variação de potencial de cada quinona, em experimentos individuais foram utilizadas para a determinação do tipo de interação entre as espécies envolvidas e para a determinação da constante de associação entre a substância e o DNA pela aplicação da seguinte equação (Sha, *et al.*, 2009):

$$\log(1/[DNA]) = \log K + \log[I_{DNA-Qui}/(I_{Qui} - I_{DNA-Qui})] \quad (8)$$

em que K é a constante de associação, I_{Qui} e $I_{DNA-Qui}$ são as correntes de pico da quinona em questão na ausência e presença de DNA (complexo DNA-Quinona), respectivamente.

Nos estudos com ssDNA, para uma melhor análise dos voltamogramas de pulso diferencial, correções de linha de base foram realizadas por meio do uso do software GPES 4.9 da Autolab.

4.2.2.6. Preparo de Solução de Guanina e Adenina

Para a análise da interação de cada quinona com cada base, individualmente, em VPD, foi preparada uma solução de guanina ou adenina de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, através da dissolução de 0,30 mg de guanina ou 0,27 mg de adenina em 20 mL de tampão acetato/etanol (20%, v/v), sonificado por 3 minutos, e prontamente sendo disposta para análise.

4.2.2.7. Análise da Interação entre as Bases Guanina e Adenina com Diferentes Quinonas (*Oncocalixona*, *Biflorina* e *Juglona*)

5,0 mL de uma solução de guanina (preparada como descrito anteriormente) foram adicionados à cela eletroquímica e uma única varredura, em VPD, foi conduzida na faixa de potencial de 0 a +1,4 V ($\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{Cl}^-$, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), sendo, desta forma, obtido um pico correspondente à oxidação da base guanina. Após essa primeira varredura, o eletrodo foi lavado, polido e retornado à solução de guanina. Esta etapa foi repetida ao menos três vezes, verificando-se se as correntes de oxidação, bem como o potencial de oxidação da respectiva base, permaneciam similares. Após essa etapa, o eletrodo de carbono vítreo foi inserido na solução de guanina, onde foram adicionadas (a essa solução) alíquotas da solução estoque da quinona a ser analisada, para a obtenção de concentrações finais na faixa de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Imediatamente após cada adição do composto, uma nova varredura foi realizada.

Para a análise da adenina foram realizados os mesmos passos utilizados na análise da guanina como descritos acima.

4.2.2.8. Preparo de Solução de Ácido Poliguanílico (*poliG*) e Poliadenílico (*poliA*)

Para o preparo de uma solução de ácido poliguanílico (*poliG*), 1,0 mg do sal de potássio desse ácido foi dissolvido em 10 mL de tampão acetato (com 20%, v/v, de etanol) e disposto para análise em VPD. No entanto, devido à baixa solubilidade do ácido poliadenílico (*poliA*) em tampão acetato, 3,0 mg do sal de potássio desse ácido foram adicionados a 1,0 mL de ácido clorídrico ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) e aquecidos em

banho-maria a 100 °C, em um tubo de ensaio com tampa, por 30 minutos para a completa dissolução do sal. Após o aquecimento, processo que leva à remoção da base adenina por meio da quebra das ligações glicosídicas da purina, a solução foi neutralizada com 1,0 mL de hidróxido de sódio ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) e diluídos para 10 mL de tampão acetato (com 20%, v/v, de etanol), sendo, portanto, disposta para análise em VPD.

4.2.2.9. Análise da Interação entre os Ácidos Poliguanílico (poliG) e Poliadenílico (poliA) com as Quinonas

5,0 mL de solução de poliG, preparada previamente, foram adicionados à cela eletroquímica e uma única varredura foi realizada, em VPD, na faixa de 0 a +1,4 V ($\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{Cl}^-$, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Um único pico correspondente à oxidação da base guanina do poliG foi observado. Após a primeira varredura, o eletrodo foi lavado, polido e retornado à solução do ácido poliG, onde a repetibilidade foi verificada por meio da repetição de, ao menos, três vezes, o passo anterior, sem observação de variação da corrente de oxidação e do potencial de pico do ácido poliG. Após a limpeza da superfície, o eletrodo de carbono vítreo foi inserido na solução de poliG, onde foram adicionados, a essa solução, alíquotas da quinona a ser analisada, para a obtenção das concentrações finais de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ na cela eletroquímica. Imediatamente após cada adição da quinona, uma nova varredura foi realizada.

As análises com poliA seguiram as mesmas etapas descritas nas análises com poliG, como pode ser visto acima.

4.2.3. Análises Eletroquímicas da Oncocalixona

4.2.3.1. Análises em Meio Aprótico em Voltametria Cíclica

Para a análise da oncocalixona em meio aprótico, 0,151 mg da substância foram dissolvidos em 5,0 mL de DMF/TBABF₄ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) contidos na cela eletroquímica, para a obtenção da concentração final de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ da quinona. Em seguida, argônio foi borbulhado na solução por ao menos 5 minutos para a retirada de oxigênio, mantendo o fluxo de gás acima da solução, durante as

análises. Foram feitas várias varreduras eletroquímicas, em VC, na faixa de potencial compreendida entre 0,3 a -0,7 V, utilizando as velocidades de varreduras de 10, 20, 35, 50, 75, 100, 200, 400 e 500 mV s⁻¹.

4.2.3.2. Análises em Meio Prático em Voltametria Cíclica

Para esta análise, uma solução estoque de $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ da quinona foi preparada por meio da dissolução de 0,75 mg de onocalixona em 250 µL de tampão fosfato/etanol (20%, v/v), pH 7,0. 50 µL da solução estoque foram adicionados a cela eletroquímica contendo 5,0 mL de tampão fosfato/etanol (20%) para a obtenção da concentração final $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Argônio foi borbulhado na solução por ao menos 5 minutos para a retirada de oxigênio, mantendo-o acima da solução, durante as análises. Em seguida, foram feitas várias varreduras eletroquímicas, em VC, na faixa de potencial compreendida entre 0,3 a -0,7 V, nas velocidades de varredura de 10, 20, 30, 35, 50, 70, 75, 200, 300, 400 e 500 mV s⁻¹.

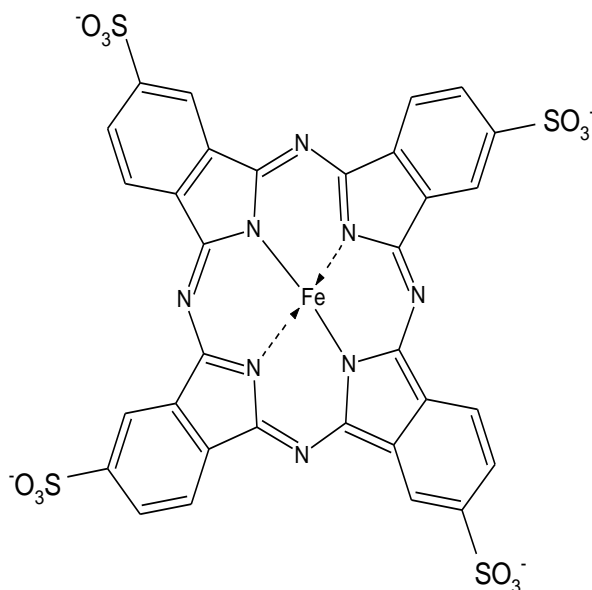
4.2.3.3. Desenvolvimento de um Sensor para Oncocalixona

4.2.3.3.1. Substâncias e Soluções

Todas as substâncias utilizadas nessa análise foram de grau analítico.

- Ftalocianina Tetrassulfonada de Ferro (II) (FeTSPc), sintetizada e purificada de acordo com o procedimento de Weber e Busch (Weber, 1965), foi cedida para uso pelo Professor Dr. Lauro Tatsuo Kubota, da Universidade Estadual de Campinas em colaboração com o Laboratório de Eletroquímica do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (**Figura 38**).

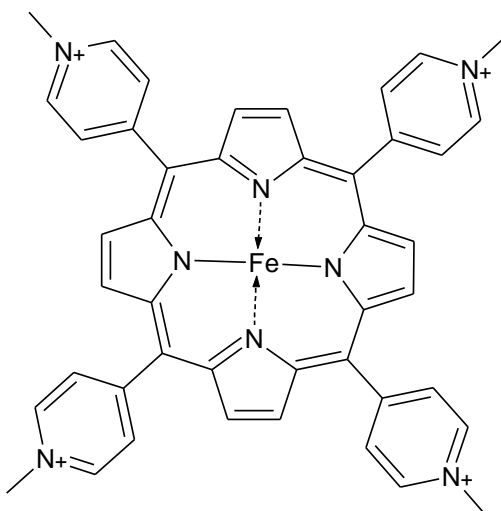
Figura 38. Ftalocianina Tetrassulfonada de Ferro(II) (FeTSPc).



Fonte: Autor, 2011.

- Tetra-(*N*-metil-4-piridil)-porfirina de Ferro (III) (FeT₄MPyP) foi adquirida de Porphyrin Products Inc. (UT, USA) e cedida para uso pelo Professor Dr. Lauro Tatsuo Kubota, da Universidade Estadual de Campinas em colaboração com o Laboratório de Eletroquímica do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (**Figura 39**).

Figura 39. tetra-(*N*-metil-4-piridil)-porfirina de Ferro(III) (FeT₄MPyP).



Fonte: Autor, 2011.

- Fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), acetonitrila (CH_3CN), hidróxido de sódio (NaOH) e ácido clorídrico (HCl) foram adquiridos da Merck, Rio de Janeiro, Brasil, PIPES [piperazine-*N-N'*-bis(2-ethanesulfonic acid)] e HEPES [*N*-(2-hydroxyethyl)piperazine-*N*-(2-ethanesulfonic acid)] foram adquiridos de SIGMA, St. Louis, EUA.

Os tampões fosfato, McIlvaine, HEPES e PIPES utilizados nesse experimento e as soluções de FeT_4MPyP e FeTSPc foram preparados com água purificada em um sistema Milli-Q Millipore, sendo os valores de pH das soluções tampões determinados pelo pH-metro modelo Corning pH/Ion Analyzer 350.

4.2.3.3.2. Medidas Voltamétricas

As medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato Autolab PGSTAT-30 da Echo Chemie (Utrecht, Holanda) acoplado a um computador com o software GPES 4.9. Uma cela eletroquímica contendo 5,0 mL de solução de tampão fosfato com eletrodo de calomelano saturado (SCE) como referência, um fio de platina como auxiliar e eletrodo de carbono vítreo como eletrodo de trabalho foram usados nas medidas. Oxigênio foi removido através do borbulhamento de nitrogênio da solução, durante 5 a 10 min. Os parâmetros da voltametria de onda quadrada (VOQ) utilizados, após a otimização, foram: step potential 0,002 V, amplitude de pulso (ΔE_{sw}) 0,05 V e frequência (f) 100 Hz.

4.2.3.3.3. Construção do Sensor

Para esta análise foram utilizados vários complexos metálicos na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, com o intuito de observar quais deles apresentavam melhor resposta eletroquímica frente à onco-calixona ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em acetonitrila/tampão fosfato, 1:1, v/v, pH 7,0) presente na cela eletroquímica. Os complexos analisados sozinhos e combinados foram: NiTsPc, FeTsPc, CoTsPc, LiTCNQ, TCNQ, TCNE, $\text{Cu}(\text{acac})_2$, FePor e FeT_4MPyP . A combinação dos complexos FeTSPc e FeT_4MPyP , formando uma bicamada na superfície do eletrodo

foi a que apresentou melhor resposta eletroquímica em relação aos outros complexos testados, e portanto, utilizado nas demais análises.

Na construção do sensor, um eletrodo de carbono vítreo, com área geométrica de $0,071 \text{ cm}^2$ (3 mm, BAS-USA), foi usado para as medidas. Antes da modificação, a superfície do eletrodo foi tratada de acordo com procedimento descrito por Zhu e Nan-Qiang (Zhu, 1998). Depois do processo de limpeza do eletrodo, uma camada formada eletrostaticamente foi preparada na superfície do eletrodo pela deposição de gotas, transferindo $15 \mu\text{L}$ de uma solução de FeTSPc, nas concentrações de 0,01, 0,05, 0,1, 0,15 e $0,19 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para a superfície do eletrodo e deixado secar a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 min. Depois de 10 min, $15 \mu\text{L}$ da solução de FeT₄MPyP, nas concentrações de 0,01, 0,05, 0,1, 0,15, e $0,19 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, foram adicionados à superfície do eletrodo e também deixado secar a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ por um período de 10 min. As bicamadas foram preparadas pela repetição do procedimento descrito acima. Presumivelmente, a interação entre os complexos FeTSPc e FeT₄MPyP ocorrem pelo pareamento iônico entre o grupo amônio ($-\text{C}_6\text{H}_8\text{N}^+$) da porfirina de ferro e o aniônico $-\text{SO}_3^-$ da ftalocianina tetrassulfonada. Para a otimização do sensor, uma bicamada formada com os complexos FeTSPc e FeT₄MPyP foi preparada.

4.2.3.3.4. Otimização dos Parâmetros Experimentais

Para a construção do sensor para a oncocalicxona foi necessário a otimização dos parâmetros experimentais, no intuito de se obter a melhor resposta eletroquímica para o sensor proposto. Neste sentido, a influência de diferentes valores de pH (6,0, 6,4, 7,0, 7,4 8,0), do tipo de tampão (HEPES, McIlvaine, PIPES e fosfato), de diferentes concentrações de tampão (0,025, 0,050, 0,10, 0,15 e 0,20 mol L^{-1}), dos efeitos da frequência (20 a 140 Hz com potencial de salto (step potential) de 0,002 V) e da amplitude de pulso (0,010–0,080 V com potencial de salto (step potential) de 0,002 V), na resposta do sensor foram verificados. As melhores respostas obtidas para cada otimização, possibilitaram a construção da curva analítica para a oncocalicxona em concentrações nanomolares.

4.2.3.3.5. Construção da Curva Analítica

Após a otimização dos parâmetros experimentais para o sensor proposto, uma curva analítica foi construída pela adição de alíquotas de oncocalixona (solução estoque de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em acetonitrila/água (1:1, v/v), mantido sob atmosfera de nitrogênio e no escuro) na cela de medida contendo solução de tampão fosfato (0,05 mol L⁻¹) em pH 7,0. A técnica empregada para esta análise foi a voltametria de onda quadrada (VOQ) (Souza *et al.*, 2003), sendo utilizados os parâmetros de VOQ otimizados descritos anteriormente. Para a construção da curva analítica, foi necessária a adição de quantidades sucessivas de oncocalixona a partir da solução estoque preparada previamente para a obtenção das concentrações 0,005, 0,044, 0,098, 0,198, 0,299, 0,503, 0,704 e $1,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, sendo as medidas voltamétricas realizadas imediatamente após cada adição e com manutenção da atmosfera de nitrogênio sobre a solução.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados pelo uso das proporções $S_{\text{branco}} \times 3\sigma/\text{slope}$ e $S_{\text{branco}} \times 10\sigma/\text{slope}$, respectivamente, em que S_{branco} corresponde ao sinal do branco e σ é o desvio padrão do valor médio para 10 voltamogramas do branco de acordo com recomendações da IUPAC (Analytical Methods Committee, 1987; IPAC, 2011).

4.2.3.4. ESR (Ressonância de Spin do Elétron)

Todos os experimentos de ESR foram resultado de uma colaboração com o professor Claudio Olea-Azar, do Departamento de Química Inorgânica y Analítica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, sendo, portanto, realizados por seu grupo.

4.2.3.4.1. Procedimento Experimental

O espectro de ESR foi realizado em banda de raio X (9,85 GHz), usando o espectrômetro Bruker ECS 106 com uma cavidade retangular e campo de modulação de 50 kHz. A constante de acoplamento hiperfina (HFCC) foi estimada

em 0,05 G. Para os estudos com ESR (trabalho efetuado na Universidade do Chile) foi necessária a produção do ânion-radical da oncocalicxona “*in situ*”, por meio da redução eletroquímica da quinona, em DMSO, aplicando-se um potencial correspondente ao da primeira onda de redução monoeletrônica obtida nos experimentos voltamétricos (podendo ser visto no tópico 5.1.1., pg. 107).

4.2.4. Análises Eletroquímicas da Biflorina

Para os estudos eletroquímicos, foi preparada uma solução estoque da biflorina de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (40%, v/v, de etanol), dissolvendo-se 0,610 mg da substância em 800 μL de etanol, completando-se para 2,0 mL com tampão acetato (pH 4,5).

Para o estudo de oxidação e redução, em VC e VPD, 500 μL da solução estoque da substância, preparada previamente, foram retirados e adicionados a cela eletroquímica contendo 4,5 mL de tampão acetato etanólico (40%, v/v), cuja concentração final obtida para análise foi de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Para os estudos da redução, argônio foi borbulhado na solução para retirada de oxigênio e mantido acima da mesma durante os experimentos. Devido à utilização de etanol na solução analisada, um trap, contendo etanol, foi usado para evitar modificação no conteúdo de etanol no decorrer das análises. Os parâmetros utilizados nas análises, em VPD, foram: amplitude de pulso: 0,05 V, largura de pulso: 70 ms e velocidade de varredura: 10 mV s^{-1} . Para as análises em VC, foram feitas análises de velocidade de 0,01 a $1,0 \text{ V s}^{-1}$.

Análises da interação da biflorina com DNA e suas respectivas bases, bem como a determinação da constante de associação da mesma foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos anteriormente (tópico 4.2.2., pg. 91).

4.2.5. Análises Eletroquímicas da Juglona

4.2.5.1. Determinação do pKa da Juglona Através da Análise do pH

4.2.5.1.1. Preparo de Soluções de Tampão Fosfato

Para a análise eletroquímica do comportamento da juglona em diferentes valores de pH, foi necessária a preparação de várias soluções de tampão fosfato com valores de pH variando de 0,8 a 12,36, mantendo-se a força iônica da mesma em $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. A **Tabela 9** mostra as quantidades dos reagentes necessários para preparar cada solução, de acordo com o pH analisado, para um volume total de 200 mL de tampão fosfato (Perrin, 1974; Christian, 2004).

Tabela 9. Preparo do tampão fosfato (Adaptado de Perrin, 1974; Christian, 2004).

85% H ₃ PO ₄ , mL	KH ₂ PO ₄ , g	Na ₂ HPO ₄ , g	Na ₃ PO ₄ , g	~pH
0,79	5,44	-	-	0,8
0,55	5,44	-	-	2,50
0,27	5,44	-	-	3,22
0,04	5,44	-	-	3,85
-	5,386	0,0352	-	4,83
-	3,680	0,805	-	6,85
-	0,122	1,86	-	7,96
-	-	1,894	-	9,18
-	-	1,784	0,1505	10,06
-	-	1,633	0,3673	12,36

4.2.5.1.2. Preparo de Solução Estoque da Juglona

Para a determinação eletroquímica do pKa da juglona, uma solução estoque de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ da substância foi preparada em solução aquosa com 20% (v/v) de etanol, dissolvendo-se 0,87 mg da quinona em 1,0 mL de etanol, sendo, em seguida, o volume completado para 5,0 mL com água Mili-Q. Após o preparo, a solução foi disposta para a análise eletroquímica em questão.

4.2.5.1.3. Estudo do Comportamento Eletroquímico da Juglona em Diferentes Valores de pH

Para a análise do comportamento eletroquímico da juglona, em VPD, de acordo com o pH da solução tampão, foi necessária a retirada de uma alíquota de 500 μL da solução estoque da quinona (preparada previamente) e diluída em 4,5 mL de solução de tampão fosfato contida na cela eletroquímica, obtendo-se uma concentração final para a juglona de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Argônio foi utilizado para retirar oxigênio da solução, mantendo-o acima da solução durante as medidas. Análises voltamétricas de pulso diferencial foram realizados para cada pH analisado. Os parâmetros utilizados nas análises em VPD foram: amplitude de pulso: 0,05 V, velocidade de varredura: $5,0 \text{ mV s}^{-1}$, faixa de potencial aplicado: 0,3 a -0,9 V. A análise do potencial de pico de redução da juglona em relação a diferentes valores de pH, possibilitou a determinação do pKa da mesma de acordo com os dados observados.

4.2.6. Análises Eletroquímicas de Quinonas e Bioensaios

As análises eletroquímicas de algumas quinonas bioativas Q1, Q2, Q3, Q4, Q5, Q6, Q7 e Q9 (listadas na **Tabela 8**, pg. 89), foram realizadas em meio tamponado (tampão fosfato, pH 7,0, preparado previamente) em VPD e VC. Os parâmetros utilizados nas análises em VPD foram: amplitude de pulso: 0,05 V, velocidade de varredura: $5,0 \text{ mV s}^{-1}$, faixa de potencial aplicada: 0,2 a -0,6 V. Em VC foi utilizada a velocidade de varredura de $0,100 \text{ V s}^{-1}$ na faixa de potencial de 0,2 a -0,6 V.

Para estas análises, foi preparada uma solução etanólica de cada quinona (tampão fosfato etanólico, 40%, v/v), com concentração de $4,76 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, sendo dispostos 5,0 mL, dessa solução, na cela eletroquímica. Argônio foi utilizado para retirar oxigênio da solução, mantendo-o acima da solução, durante as medidas. Voltamogramas cíclicos e de pulso diferencial foram realizados para cada quinona analisada.

4.2.6.1. Estudo da Atividade Moluscicida

Os bioensaios para a atividade moluscicida foram realizados no intuito de se verificar qual das quinonas analisadas seria a mais ativa biologicamente. O teste para a atividade moluscicida (**Figura 40**) envolve, basicamente, a imersão do caramujo *Biomphalaria glabrata* ou de sua desova em uma solução aquosa das substâncias a serem analisadas.

Figura 40. Bioensaios realizados para análise da atividade moluscicida contra *Biomphalaria glabrata*, com destaques para caramujos com hemorragia.



Fonte: Autor, 2011.

Para o estudo da capacidade moluscicida foram dissolvidos 2,5 mg da quinona a ser analisada em 250 mL de água desclorada para obter uma concentração de 10 mg L⁻¹. Após a primeira análise, outras concentrações (5,0; 1,0; 0,5; 0,4; 0,2; 0,125 mg L⁻¹) foram também analisadas.

No estudo da atividade moluscicida, foram feitos bioensaios com caramujos adultos da espécie *B. glabrata*, sendo os mesmos deixados em recipientes contendo 125 mL da solução a ser analisada, por um período de 24 horas. Para cada bioensaio, foram utilizados 30 caramujos, uma vez que em cada recipiente são colocados 5 caramujos. Dois conjuntos de controle foram empregados visando verificar a suscetibilidade dos caramujos, onde um recipiente contendo 125 mL de solução de niclosamida a 3,0 mg L⁻¹, foi utilizado como controle positivo e um outro contendo 125 mL de água desclorada, como controle negativo (World Health Organization, 1992).

Os experimentos foram realizados em duplicata, em temperatura ambiente, tendo um tempo de exposição dos espécimens de 24 horas. Decorrido esse período, os moluscos adultos foram lavados, imergidos em água desclorada e alimentados com alface, permanecendo em observação por 48 horas, com registro e retirada dos exemplares mortos (caramujos com hemorragia). Os dados obtidos foram analisados para obtenção dos valores de CL_{90} (DL_{90}).

4.2.6.2. Estudo da Atividade Larvicida

O bioensaio para a atividade larvicida foi realizado com as larvas do mosquito *Aedes aegypti*, inseto este mantido em criadouro a uma temperatura média de 24°C.

A postura dos ovos foi efetuada por fêmeas aprisionadas em gaiolas e alimentadas com solução de sacarose a 10%, embebida em algodão. Para o engurgitamento das fêmeas, feito após a cópula, a alimentação a base de sangue, foi efetuada com pombos. Após a eclosão dos ovos, as larvas foram alimentadas a base de proteína animal (ração utilizada para alimentação de felinos) até atingirem o quarto instar.

O ensaio biológico para a atividade larvicida foi realizado com as larvas do *A. aegypti* no quarto instar jovem (L_4) (**Figura 41**). A solução-teste foi preparada, inicialmente, na concentração de 100 mg L^{-1} , adicionando-se água destilada com 1% de DMSO.

Figura 41. Larvas do mosquito *Aedes aegypti*.



Fonte: Retirado de www.fiocruz.br, em 02/11/2010.

Para o bioensaio preliminar foram usadas 10 larvas por cada concentração e o teste foi efetuado em duplicata. As substâncias consideradas ativas, com taxa percentual de mortalidade acima de 40%, foram submetidas ao bioensaio apurado utilizando-se 25 larvas e realizado em quadruplicata, no total de 100 larvas por concentração. A primeira leitura foi efetuada após 24 horas, com registro e retirada das larvas mortas. Ao fim de 48 horas, fez-se uma leitura final com o registro do número total de larvas vivas e mortas. Foram preparadas duas unidades-controle, uma com água destilada a 1% (v/v) de DMSO, e outra, apenas com água destilada. A temperatura foi mantida em torno de 24 °C e a umidade relativa do ar entre 82 e 92% (World Health Organization, 1992).

As larvas foram consideradas mortas quando eram incapazes de mover-se ou subir à superfície, mesmo quando tocadas por uma espátula na região cervical, quando apresentaram descoloração, tremores ou falta de coordenação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

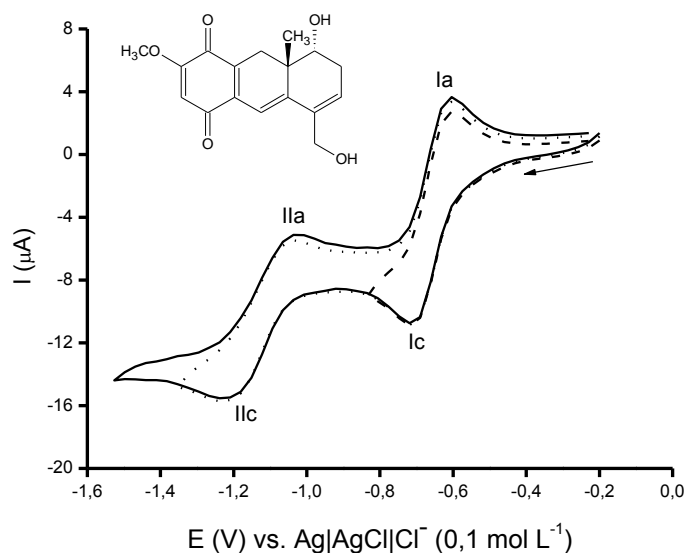
5.1. Parte 1. Análise Eletroquímica da Oncocalixona

5.1.1. Análises em Meio Aprótico em Voltametria Cíclica

As quinonas, de maneira geral, apresentam comportamento típico em meio aprótico, consistindo de duas ondas de redução, sendo a primeira delas de caráter quase-reversível, relacionada à formação da semiquinona ($Q^{\cdot-}$), em processo envolvendo um elétron (Jeftić *et al.*, 1970). A primeira etapa de redução da oncocalixona é melhor definida, uma vez que, a semiquinona não é suficientemente básica para ser protonada. Porém, o diânion formado na segunda etapa de redução tem caráter mais básico e, conseqüentemente mais reativo que a semiquinona, sendo, portanto, passível de sofrer reações de desproporcionamento (Chambers *et al.*, 1988) ou reações ácido-base, com alteração do perfil voltamétrico. O comportamento eletroquímico evidenciado para a oncocalixona, principalmente em relação à segunda etapa de redução, foi compatível com esses fatos.

Em voltametria cíclica (VC), a oncocalixona (**Figura 42**), em meio aprótico (DMF/TBAP, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), na concentração de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, apresentou duas ondas de redução (I_{lc} e I_{llc} , respectivamente), ambas com características de processo quase-reversível ($E_{p_{lc}} = -0,719 \text{ V}$, $E_{p_{la}} = -0,602 \text{ V}$; $E_{p_{llc}} = -1,22 \text{ V}$ e $E_{p_{lla}} = -1,03 \text{ V}$).

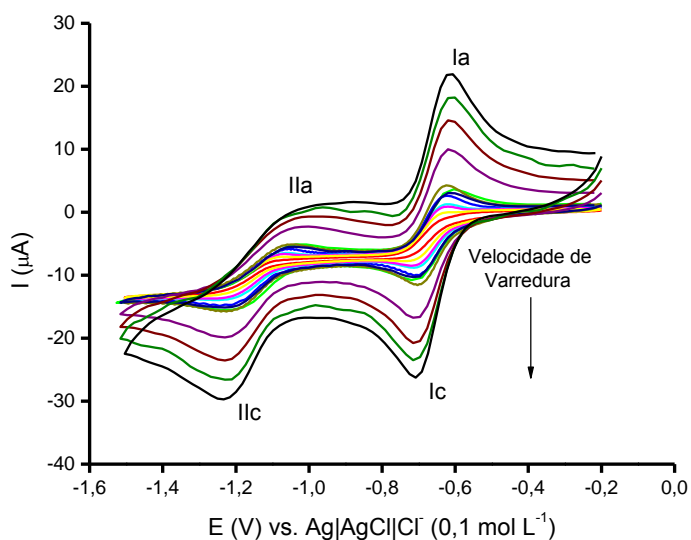
Figura 42. Voltamograma cíclico da oncocalixona, na concentração de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, a 100 mV s^{-1} , em meio aprótico, DMF/TBABF₄ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) vs. Ag|AgCl|Cl⁻ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de trabalho: carbono vítreo.



Fonte: Autor, 2011.

Os valores de intensidade de corrente obtidos a partir do estudo voltamétrico em função da velocidade de varredura ($i_{p_{Ic}}$ vs. $v^{1/2}$) (**Figuras 43 e 44A**) demonstraram que o transporte de massa através da solução, o qual rege a chegada da substância à superfície eletródica, era de natureza difusional.

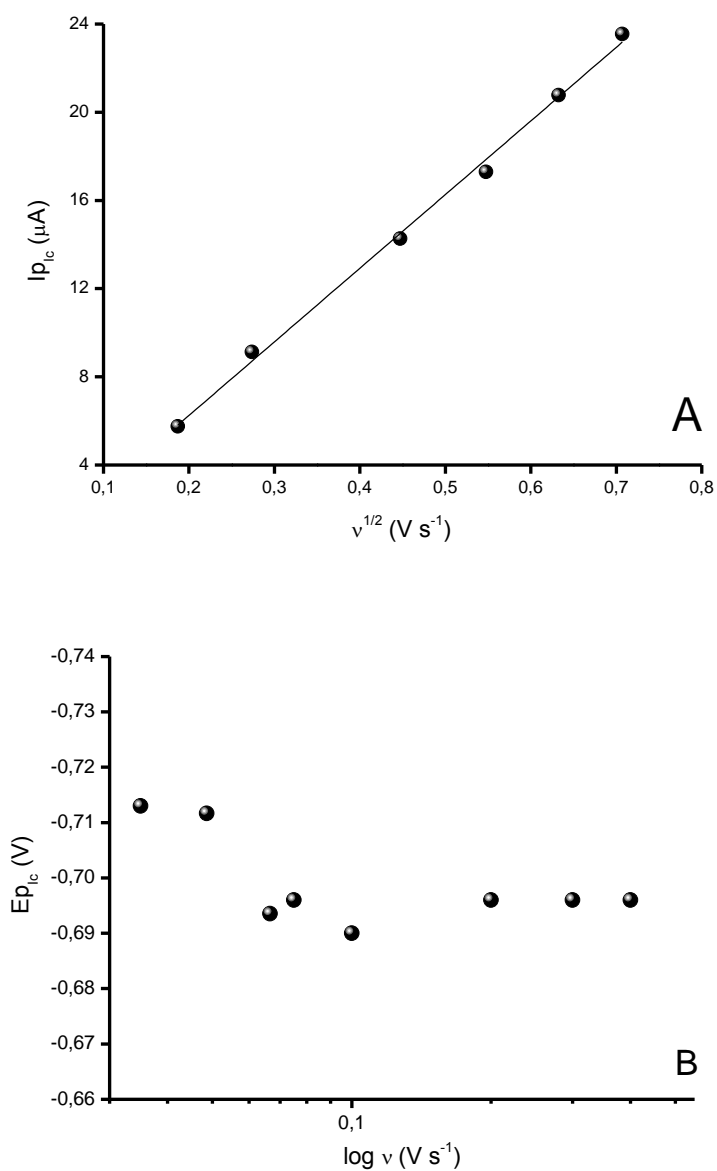
Figura 43. Análise da variação da velocidade de varredura em VC da oncocalixona, em meio aprótico, DMF/TBABF₄ (0,1 mol L⁻¹) vs. Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹). Velocidades analisadas: (♦) 10, (♦) 20, (♦) 30, (♦) 35, (♦) 50, (♦) 70, (♦) 75, (♦) 100, (♦) 200, (♦) 300, (♦) 400 e (♦) 500 mV s⁻¹. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo.



Fonte: Autor, 2011.

A análise da variação do potencial de redução da primeira onda em função do \log da velocidade de varredura ($E_{p_{Ic}}$ vs. $\log v$) (**Figura 44B**), juntamente com a presença do pico reverso indicaram que a primeira etapa de redução era de natureza quasi-reversível, conforme testes diagnósticos, tendo em vista que $E_{p_{Ic}}$ varia ligeiramente com a velocidade de varredura (oscilando em torno de -0,710 V), $I_{p_{Ia}}/I_{p_{Ic}} \approx 1$, $\Delta E_p > 59$ mV (Gordillo *et al.*, 2000) (Southampton Electrochemistry Group).

Figura 44. Gráficos representativos do comportamento voltamétrico (VC) da onocalixona com ênfase na dependência da corrente de pico com o aumento da velocidade de varredura ($I_{p_{ic}}$ vs. $v^{1/2}$), r : 0,9963 (A) e na dependência do potencial com aumento linear da velocidade ($E_{p_{ic}}$ vs. $\log v$) (B). Meio aprótico, DMF/TBABF₄ (0,1 mol L⁻¹) vs. Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹), eletrodo de trabalho: carbono vítreo.

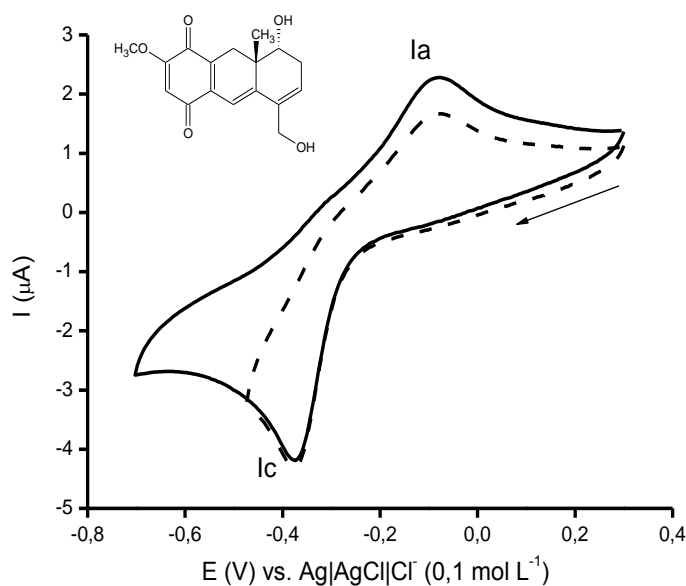


Fonte: Autor, 2011.

5.1.2. Análises em Meio Prótico em Voltametria Cíclica

A análise eletroquímica da oncoqualixona, em voltametria cíclica, em meio prótico misto, tampão fosfato etanólico (20%, v/v), pH 7,0, na concentração de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, mostrou um comportamento atípico, em relação a compostos quinônicos em meio prótico, apresentando um par de ondas catódica e anódica (gerando a hidroquinona como produto), de característica quase-reversível, com uma larga distância entre os potenciais de pico catódico e anódico ($E_{p_{lc}} = -0,376 \text{ V}$ e $E_{p_{la}} = -0,081 \text{ V}$) (**Figura 45**).

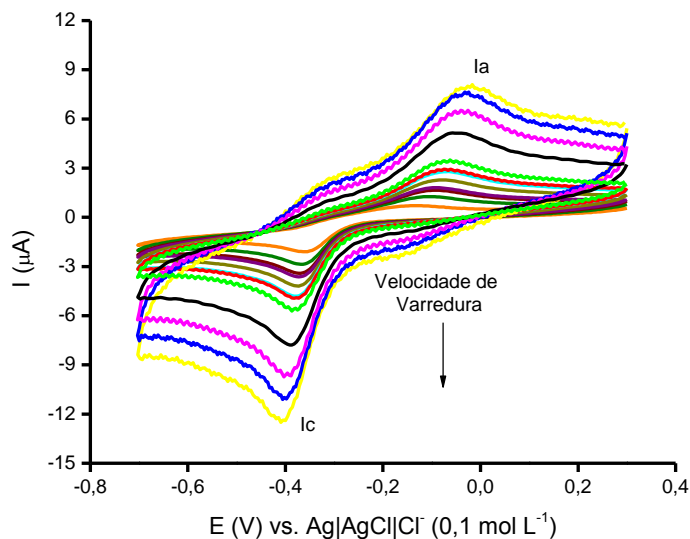
Figura 45. Voltamograma cíclico da oncoqualixona, na concentração de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, a 50 mV s^{-1} , em meio aquoso misto, tampão fosfato etanólico (20%, v/v), pH 7,0. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo.



Fonte: Autor, 2011.

Tal qual demonstrado para os estudos da oncoqualixona em meio aprótico, os valores de intensidade de corrente obtidos em função da velocidade de varredura ($I_{p_{lc}}$ vs. $v^{1/2}$) (**Figuras 46 e 47A**) demonstraram que o transporte de massas através da solução era de natureza difusional.

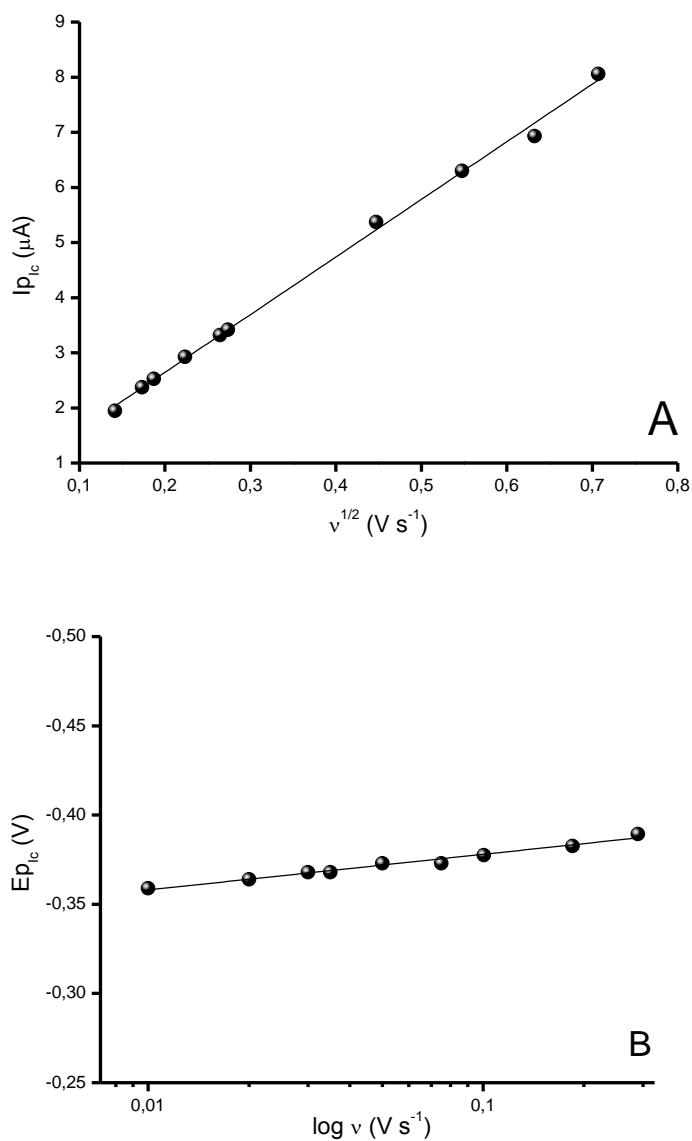
Figura 46. Análise da velocidade de varredura em VC da oncoalixona, em meio prótico, tampão fosfato/etanol, (20 %), pH 7,0. Velocidades analisadas: (♦) 10, (♦) 20, (♦) 30, (♦) 35, (♦) 50, (♦) 70, (♦) 75, (♦) 100, (♦) 200, (♦) 300, (♦) 400 e (♦) 500 mV s^{-1} . Eletrodo de trabalho: carbono vítreo.



Fonte: Autor, 2011.

A análise da variação do potencial de redução em função do log da velocidade de varredura ($E_{p_{lc}}$ vs. $\log v$) (**Figura 47B**), indicou que a redução da quinona é de natureza quasi-reversível, de acordo com os testes diagnósticos já mencionados anteriormente, tendo em vista que $E_{p_{lc}}$ deslocou negativamente com o aumento da velocidade de varredura.

Figura 47. Gráficos representativos do comportamento voltamétrico (VC) da onocalixona com ênfase na dependência da corrente de pico com o aumento da velocidade de varredura ($I_{p_{cl}}$ vs. $v^{1/2}$), r : 0,9974 (A) e na dependência do potencial com aumento linear da velocidade ($E_{p_{cl}}$ vs. $\log v$) (B). Meio prótico, tampão fosfato etanólico (20%, v/v), pH 7,0, vs. Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹), eletrodo de trabalho: carbono vítreo.



Fonte: Autor, 2011.

5.1.3. Desenvolvimento de um Sensor para a Oncocalixona em VOQ

Nos estudos para o desenvolvimento de um sensor eletroquímico para a oncoccalixona foram feitas várias análises com complexos metálicos diversos (NiTsPc, CoTsPc, LiTCNQ, TCNQ, TCNE, Cu(acac)₂, FePor, FeTsPc e FeT₄MPyP), onde a maioria não demonstrou nenhum ganho de sensibilidade ou apresentou certa instabilidade para o sensor proposto. Desta forma, não foram levados adiante mais análises entre tais complexos e a oncoccalixona. Porém, quando uma bicamada formada pelos complexos de FeTsPc e de FeT₄MPyP, em carbono vítreo, foram analisadas em presença de oncoccalixona, uma resposta catalítica para a redução da mesma foi observada, levando, portanto, a análises mais aprofundadas com estes complexos em presença da quinona em questão, com vistas ao desenvolvimento de um sensor para oncoccalixona, como pode ser visto nos tópicos que se seguem.

5.1.3.1. Redução Eletrocatalítica da Oncocalixona no Eletrodo Modificado em VC

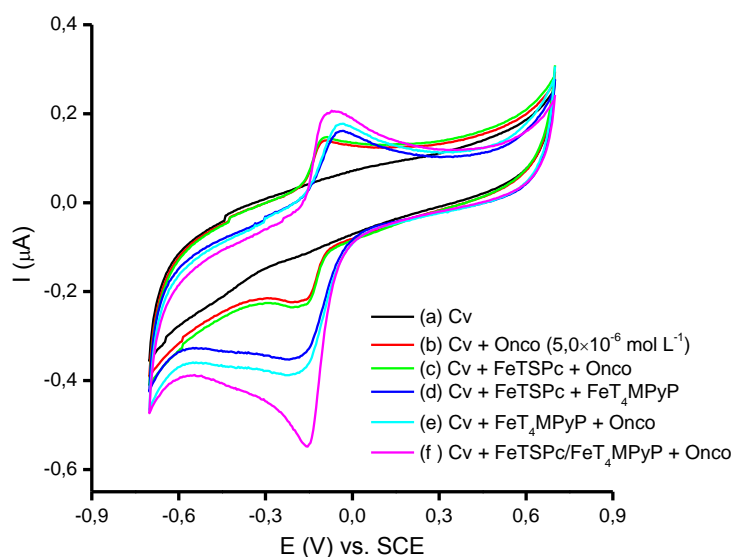
Após a observação prévia do comportamento catalítico dos complexos FeTsPc e FeT₄MPyP, em presença de oncoccalixona, foi realizado um estudo detalhado com cada complexo individualmente e/ou em conjunto, formando uma bicamada, para a análise da redução eletrocatalítica da oncoccalixona na concentração de $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em carbono vítreo em voltametria cíclica.

A **Figura 48** mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo de carbono vítreo (**Cv**) não modificado na ausência (a) e presença (b) de oncoccalixona, para o eletrodo de carbono vítreo modificado com uma única camada de FeTSPc em presença de oncoccalixona (c) e uma camada de FeT₄MPyP (e) na presença de oncoccalixona. Para comparação, esta figura também apresenta o voltamograma cíclico para o eletrodo de carbono vítreo modificado com uma bicamada de FeTSPc/FeT₄MPyP na ausência (d) e presença (f) de oncoccalixona em solução de tampão fosfato, 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0).

Os voltamogramas cíclicos obtidos na presença de oncoccalixona (**Figura 48b**) mostraram um comportamento típico de redução de quinonas em meio aquoso,

representado por um par de ondas reversíveis, devido a formação do derivado hidroquinônico (Aguilar-Martinez, 2004; Jacq, 1967).

Figura 48. Voltamogramas cíclicos em eletrodo de carbono vítreo (Cv) não modificado na ausência (a) e presença (b) de onco calixona ($5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹), em eletrodo de Cv modificado com uma única camada de FeTSPc na presença de onco calixona (c) e uma camada de FeT₄MPyP na presença de onco calixona (e). Para comparação, voltamogramas cíclicos para o eletrodo de Cv modificado com uma bicamada de FeTSPc/FeT₄MPyP na ausência (d) e presença (f) de onco calixona, em tampão fosfato, 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). Velocidade de varredura: 0,025 V s⁻¹.



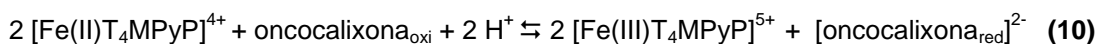
Fonte: Autor, 2011.

Como pode ser visto, a melhor resposta para a redução da onco calixona foi obtida com o eletrodo de Cv modificado com FeTSPc/FeT₄MPyP (**Figura 48f**). Neste eletrodo modificado, um deslocamento anódico do potencial de pico de redução de cerca de 30 mV e uma corrente de pico muito maior para onco calixona do que aquelas obtidas no eletrodo de Cv limpo foram observados (**Figura 48b** comparada à **Figura 48f**). Adicionalmente, neste eletrodo, a corrente de pico para a redução da quinona foi também maior do que aquelas mostradas no eletrodo modificado unicamente com FeT₄MPyP ou FeTSPc (**Figuras 48c e 48e**, em comparação a **48f**).

A corrente para a redução da onco calixona no eletrodo modificado com FeT₄MPyP (**Figura 48e**), em comparação com aquela obtida em eletrodo de Cv modificado com FeTSPc/FeT₄MPyP (**Figura 48d**) na ausência da mesma, foi

praticamente a mesma. Quando somente FeT₄MPyP foi usado, um pequeno aumento de corrente foi observado (**Figura 48e**). Isto sugere que o complexo FeT₄MPyP efetivamente facilita a redução da oncocalicxona, enquanto que a camada de FeTSPc deve melhorar a organização dos sítios ativos de FeT₄MPyP, resultando numa melhor catálise para a redução da quinona.

A interação dos complexos FeTSPc/FeT₄MPyP e o aumento na corrente de pico da oncocalicxona (**Figura 48f**) quando comparado com o eletrodo limpo (**Figura 48b**) pode estar provavelmente associada às reações redox das espécies imobilizadas [Fe(III)T₄MPyP]⁴⁺ e [Fe(II)TSPc]⁴⁻ em [Fe(II)T₄MPyP]³⁺ e [Fe(III)TSPc]³⁻. O complexo [Fe(II)T₄MPyP]³⁺ seria oxidado de volta, reduzindo a quinona, originando o ciclo catalítico (**Eq. 9 e 10**).



Por essa razão, a alta atividade do eletrodo de carbono vitreo modificado para a redução da oncocalicxona em soluções aquosas pode estar associada com a baixa resistência na transferência de carga da bicamada FeTSPc/FeT₄MPyP e a presença de FeT₄MPyP como sítio eletrocatalítico, no qual se sugere propriedade catalítica relevante para a redução da oncocalicxona. Este efeito foi resultado das mudanças no ambiente catalítico ao redor de sítios ativos, induzidos por contrastantes interações de empacotamento molecular com FeT₄MPyP. As propriedades catalíticas e o uso de bicamadas de ftalocianinas e porfirinas têm sido descritas anteriormente (Rocha *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2006).

5.1.3.2. Influência da Concentração de FeTSPc e FeT₄MPyP na Resposta do Sensor

As concentrações de FeTSPc e FeT₄MPyP são fatores que devem ser controlados e influenciam o comportamento eletroquímico do sensor como um todo. Portanto, a dependência da concentração dos complexos na resposta do eletrodo para a redução da oncocalicxona foi investigada, em VOQ devido à sensibilidade da técnica, por meio da preparação de uma bicamada com diferentes concentrações de

FeTSPc e de FeT₄MPyP: 0,01; 0,05; 0,1; 0,15 e 0,19 mmol L⁻¹. Desta forma, os resultados mostrados na **Tabela 10** indicaram que a melhor resposta para o sensor proposto, foi obtida com a concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, para ambos os complexos.

Tabela 10: Influência das concentrações de FeTSPc e FeT₄MPyP, usadas para a preparação do filme, sobre a corrente de pico obtida com o sensor para oncocalicxona ($3,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹) em solução de tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹), pH 7,0, em VOQ, ($n = 3$).

[FeTSPc]:[FeT ₄ MPyP] ($\times 10^{-4}$ mol L ⁻¹)	- I_p (μ A) (SD)
0,1:1,9	1,40 (\pm 0,00)
0,5:1,5	1,43 (\pm 0,01)
1,0:1,0	2,29 (\pm 0,01)
1,5:0,5	1,23 (\pm 0,01)
1,9:0,1	0,75 (\pm 0,03)

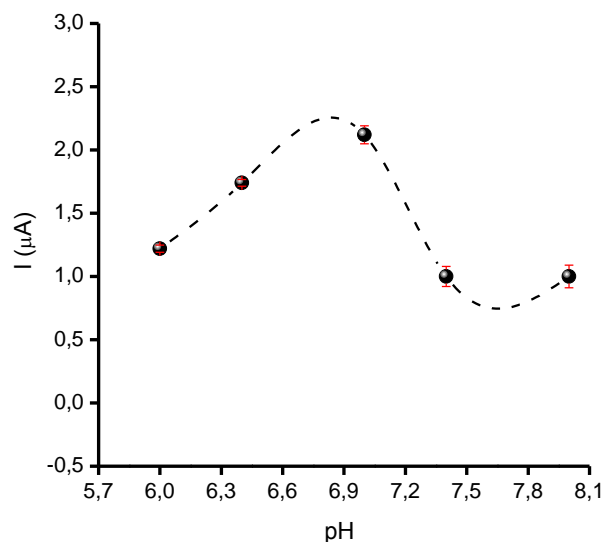
SD = Standard deviation (desvio padrão)

Valores de correntes baixos foram verificados quando a quantidade de FeTSPc era maior do que a de FeT₄MPyP, e vice-versa. Esta tendência sugeriu que a melhor proporção para a construção do sensor com uma bicamada de FeTSPc/FeT₄MPyP seria de 1:1, sendo ideal para a cinética de transferência de elétrons, uma vez que nessa condição, pôde-se obter valores altos de corrente. Desta forma, a concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, para cada constituinte do complexo FeTSPc/FeT₄MPyP, foi escolhida para os demais experimentos.

5.1.3.3. Influência do pH, Solução Tampão e Concentração do Tampão na Resposta do Sensor

A influência do pH da solução na resposta da redução eletroquímica da oncocalicxona, utilizando tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹) com valores de pH de 6,0, 6,4, 7,0, 7,4 e 8,0, foram estudadas em VOQ (**Figura 49**).

Figura 49. Influência do pH na resposta do sensor para a redução da oncofalicina ($3,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) em VOQ. Análises conduzidas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Potencial de salto: $0,002 \text{ V}$, f : 80 Hz e α : $0,03 \text{ V}$, $n = 3$.

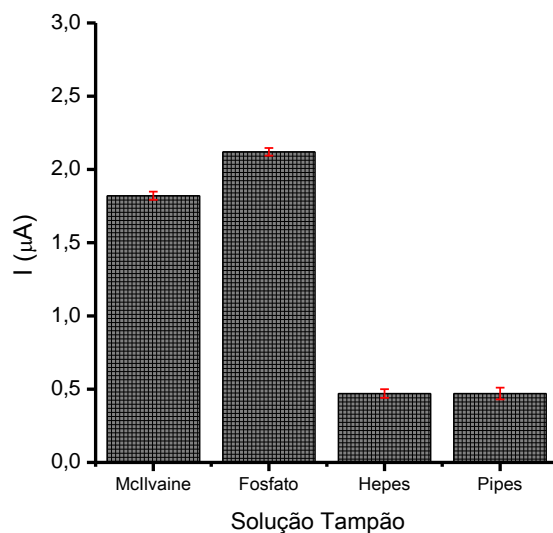


Fonte: Autor, 2011.

Um aumento na corrente de pico foi observado com o aumento do pH na faixa de 6,0 até 7,0, onde o maior valor para a corrente foi observado em pH 7,0, sendo diminuído com o aumento do pH. Desta forma, o pH ótimo para estudos posteriores foi ajustado em 7,0. Contudo, foi também observado neste estudo, que o potencial de pico de redução da oncofalicina conduz, como esperado, a um leve deslocamento catódico com o aumento do pH.

Com a definição do pH ótimo para a obtenção de uma melhor resposta para o sensor proposto, fez-se necessário o estudo da influência da solução tampão na resposta desse sensor, em VOQ, onde foram analisadas quatro diferentes soluções tampões (HEPES, McIlvaine, PIPES e fosfato) com concentrações de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. As análises eletroquímicas demonstraram que a melhor resposta foi obtida em solução de tampão fosfato (**Figura 50**), sendo escolhida, portanto, para os demais estudos.

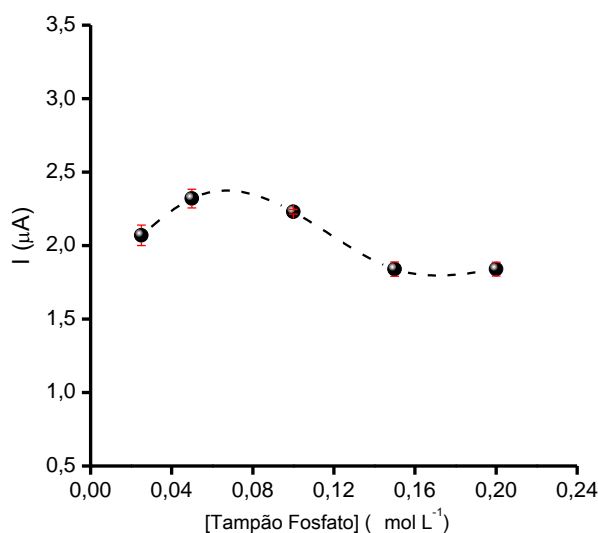
Figura 50. Influência da solução tampão na resposta do sensor para redução da oncofalexona ($3,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$), em VOQ. Análises realizadas em solução tampão $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. Potencial de salto: $0,002 \text{ V}$, f : 80 Hz e α : $0,03 \text{ V}$, $n = 3$.



Fonte: Autor, 2011.

Após a definição do tipo de tampão que possibilita uma melhor resposta em relação à redução da oncofalexona, fez-se necessária a análise da influência de diferentes concentrações desse tampão em VOQ. Desta forma, a **Figura 51** mostra a influência de diferentes concentrações de tampão fosfato ($0,025$; $0,050$; $0,100$; $0,150$ e $0,200 \text{ mol L}^{-1}$) na resposta do sensor. A melhor resposta, como pode ser observada na figura abaixo, foi obtida nas concentrações de $0,050$ e $0,100 \text{ mol L}^{-1}$, além do mais, observou-se a diminuição da corrente, em outras concentrações. A concentração de $0,050 \text{ mol L}^{-1}$ foi escolhida para os experimentos que se seguem.

Figura 51. Influência da concentração de tampão fosfato, pH 7,0, sobre a corrente de pico obtida por VOQ com o sensor para oncocalixona ($3,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$). Potencial de salto: 0,002 V, f : 80 Hz e α : 0,03 V, $n = 3$.

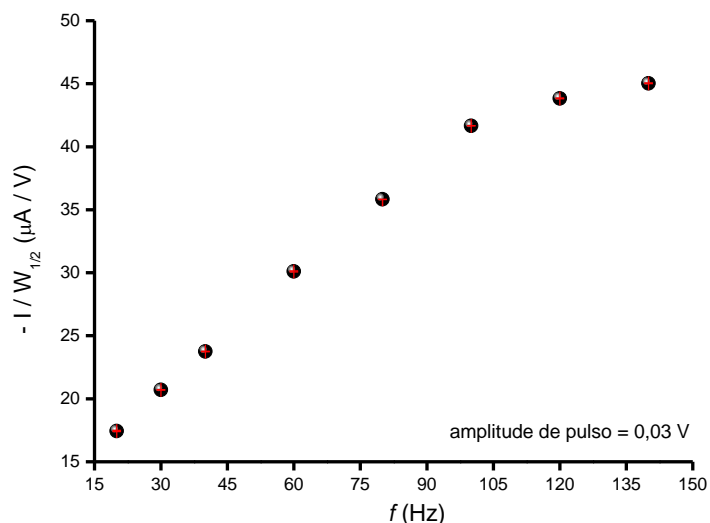


Fonte: Autor, 2011.

5.1.3.4. Influência da Frequência (f) e Amplitude de Potencial (α) em VOQ

Os efeitos da frequência e amplitude de potencial em VOQ, para a redução da oncocalixona, com eletrodo de carbono vítreo modificado com FeTSPc/FeT₄MPyP, em solução de tampão fosfato foram verificados. Os valores de corrente de pico apresentaram um aumento linear com a variação da frequência entre 20 e 140 Hz com potencial de salto (step potential) de 0,002 V. Entretanto, quando a frequência era >100 Hz, o valor da corrente de pico permanecia quase constante, acompanhado por uma distorção dos picos. Desta forma, para o melhor perfil voltamétrico com maior sensibilidade, a frequência de 100 Hz foi escolhida e usada nos demais estudos (**Figura 52**).

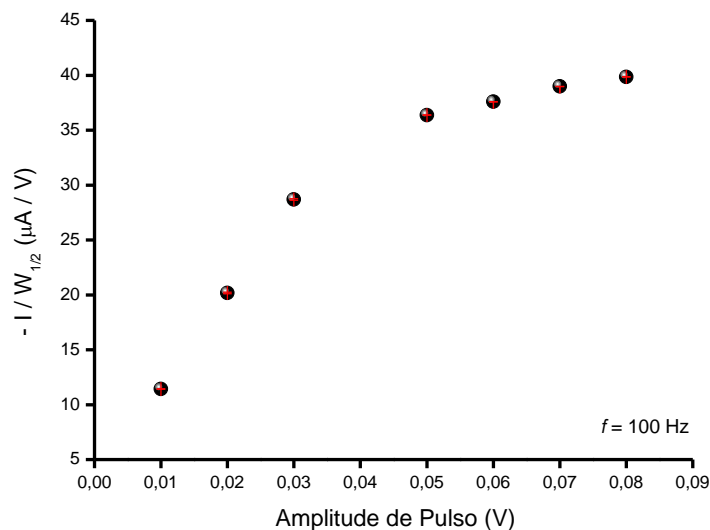
Figura 52. Variação da corrente de pico em relação à frequência utilizada para a redução da onocalixona, em VOQ, com amplitude fixa em 0,03 V. Eletrodo de Cv modificado com uma bicamada de FeTSPC/FeT₄MPyP em tampão fosfato (0,05 mol L⁻¹, pH 7,0). Potencial de salto: 0,002 V, $n = 3$.



Fonte: Autor, 2011.

Em outra análise, também foi verificado que os valores de corrente de pico variam com a amplitude de pulso de 0,010 a 0,080 V aplicadas em VOQ, na frequência de 100 Hz para o eletrodo modificado, com potencial de salto de 0,002 V. O uso da amplitude de pulso >0,050 V levou a valores de corrente de pico quase constantes e a um aumento na corrente de fundo. Neste sentido, a melhor sensibilidade foi obtida com uma amplitude de 0,050 V e, portanto, este valor foi escolhido para estudos posteriores (**Figura 53**).

Figura 53. Variação da corrente de pico em relação à amplitude de pulso utilizada para a redução da onco-calixona, em VOQ, com frequência fixa em 100 Hz. Eletrodo de Cv modificado com uma bicamada de FeTSPC/FeT₄MpyP em tampão fosfato (0,05 mol L⁻¹, pH 7,0). Potencial de salto: 0,002 V, $n = 3$.

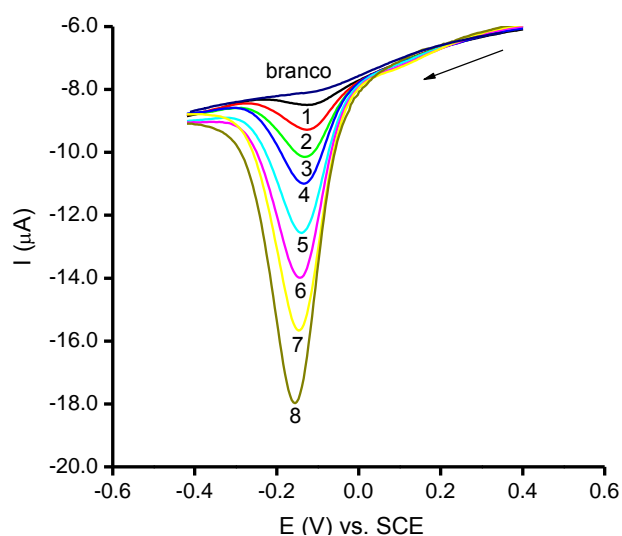


Fonte: Autor, 2011.

5.1.3.5. Caracterização Analítica

Nas condições anteriormente otimizadas (tampão fosfato, 0,05 mol L⁻¹, pH 7,0), de maneira a se obter uma curva analítica para a onco-calixona com o sensor desenvolvido, experimentos foram realizados em VOQ, por meio de adições de alíquotas de onco-calixona provenientes de uma solução estoque previamente preparada (**Figura 54**).

Figura 54. VOQ para a eletrorredução da Oncocalixona utilizando eletrodo de Cv modificado com uma bicamada de FeTSPC/FeT₄MPyP em tampão fosfato (0,05 mol L⁻¹, pH 7,0), obtida em condições otimizadas para a faixa de concentração de (1) 0,005, (2) 0,044, (3) 0,098, (4) 0,198, (5) 0,299, (6) 0,503, (7) 0,704, e (8) 1,2×10⁻⁶ mol L⁻¹. Potencial de salto: 0,002 V, *f*: 100 Hz e *α*: 0,05 V.



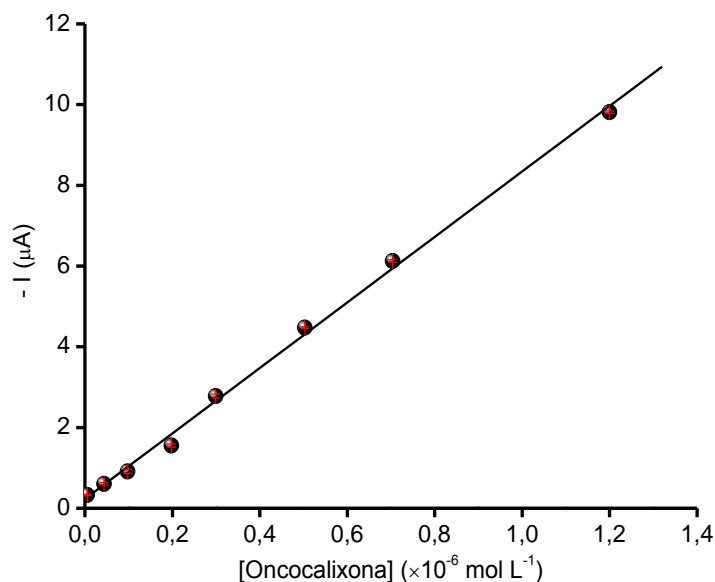
Fonte: Autor, 2011.

Nas condições otimizadas, o sensor proposto mostrou uma resposta linear na faixa de $5,0 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ até $1,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (**Figura 55**), o que pode ser expresso de acordo com a **Equação 11**:

$$I_p (\mu A) = 0,23 (\pm 0,09) + 8,11 (\pm 0,17) [\text{Oncocalixona}] (\mu\text{mol L}^{-1}) \quad (11)$$

com coeficiente de correlação linear de 0,996 (para $n = 8$) e com boa sensibilidade ($8,11 \mu A L \mu\text{mol}^{-1}$) e limite de detecção, o qual pode ser atribuído à eficiência da transferência de elétrons entre o filme de FeTSPc/FeT₄MPyP e a quinona.

Figura 55. Curva analítica obtida, em VOQ, para a determinação da oncocalixona utilizando eletrodo de Cv modificado com uma bicamada de FeTSPC/FeT₄MPyP sob condições otimizadas, nas concentrações descritas na **Figura 54**. Tampão fosfato (0,05 mol L⁻¹, pH 7,0), potencial de salto: 0,002 V, *f*: 100 Hz e α : 0,05 V, *n* = 3.



Fonte: Autor, 2011.

Adicionalmente, o sensor proposto apresentou uma relativa larga faixa de resposta linear, a qual pode estar relacionada com a alta afinidade entre o catalisador e o analito. O limite de detecção (LD) de $1,5 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ foi determinado usando a proporção $S_{\text{branco}} \times 3\sigma/\text{slope}$ e o limite de quantificação (LQ) foi de $5,0 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ usando $S_{\text{branco}} \times 10\sigma/\text{slope}$, onde S_{branco} corresponde ao sinal do branco e σ é o desvio padrão do valor médio para 10 voltamogramas do branco, determinados de acordo com recomendações da IUPAC (Analytical Methods Committee, 1987; IPAC, 2011).

5.1.4. Estudos com Ressonância de Spin de Elétron (ESR)

Os métodos que analisam a densidade eletrônica são conhecidos por sua capacidade em fornecer prognósticos razoáveis para cálculos de constantes de acoplamento hiperfinas (HFCC) em ESR, uma vez que estes valores estão todos

relacionados à interação entre o spin nuclear dos átomos de H com o elétron desemparelhado do ânion-radical eletrogerado.

A interpretação de um espectro de ESR por meio de um processo de simulação tem propiciado a determinação de constantes de acoplamento hiperfinas para vários núcleos magnéticos. Desta forma, quando são comparados os valores experimentais das constantes de acoplamentos hiperfinas (HFCC) com os valores calculados (**Tabela 11**) pode ser observada uma correlação entre eles.

Tabela 11. Constantes de acoplamento hiperfinas para o ânion-radical da oncolixona.

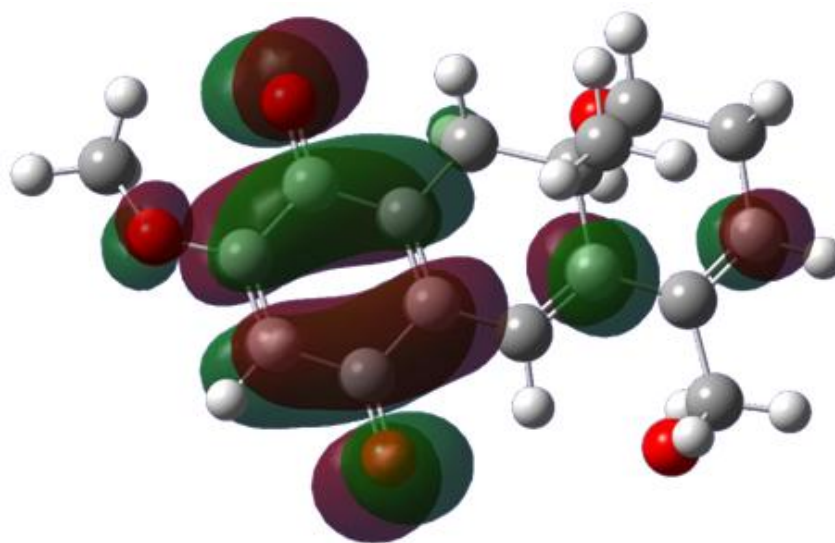
	H-3	H-6	H-7(1)	H-7(2)	H-9(2)	H-9(1)	H-10	H'(MeO)	H''(MeO)	H'''(MeO)
UHF 6-31G++ ^b	0,9011	1,9005	1,7415	1,0125	2,0379	5,3552	0,0077	0,2187	0,2975	0,3297
UHF 6-31G+ ^b	1,7008	1,6127	2,3614	0,8656	1,1900	2,7567	1,3273	0,1322	0,1716	0,1845
UB3LYP 6-31G++ ^b	1,6709	1,5882	2,3390	0,8527	1,1919	2,7571	1,2741	0,1387	0,1612	0,1845
UB3LYP 6-31G+ ^b	0,8994	1,9036	1,7438	1,0128	2,0359	5,3597	0,0072	0,2569	0,2976	0,3211
UB3LYP 6-31G ^a	1,9185	1,5893	2,1681	0,7360	1,7031	4,6621	0,9669	0,0376	0,1213	0,0832
EXPERIM.	1,3090	0,6514	1,3090	0,6514	0,6514	2,4675	0,6514	0,0053	0,0053	0,0053

a(cálculo de cada ponto feito no vácuo)

b(cálculo de cada ponto feito com o modelo C-PCM)

Os valores experimentais foram de certa forma, reproduzidos por este método, fazendo com que os estudos da estrutura eletrônica de determinados compostos sejam uma ferramenta essencial na interpretação de dados de ESR. Desta forma, alguns parâmetros físico-químicos foram obtidos de forma mais precisa, caso da HFCC, possibilitando a construção de uma “perspectiva tridimensional” por meio do mapeamento da densidade de spins dos elétrons desemparelhados sobre a molécula (**Figura 56**).

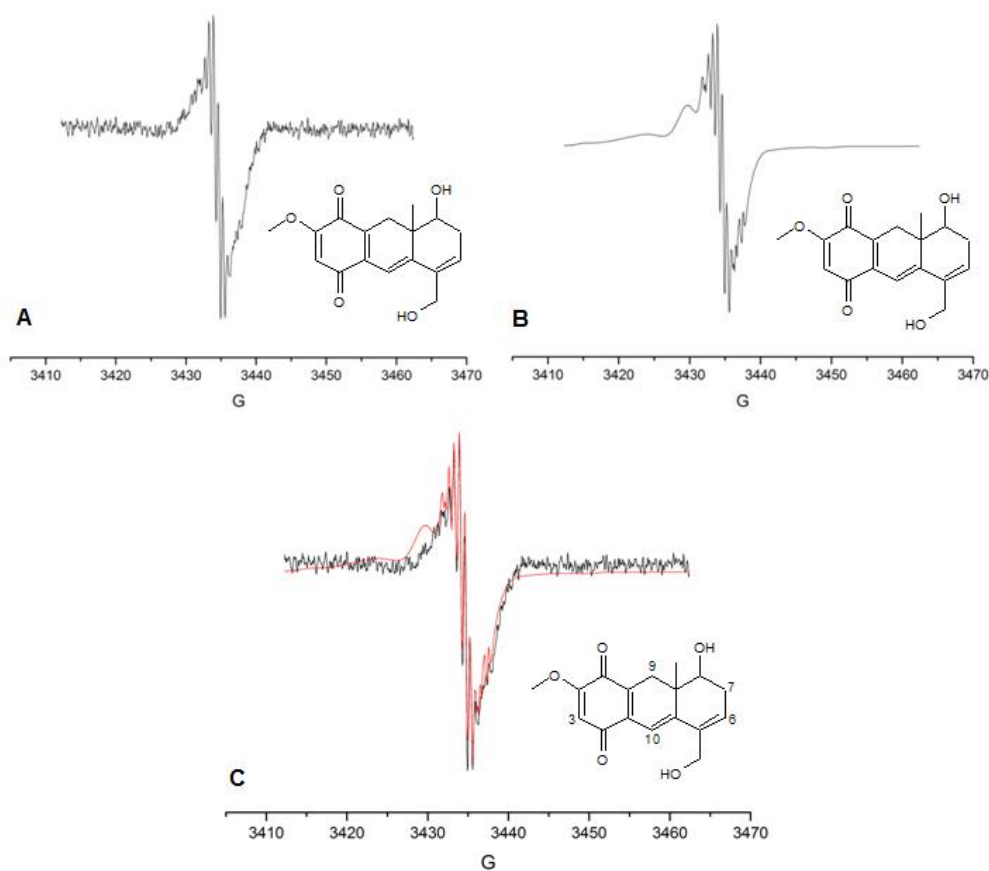
Figura 56. Densidade dos spins de elétrons desemparelhados do ânion-radical da oncocalixona.



Fonte: Autor, 2011.

Um bom entendimento dos espectros de ESR obtidos experimentalmente e os simulados, permitiu uma correta elucidação da HFCC para o ânion-radical da quinona em questão, que, de acordo com as estimativas, a interação hiperfina estaria relacionada a dez dupletos, correspondentes aos hidrogênios na posição H-3, H-6, H-7, H-9, H-10, e aos três hidrogênios da função metóxi (ver numeração na molécula, **Figura 57c**). Essa interação se inicia desde a densidade de spin de elétrons desemparelhados principalmente sobre o sistema quinônico, onde foi observada uma grande deslocalização eletrônica, estendendo-se através do sistema carbonílico, chegando próximo às posições seis e sete (relativamente afastado da porção quinônica).

Figura 57. Espectros de ESR para o ânion-radical da oncocalixona: experimental (A), simulado (B) e sobreposto (C).



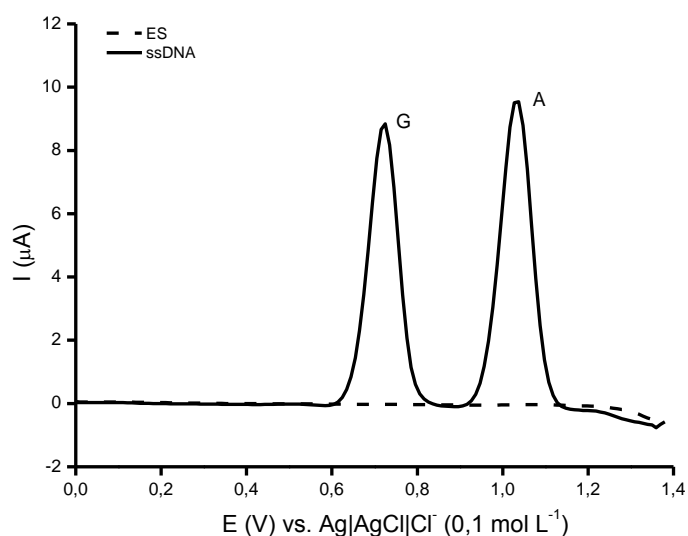
Fonte: Autor, 2011.

A alta deslocalização eletrônica está claramente evidenciada pela grande constante de acoplamento hiperfina do H-9, além dos acoplamentos nas posições H-3 (próximo à quinona) e H-7 (afastado da quinona). As estimativas teóricas nos dão indícios a respeito da distribuição dos elétrons desemparelhados, mesmo não tendo sido observada uma descrição exata dos dados obtidos em relação aos experimentais. Entretanto, com os dados obtidos, foi possível ter-se um indício racional do desdobramento hiperfino que permitisse seguir a tendência do campo magnético do sistema radicalar, revelando, desta forma, uma figura precisa e completa do padrão hiperfino estudado. Sendo assim, o sistema UB3LYP 6-31G++ (com uso do modelo C-PCM) mostrou uma melhor concordância com os padrões hiperfinos experimentais.

5.1.5. Análises com DNA

A oxidação eletroquímica do DNA em eletrodos de carbono vítreo, em meio ácido, pH 4,5, está relacionada com a oxidação das bases adenina e guanina (Brett e Diclescu, 2004). Entretanto, o dsDNA tende a apresentar menores intensidades de correntes de oxidação em relação ao ssDNA (**Figura 58**) (Diclescu *et al.*, 2005), devido à disponibilidade das bases para a oxidação, que no DNA em dupla-fita, é limitada, uma vez que as mesmas estão ligadas umas às outras por ligações de hidrogênio, enquanto que no DNA em fita única, essas estão livres para serem oxidadas.

Figura 58. Voltamograma de pulso diferencial com correção de linha de base ($v = 0,010 \text{ V s}^{-1}$) de uma solução de ssDNA em tampão acetato etanólico, 20% (v/v), pH 4,5, em eletrodo de carbono vítreo. ES = eletrólito suporte, G = Guanina, A = Adenina.



Fonte: Autor, 2011.

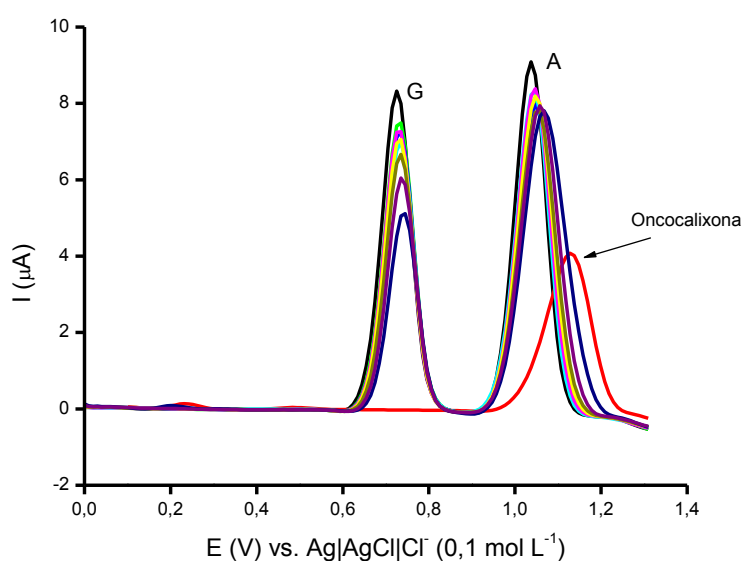
A interação de substâncias-alvo com o DNA pode ser confirmada de acordo com a intensidade das correntes de oxidação das bases, em análises eletroquímicas (Brett e Diclescu, 2004). Nos estudos com ssDNA, a interação foi confirmada pela diminuição das correntes e/ou deslocamento dos potenciais de oxidação das bases expostas (Boussicault *et al.*, 2008), devido às moléculas das substâncias-alvo se

ligarem às bases via intercalação ou atração eletrostática (Kamel *et al.*, 2008). Esta interação modifica a estrutura das mesmas, e desta forma, ocorre diminuição da quantidade de bases livres para serem oxidadas, tendo como consequência, a diminuição da corrente de oxidação. Tendo em vista o exposto, os estudos de interação de algumas quinonas com ssDNA é de grande interesse, devido à quantidade de informações que essas análises proporcionam, no que diz respeito à atuação biológica de determinadas substâncias.

5.1.5.1. Análise da Interação da Oncocalixona com ssDNA

Com o objetivo de verificar a interação entre a oncocalixona e o DNA, várias alíquotas da quinona foram adicionadas a uma solução de ssDNA, com análise em voltametria de pulso diferencial (**Figura 59**).

Figura 59. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para o ssDNA (♦), $0,3 \text{ g L}^{-1}$, [tampão acetato etanólico, (20 %, v/v), pH 4,5] em presença de 10 (♦), 20 (♦), 40 (♦), 60 (♦), 80 (♦), 100 (♦), 200 (♦) e 400 (♦) $\times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de oncocalixona. Para comparação, oncocalixona, $c = 40 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, em ausência de ssDNA foi analisada (♦). Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{Cl}^- (0,1 \text{ mol L}^{-1})$ e contra-eletródo: fio de platina, velocidade de varredura: $0,010 \text{ V s}^{-1}$.

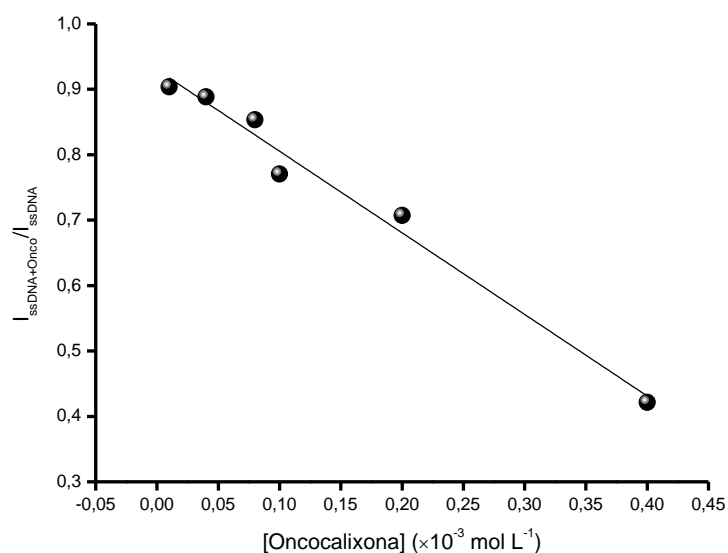


Fonte: Autor, 2011.

O resultado desta análise evidenciou interação (**Figura 59**). Antes da adição do analito, os sinais associados à oxidação das bases guanina (G) e adenina (A) no ssDNA se mostraram muito intensos (Kamel *et al.*, 2008). Porém, quando alíquotas de onocalixona foram adicionadas à solução de ssDNA, a intensidade da corrente de oxidação da base guanina diminuiu em amplitude, enquanto o sinal de corrente da adenina não teve uma mudança tão significativa, devido à contribuição da corrente de oxidação da onocalixona, que se apresenta em potencial próximo da oxidação da base adenina.

A diminuição linear da corrente de oxidação da guanina (**Figura 60**) e um pequeno deslocamento no potencial anódico dos picos de oxidação das bases quando a concentração da quinona aumentou, foram indicadores positivos de interação entre o ssDNA e onocalixona (**Figura 59**). Este comportamento pode ser interpretado pela diminuição da quantidade de moléculas disponíveis para oxidação, devido às interações formadas com a quinona.

Figura 60. Dependência da corrente de pico anódico (I_p) da base guanina, do ssDNA, em relação a concentração de onocalixona. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹) e contra-eletródo: fio de platina, r : 0,9785.



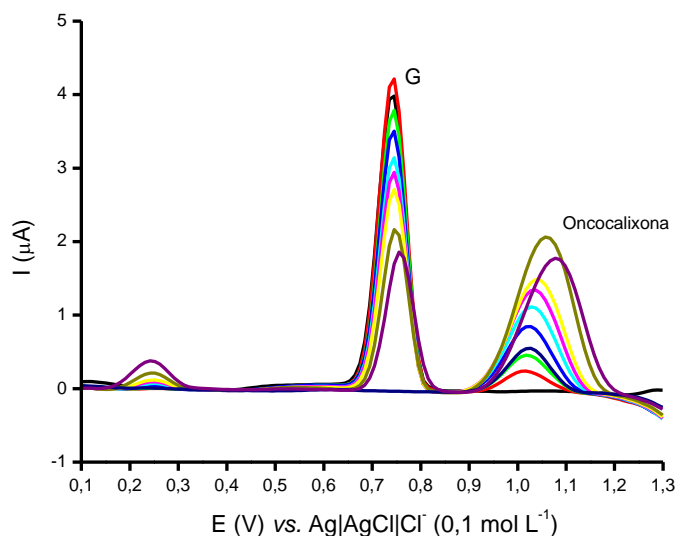
Fonte: Autor, 2011.

Sabe-se que muitas substâncias biologicamente ativas interagem com as bases livres do DNA por meio de reações radicalares em seus sítios ativos (Kamel *et al.*, 2008), bem como, algumas outras promovem reações do tipo “adição de Michael”, caso de quinonas que são conhecidas por atuarem como receptores de Michael (Abreu *et al.*, 2009). Uma vez que esse tipo de reação ocorre entre a quinona e o DNA, uma diminuição nas correntes de oxidação pode ser observada, tendo em vista a diminuição da quantidade de bases livres para serem oxidadas. Porém, o deslocamento anódico de potencial observado, pode ser atribuído à interação da substância em outro sítio do DNA diferente das bases (ex. grupos fosfatos), dificultando assim a oxidação das mesmas no eletrodo e, portanto deslocando o potencial de oxidação.

5.1.5.2. Análise da Interação da Oncocalixona com as Bases Guanina e Adenina

Com o objetivo de comprovar se a diminuição nas correntes anódicas de oxidação das bases do ssDNA, no experimento anterior, seria referente à interação das mesmas com a oncocalixona, e não devido a uma possível adsorção do ssDNA na superfície do eletrodo ou outro tipo de interação da quinona em um sítio diferente das bases, fez-se necessário a análise com as bases individualmente, utilizando-se VPD. Um comportamento similar ao obtido nas análises com ssDNA foi observado quando as bases foram estudadas individualmente, em VPD. Na análise com a guanina, foi observado um sinal de oxidação bastante intenso (**Figura 61**).

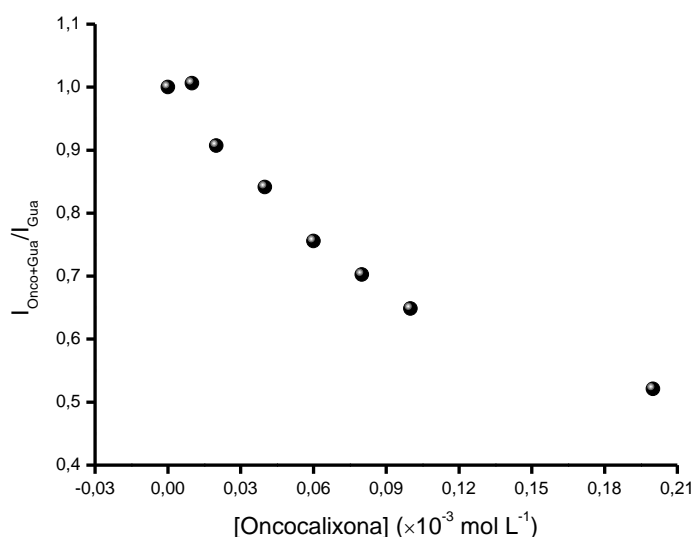
Figura 61. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de Guanina (♦) [tampão acetato etanólico (20 %, v/v), pH 4,5] em presença de 10 (♦), 20 (◆), 40 (◇), 60 (◆), 80 (◆), 100 (◆), 200 (◆) e 400 (◆) $\times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de oncocalicxona. Para comparação, 40×10^{-6} mol L⁻¹ de oncocalicxona foi analisado na ausência de guanina (◆). Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹) e contra-eleto: fio de platina, velocidade de varredura: 0,010Vs⁻¹.



Fonte: Autor, 2011.

Contudo, quando alíquotas de oncocalicxona foram adicionadas à solução da referida base, uma diminuição na intensidade da corrente de oxidação da guanina foi observada (diminuição de aproximadamente 48%, **Figura 62**). Estes resultados, demonstraram de fato, que uma interação entre a base guanina e a quinona ocorreu.

Figura 62. Dependência da corrente de pico anódico (I_p) da base guanina, em relação à concentração de oncoalexona. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹) e contra-eletrodo: fio de platina.



Fonte: Autor, 2011.

Na análise com a base adenina, o resultado se mostrou insatisfatório, tal qual no estudo com ssDNA, devido aos potenciais de oxidação, tanto da base quanto da oncoalexona, serem próximos. Desta forma, as demais análises com a adenina não foram levadas adiante.

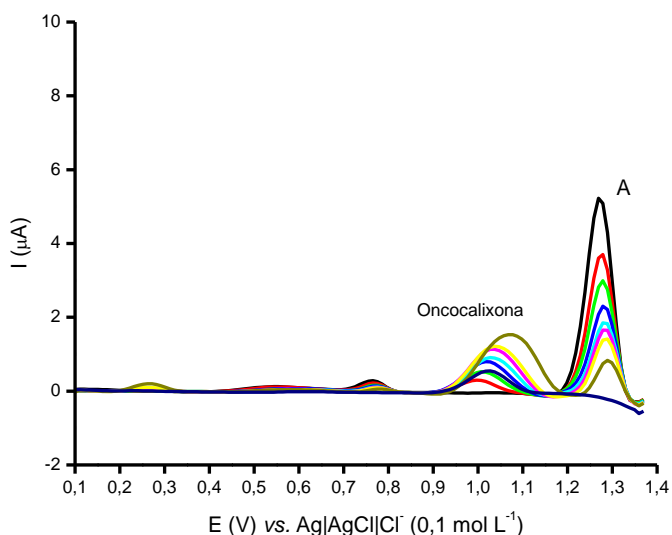
5.1.5.3. Análise da Interação da Oncocalixona com os Ácidos Poliguanílico (poliG) e Poliadenílico (poliA)

De forma similar aos estudos das bases, análises usando poliG e poliA foram realizadas, em VPD, objetivando verificar a influência do substituinte açúcar-fosfato do nucleotídeo em relação à oxidação da base, quando em presença de oncoalexona.

Um comportamento similar ao visto nos estudos com as bases foi observado para o poliA, embora haja deslocamento no potencial de oxidação da adenina e a corrente de pico da base não seja tão intensa. Tal deslocamento pode ser atribuído a um efeito indutivo do substituinte açúcar-fosfato do nucleotídeo, que dificulta a

oxidação da base; já em relação à altura do pico de oxidação, seria devido a um menor coeficiente de difusão e a um possível aumento nas energias de reorganização associadas com a transferência de elétrons da espécie no eletrodo (Boussicault *et al.*, 2008).

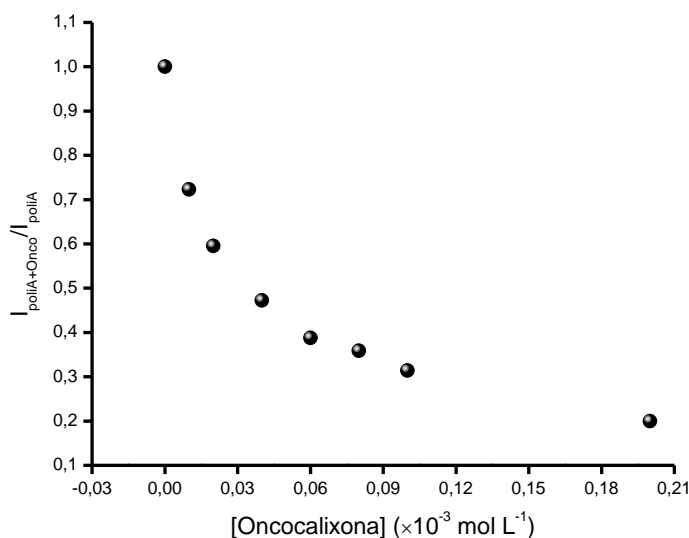
Figura 63. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para o poliA (♦) [tampão acetato etanólico (20%, v/v), pH 4,5] em presença de 10 (♦), 20 (♦), 40 (♦), 60 (♦), 80 (♦), 100 (♦) e 200 (♦) $\times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de oncocalicxona. Para comparação, $4,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de oncocalicxona na ausência de poliA foi analisada (♦). Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹) e contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,010 V s⁻¹.



Fonte: Autor, 2011.

A diminuição na corrente de pico observada quando alíquotas de oncocalicxona foram adicionadas à solução de poliA foi mais intensa (**Figura 63**) do que quando a base isolada foi usada, ocorrendo uma diminuição de aproximadamente 80% na corrente (**Figura 64**), bem como, um leve deslocamento de potencial de oxidação do poliA.

Figura 64. Dependência da corrente de pico anódico (I_p) da base adenina do poliA, em relação à concentração de onco calixona. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹) e contra-eletrodo: fio de platina.



Fonte: Autor, 2011.

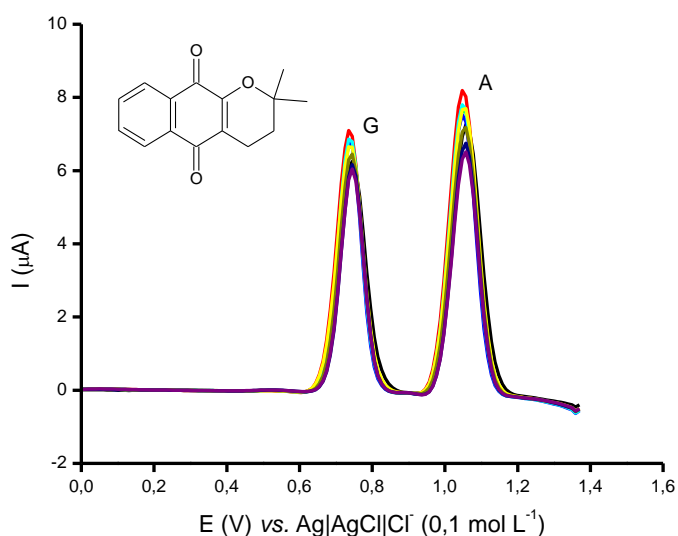
Esta análise foi indicativa de que mesmo com a presença da função açúcar-fosfato, a interação entre a onco calixona e a base adenina do poliA foi conseguida com uma intensidade maior do que a vista anteriormente com a base sozinha, uma vez que em DNA nativo, as bases estão ligadas ao grupo açúcar-fosfato que constituem a espinha dorsal da biomolécula. Em relação ao ácido poliG, o mesmo foi analisado, porém o potencial de pico de oxidação da base guanina no ácido se mostrou deslocado em relação à base isolada, coincidindo com o potencial de oxidação da onco calixona, e, desta forma, não foi considerado nestas análises.

5.1.5.4. Análise de um Controle Negativo (α -Lapachona) com ssDNA

No intuito de se obter uma análise com um controle (“probe”) negativo em relação à interação das quinonas com ssDNA, um experimento utilizando α -lapachona, como um “probe” negativo, foi realizado em presença da biomolécula. As mesmas condições experimentais usadas para a análise da onco calixona foram conduzidas para a α -lapachona. Os resultados obtidos mostraram que nenhuma

interação significativa entre a α -lapachona e o ssDNA ocorreu (**Figura 65**), apresentando uma diminuição de apenas 6% na corrente de oxidação das bases do ssDNA. Este resultado valida a interação positiva alcançada pela onco-calixona em relação ao ssDNA, bem como para a biflorina e juglona, como pode ser constatado nos próximos tópicos.

Figura 65. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para o ssDNA (♦) [tampão acetato etanólico (20%, v/v), pH 4,5] em presença de 10 (♦), 20 (♦), 40 (♦), 60 (♦), 80 (♦), 100 (♦), 200 (♦) e 400 (♦) $\times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de α -Lapachona. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹) e contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,010 V s⁻¹.

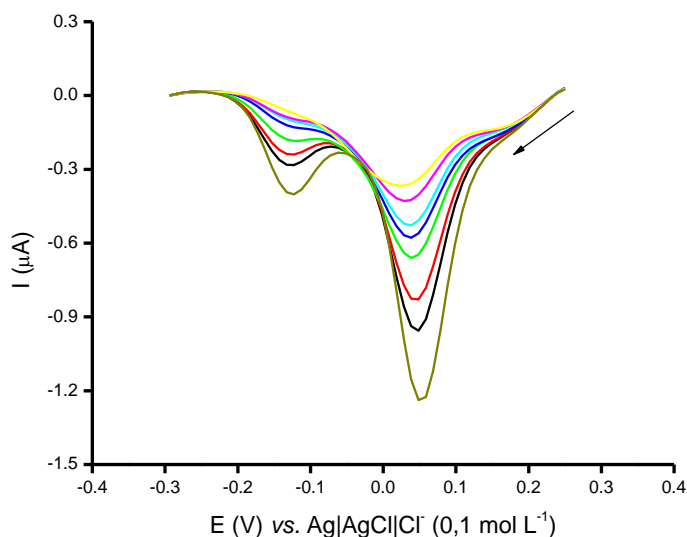


Fonte: Autor, 2011.

5.1.5.5. Análise Voltamétrica da Interação entre Oncocalixona-DNA e Determinação da Constante de Associação em VPD

O estudo do comportamento voltamétrico (em VPD) para a redução de $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de onco-calixona em ausência e presença de ssDNA, utilizando eletrodo de carbono vítreo limpo é mostrado na **Figura 66**.

Figura 66. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de oncocalixona (◆) [tampão acetato etanólico (20%, v/v), pH 4,5] em presença de 0,003 (◆), 0,006 (◆), 0,011 (◆), 0,016 (◆), 0,022 (◆), 0,027 (◆) e 0,050 (◆) g L⁻¹ de ssDNA. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, velocidade de varredura: 0,010 V s⁻¹.



Fonte: Autor, 2011.

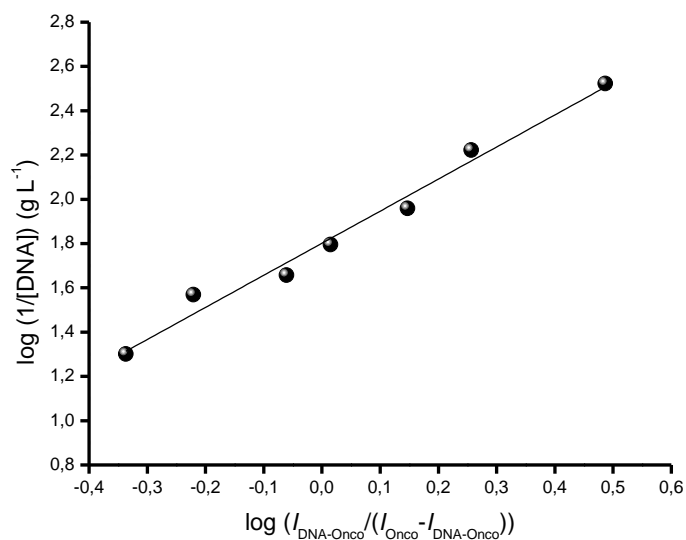
O voltamograma da oncocalixona apresentou um pico catódico bem definido em +0,051 V com $I_{pc} = 1,073 \mu\text{A}$, bem como um segundo pico de menor intensidade, em -0,125 V, em tampão acetato etanólico, 20% (v/v), pH 4,5. A partir de adições de 0,003 a 0,050 g L⁻¹ de ssDNA feitas à solução de oncocalixona, foram verificados uma diminuição na corrente de redução (aproximadamente 68,46%) e o deslocamento no potencial de pico da quinona (para o lado negativo) de cerca de 31 mV. A diminuição substancial na corrente de pico observada pode ser atribuída a uma diminuição na concentração da quinona livre, diminuindo assim, a difusão das moléculas em direção ao eletrodo e também, devido a um aumento na massa molecular com a formação do aduto oncocalixona-DNA.

Em relação ao potencial de redução da quinona, na presença de DNA é observado que o potencial de pico se deslocou negativamente. De acordo com Carter e colaboradores (Carter *et al.*, 1989) e Tian e colaboradores (Tian *et al.*, 2008), o potencial se desloca negativamente quando o tipo de ligação formado é uma interação eletrostática. Por outro lado, o potencial de pico se desloca positivamente quando pequenas moléculas interagem com DNA de uma outra

maneira que não a eletrostática para ssDNA. Desta forma, podemos concluir que a ligação entre a oncocalicxona e o DNA seria baseada em uma interação eletrostática entre as espécies, sendo que o complexo formado entre elas seria eletroquimicamente inerte.

O decaimento gradual da corrente de pico da oncocalicxona pelo aumento da concentração do DNA, na faixa de concentração de 0,003 a 0,050 g L⁻¹, pode ser utilizado para obter a constante de associação do complexo pela aplicação da **Equação 8**, pg. 93 (Feng *et al.*, 1997; Carter *et al.*, 1989; Sha, *et al.*, 2009). A constante de associação apresentou um valor de 63,314 (± 0,02) g L⁻¹, sendo obtida por meio do uso do coeficiente linear do gráfico do $\log (1/[DNA])$ vs. $\log [I_{DNA-onco}/(I_{onco} - I_{DNA-onco})]$ (**Figura 67**). A alta afinidade relativa observada e a forte ligação entre a oncocalicxona e o DNA justificam sua candidatura como uma efetiva e promissora droga para alvos terapêuticos ligados ao DNA.

Figura 67. Gráfico do $\log (I_{DNA-Onco}/(I_{Onco}-I_{DNA-Onco}))$ vs. $\log (1/ [DNA])$ usado para calcular a constante de associação do complexo DNA-Oncocalicxona. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, coef. linear: 1,8015, coef. angular: 1,4491, *r*: 0,9796.



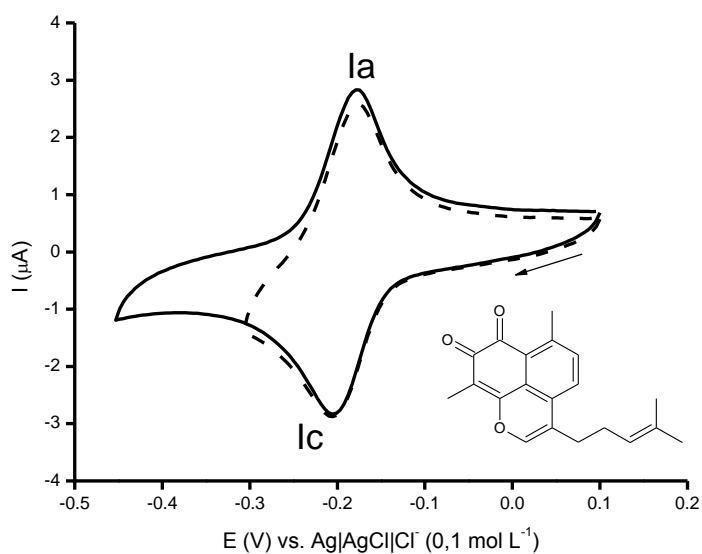
Fonte: Autor, 2011.

5.2. Parte 2. Análise Eletroquímica da Biflorina

5.2.1. Análises em Meio Prótico

A análise eletroquímica da biflorina ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em voltametria cíclica, utilizando eletrodo de carbono vítreo, mostrou um comportamento de redução típico de *orto*-quinonas em meio prótico (tampão acetato etanólico, 40%, v/v, pH 4,5) (De Abreu *et al.*, 2007), representado por um par de picos ($E_{plc} = -0,205 \text{ V}$ e $E_{pla} = -0,178 \text{ V}$) de natureza quase-reversível (**Figura 68**).

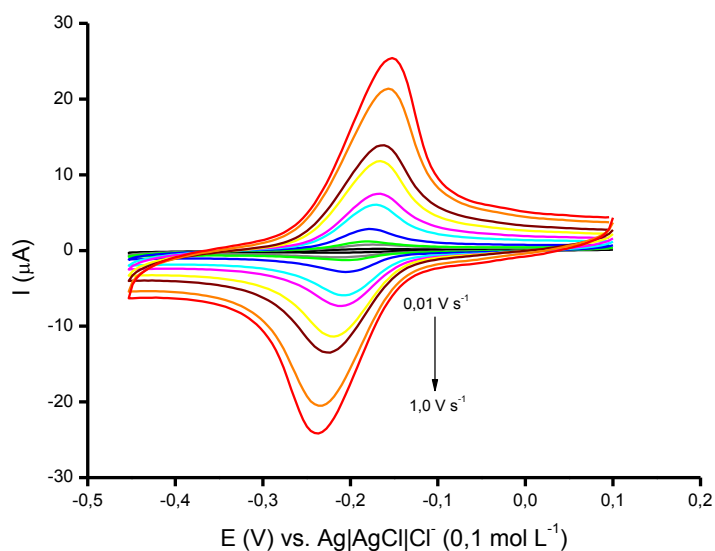
Figura 68. Voltamograma cíclico para biflorina $c = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a 100 mV s^{-1} . Meio: tampão acetato etanólico (40%, v/v), pH 4,5. Eletrodo de trabalho: Cv, referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹), contra-eletrodo: fio de platina.



Fonte: Autor, 2011.

No estudo voltamétrico da corrente em função da velocidade de varredura (I_{pIc} vs. $v^{1/2}$) (**Figuras 69 e 70A**), há linearidade, demonstrando, desta forma, que o transporte de massa através da solução foi de natureza difusional.

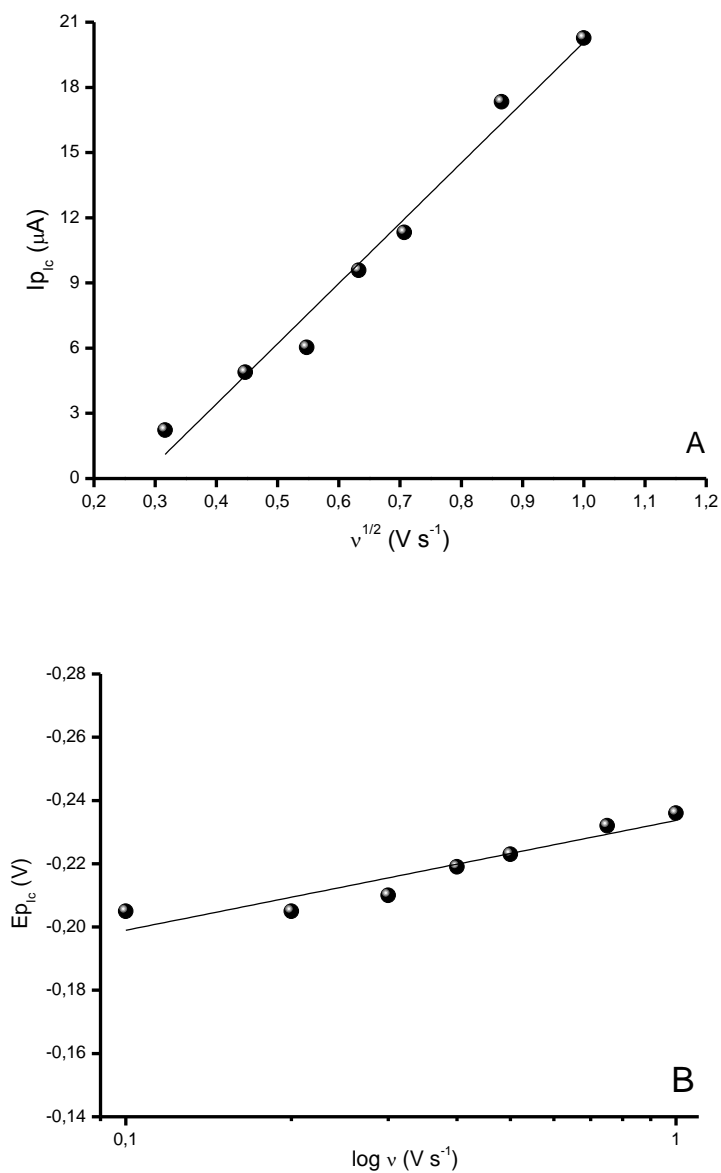
Figura 69. Voltamogramas cíclicos da biflorina com variação da velocidade de varredura, em tampão acetato etanólico (40%, v/v), pH 4,5. Velocidades analisadas: 10 (◆), 35 (◇), 50 (◇), 100 (◆), 200 (◆), 300 (◆), 400 (◆), 500 (◆), 750 (◆) e 1000 (◆) mV s^{-1} . Concentração da biflorina na cela eletroquímica: $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: $\text{Ag|AgCl|Cl}^- (0,1 \text{ mol L}^{-1})$, contra-eletrodo: fio de platina.



Fonte: Autor, 2011.

A partir da análise de $E_{p_{lc}}$ vs. $\log v$ (**Figura 70B**), foi observado um discreto deslocamento do potencial de pico catódico da biflorina ($E_{p_{lc}} = -0,205 \text{ V}$) com o aumento da velocidade de varredura, o que caracteriza um processo quase-reversível com um possível consumo de 2 elétrons e 1 próton ($\Delta E_p = 27 \text{ mV}$) (Gordillo *et al.*, 2000) (Southampton Electrochemistry Group).

Figura 70. Gráficos representativos do comportamento voltamétrico (VC) da biflorina com ênfase na dependência da corrente de pico com o aumento da velocidade de varredura ($I_{p_{1c}}$ vs. $v^{1/2}$), r : 0,9772 (A) e na dependência do potencial com aumento linear da velocidade ($E_{p_{1c}}$ vs. $\log v$) (B). Meio prótico, tampão acetato etanólico (40%, v/v), pH 4,5, vs. Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹), eletrodo de trabalho: carbono vítreo.



Fonte: Autor, 2011.

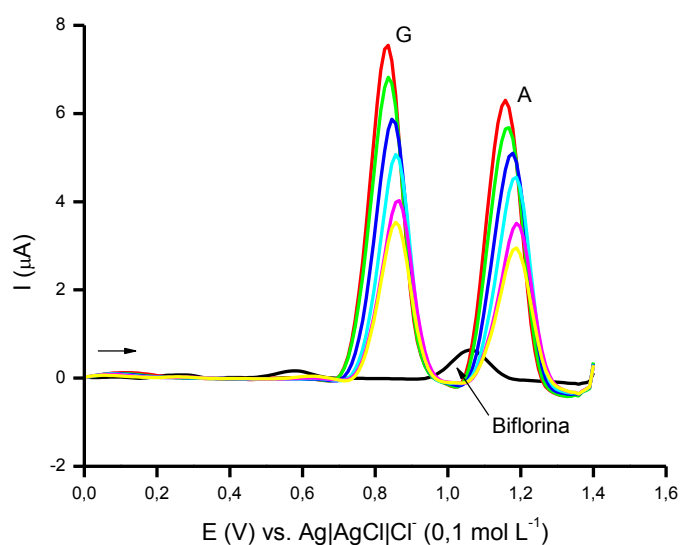
5.2.2. Análises com DNA

Em alguns estudos com dsDNA, foi demonstrado que a biflorina causou danos ao mesmo, deixando suas bases livres para serem oxidadas (Vasconcellos, 2007a). Já as análises com ssDNA, o diagnóstico de uma possível interação entre a quinona e as bases expostas ou seus nucleotídeos, bem como a determinação da constante de associação do complexo formado é indicado a seguir.

5.2.2.1. Análise da Interação da Biflorina com ssDNA

Objetivando verificar se há interação entre a biflorina e o DNA, várias alíquotas da quinona foram adicionadas a uma solução de ssDNA, e foram analisadas em voltametria de pulso diferencial (**Figura 71**).

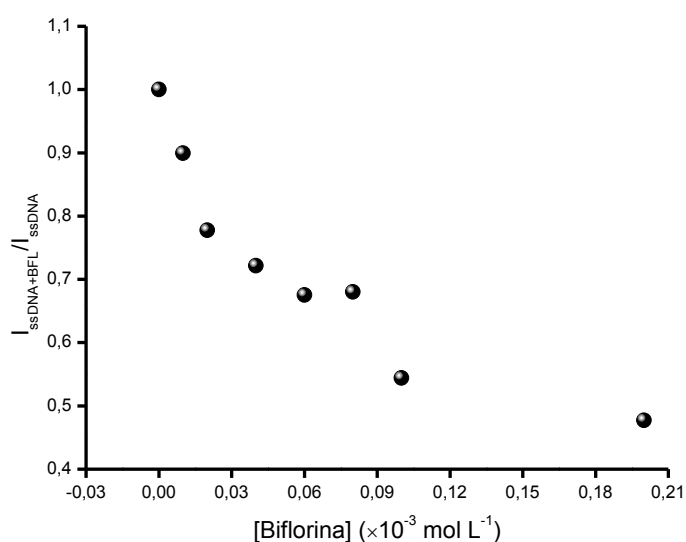
Figura 71. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para o ssDNA (♦) [tampão acetato etanólico, (40%, v/v), pH 4,5] em presença de 10 (◆), 20 (◇), 60 (◊), 100 (◆) e 200 (◆) $\times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de Biflorina. Para comparação, 100 $\times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de biflorina em ausência de ssDNA foi analisada (◆). Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹) e contra-eletródo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,010 V s⁻¹.



Fonte: Autor, 2011.

Como pode ser constatado na **Figura 71**, o resultado desta análise evidenciou características de interação, tendo em vista que os sinais associados à oxidação das bases livres no ssDNA [guanina (G) e adenina (A)] que eram bastante intensos, diminuíram em amplitude, quando alíquotas de biflorina foram adicionadas à solução de ssDNA contida na cela eletroquímica (Kamel *et al.*, 2008).

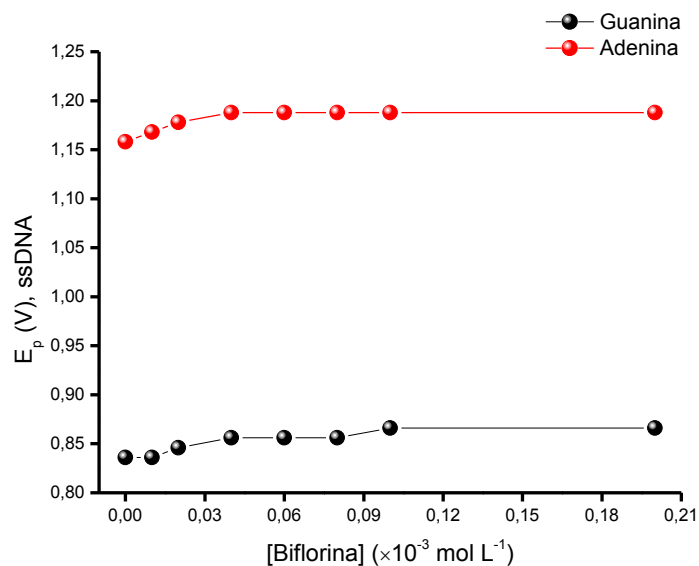
Figura 72. Dependência da corrente de pico anódica (I_p) da base guanina, no ssDNA, em relação à concentração de biflorina em solução. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹) e contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,010 V s⁻¹.



Fonte: Autor, 2011.

Como já foi observado, a diminuição da corrente de pico de oxidação da guanina no ssDNA (cerca de 53%) (**Figura 72**) e um leve deslocamento no potencial de oxidação da base (**Figura 73**), quando houve um aumento na concentração da biflorina, são indicadores positivos de interação entre o ssDNA e a quinona.

Figura 73. Dependência dos potenciais de pico anódico (E_p) de Guanina e Adenina, no ssDNA, em relação à concentração de biflorina, obtida por VPD. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹), contra-eletrodo: fio de platina e velocidade de varredura: 0,010 V s⁻¹.

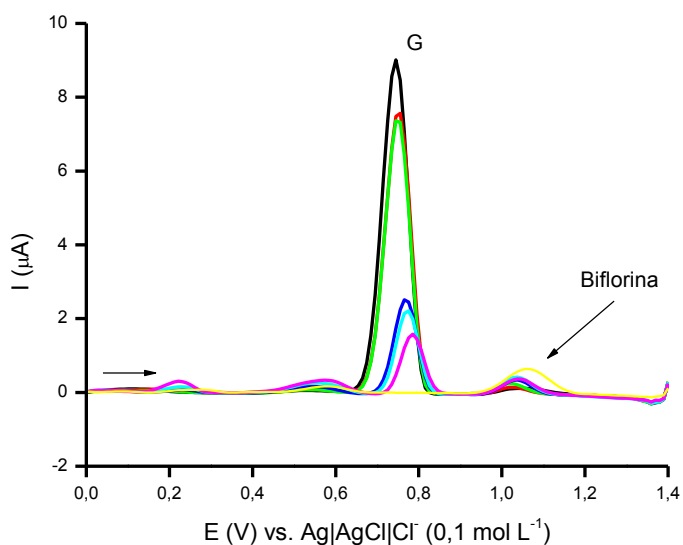


Fonte: Autor, 2011.

5.2.2.2. Análise da Interação da Biflorina com as Bases Guanina e Adenina

Fez-se necessário a análise eletroquímica, em VPD, da interação entre a biflorina e as bases individualmente, no intuito de verificar se as interações ocorridas no experimento com ssDNA, visto anteriormente, seriam por causa de uma ligação forte entre a quinona e as bases, e não devido a interações adsorptivas na superfície do eletrodo ou ligações formadas entre a quinona e outros sítios ativos presentes na molécula do ssDNA.

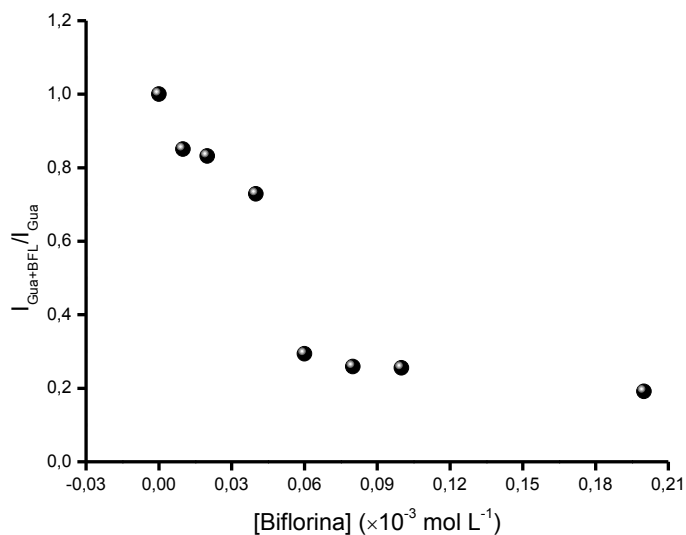
Figura 74. Voltamogramas com correção de linha de base para $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de Guanina (\blacklozenge) [tampão acetato etanólico (40%, v/v), pH 4,5] em presença de 10 (\blacklozenge), 20 (\blacklozenge), 60 (\blacklozenge), 100 (\blacklozenge) e 200 (\blacklozenge) $\times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de biflorina. Para comparação, $100 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de biflorina em ausência de guanina foi analisada (\blacklozenge). Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl^- ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e contra-eletródo: fio de platina, velocidade de varredura: $0,010 \text{ V s}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2011.

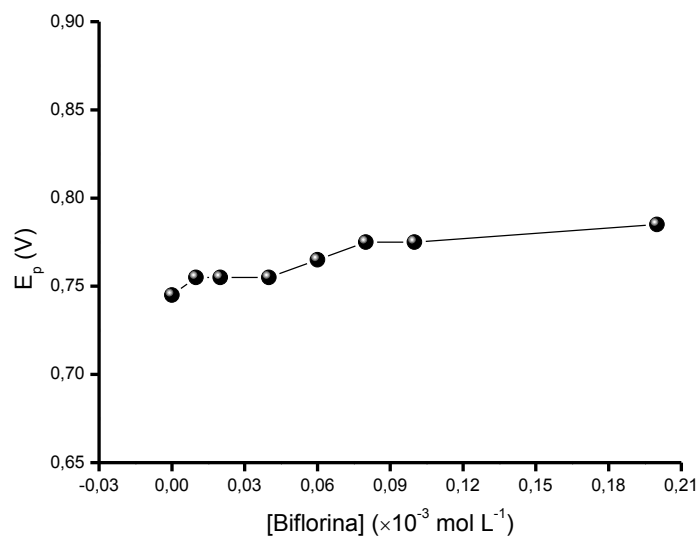
Foi verificado neste estudo, um comportamento similar ao obtido com ssDNA, quando apenas as bases individuais são analisadas. A corrente de oxidação da base guanina (**Figura 74**, acima) diminui de forma bastante intensa quando em presença de biflorina (diminuição de 81%, **Figura 75**), bem como um deslocamento de potencial é observado com o aumento da concentração da quinona (**Figura 76**).

Figura 75. Dependência da corrente de pico anódica (I_p) da guanina, em relação à concentração de biflorina em solução. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹) e contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,010 V s⁻¹.



Fonte: Autor, 2011.

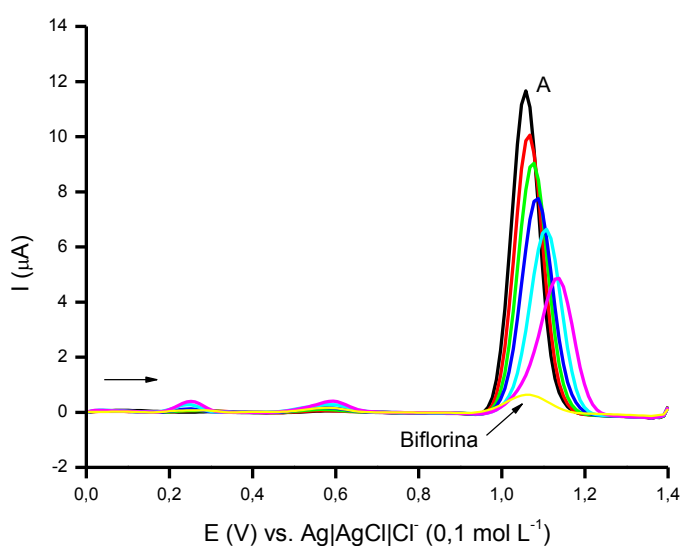
Figura 76. Dependência do potencial de pico anódico (E_p) da guanina em relação à concentração de biflorina, obtida por VPD. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹) e contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,010 V s⁻¹.



Fonte: Autor, 2011.

Similarmente à guanina, a adenina foi analisada, sendo observada uma diminuição na corrente de oxidação da base, com o aumento da concentração da biflorina (**Figura 77**). Porém, tanto a biflorina como a adenina possuem potenciais de oxidação coincidentes, impossibilitando uma análise mais precisa da variação de corrente.

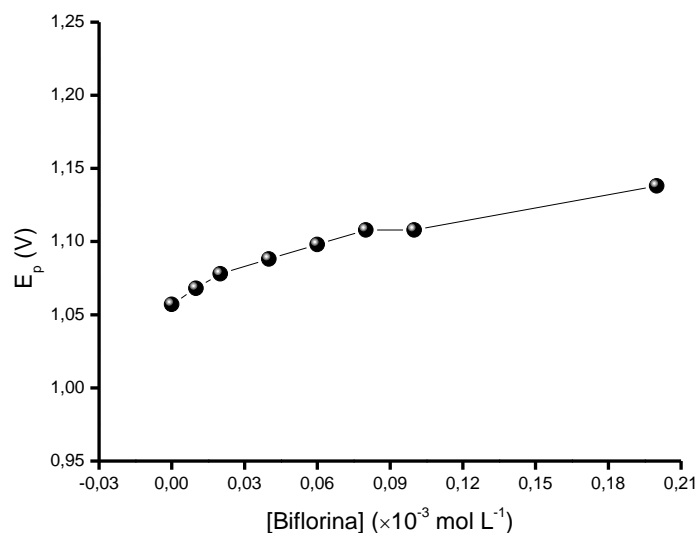
Figura 77. Voltamogramas com correção de linha de base para $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de Adenina (\blacklozenge) [tampão acetato etanólico (40%, v/v), pH 4,5] em presença de 10 (\blacklozenge), 20 (\blacklozenge), 40 (\blacklozenge), 100 (\blacklozenge) e 200 (\blacklozenge) $\times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de biflorina. Para comparação, análise de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de biflorina em ausência de adenina (\blacklozenge). Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl^- ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e contra-eletródo: fio de platina, velocidade de varredura: $0,010 \text{ V s}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2011.

Analisando a variação do potencial de oxidação da adenina, temos um claro indício da interação entre ela e a quinona, devido à dificuldade de oxidação da adenina, por conta da forte interação entre essas duas moléculas (**Figura 78**).

Figura 78. Dependência do potencial de pico anódico (E_p) da adenina em relação à concentração de biflorina, obtido em VPD. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo. Referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹) e contra-eletródo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,010 V s⁻¹.



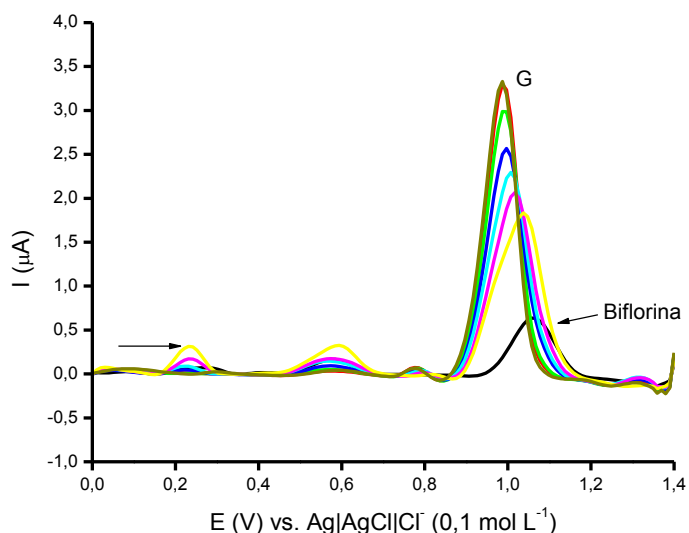
Fonte: Autor, 2011.

O comportamento eletroquímico observado para as bases em relação à biflorina corroborou com o relatado para a análise com ssDNA, destacando a forte interação entre elas.

5.2.2.3. Análise da Interação da Biflorina com os Ácidos Poliguanílico (poliG) e Poliadenílico (poliA)

Da mesma forma como foram feitos os estudos da onocalixona com os ácidos poliG e poliA, no sentido de verificar a influência dos substituintes fosfato ligados as bases, a análise da biflorina foi conduzida, em VPD.

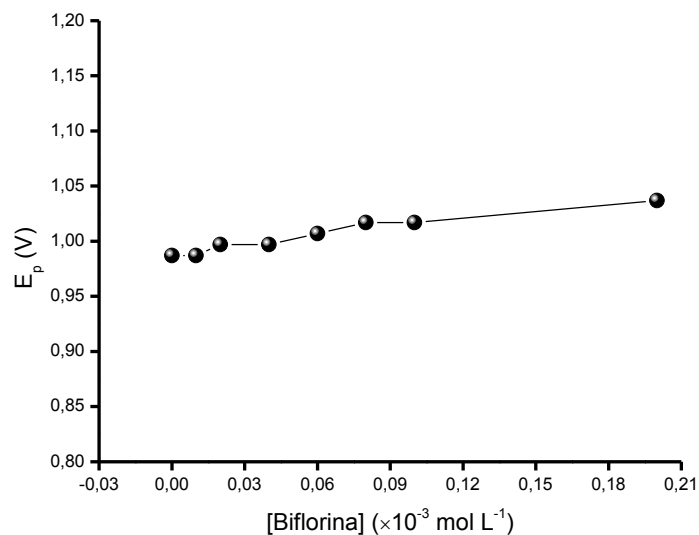
Figura 79. Voltamogramas com correção de linha de base para o ácido poliG (◆) [tampão acetato etanólico (40%, v/v), pH 4,5] em presença de 10 (◆), 20 (◆), 40 (◆), 60 (◆), 100 (◆) e 200 (◆) $\times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de biflorina. Para comparação, biflorina na ausência de poliG foi conduzida na concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (◆).



Fonte: Autor, 2011.

Como pôde ser visto na **Figura 79**, o pico de oxidação da base guanina presente no ácido foi coincidente com o da quinona, não permitindo uma análise mais detalhada. Vale ressaltar, que da mesma forma que a variação na corrente de oxidação, o deslocamento de potencial da base nos propiciou indícios de interação (**Figura 80**). Desta forma, a interação entre a biflorina e o poliG foi confirmada, mesmo quando era observada superposição de potenciais entre a quinona e a guanina do ácido.

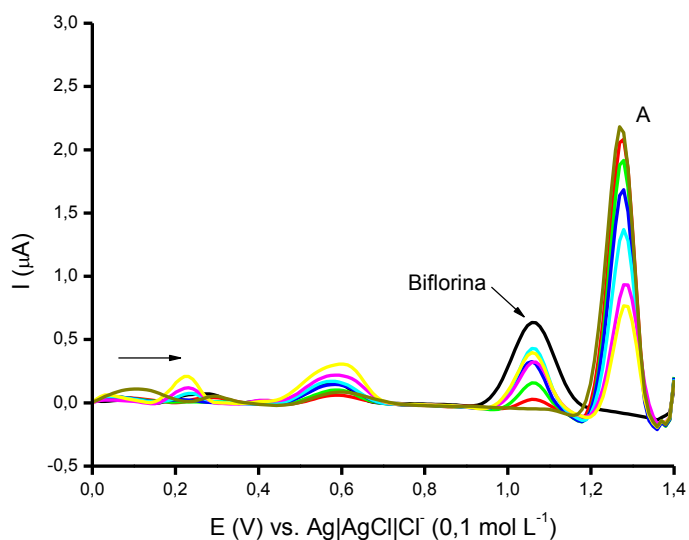
Figura 80. Dependência do potencial de pico anódico (E_p) da base guanina, presente no poliG, em relação a concentração de biflorina, obtido em VPD. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo. Referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹) e contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,010 V s⁻¹.



Fonte: Autor, 2011.

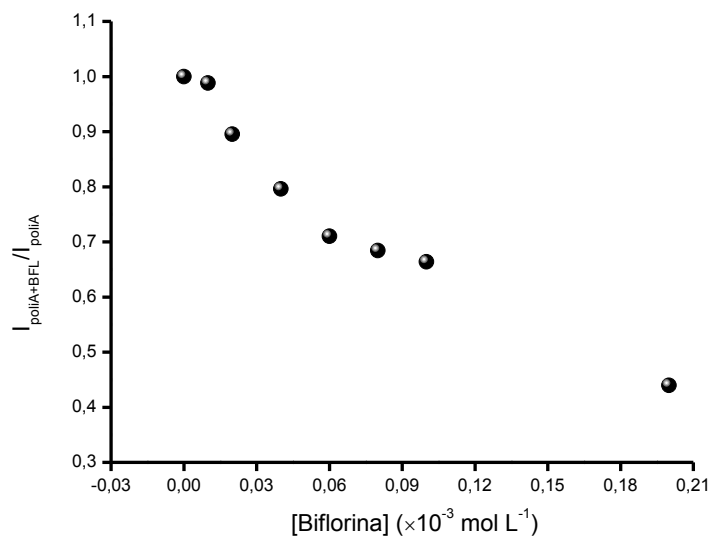
Em contrapartida, como não houve superposição dos potenciais de oxidação da base adenina, presente no ácido poliA, e o da biflorina, a análise eletroquímica nos deu indícios claros de que a interação entre as duas espécies ocorreu, devido à diminuição na corrente de pico da adenina (cerca de 56%) (**Figuras 81 e 82**).

Figura 81. Voltamogramas com correção de linha de base para o ácido poliA (◆) [tampão acetato etanólico (40%, v/v), pH 4,5] em presença de 10 (◆), 20 (◆), 40 (◆), 60 (◆), 100 (◆) e 200 (◆) $\times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de biflorina. Para comparação, biflorina na ausência de poliA foi analisada na concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (◆).



Fonte: Autor, 2011.

Figura 82. Dependência da corrente de pico anódica (I_p) da base adenina, presente no ácido poliA, em relação à concentração de biflorina em solução. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹) e contra-eletródo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,010 V s⁻¹.



Fonte: Autor, 2011.

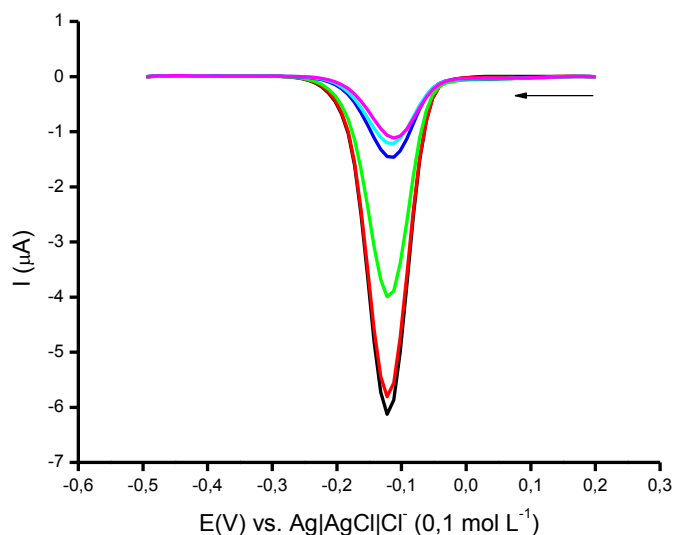
As análises eletroquímicas com os ácidos poliG e poliA foram de grande relevância, tendo em vista que os nucleotídeos são de fundamental importância no organismo, sendo constituintes do DNA. Além do mais, foi confirmado que a presença da função fosfato nos ácidos não dificultou a interação entre a quinona e as bases do nucleotídeo. Estes resultados são importantes, devido à necessidade de se monitorar a influência da metade açúcar-fosfato dos nucleotídeos em relação a atividade de alguns fármacos baseados na interação com as bases do DNA.

5.2.2.4. Análise Voltamétrica da Interação entre Biflorina-DNA e Determinação da Constante de Associação, em VPD

Da mesma forma como foi verificado no estudo para a oncolixona, o estudo do comportamento voltamétrico (VPD, eletrodo de carbono vítreo) para a redução de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de biflorina na ausência e presença de ssDNA, foi realizado (**Figura 83**), apresentando um pico bem definido em $-0,122 \text{ V}$ com $I_{\text{plc}} = 6,471 \text{ } \mu\text{A}$ (vs. $\text{Ag|AgCl|Cl}^{-1} 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) em tampão acetato etanólico, 40% (v/v), pH 4,5. De acordo com as adições de ssDNA ($0,006$ a $0,085 \text{ g L}^{-1}$) à solução de biflorina, uma diminuição na corrente de redução (aproximadamente 83%) e um deslocamento no potencial de pico da quinona (para o lado positivo) de cerca de 10 mV , foram observados.

A atribuição da diminuição da corrente de redução da biflorina, conforme o aumento da concentração do ssDNA na solução, seria devido à diminuição na difusão das moléculas livres da quinona em direção ao eletrodo e também, ao aumento da massa molecular do aduto formado, DNA-biflorina.

Figura 83. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de biflorina (♦) [tampão acetato etanólico (40%, v/v), pH 4,5] em presença de 0,006 (♦), 0,016 (◆), 0,050 (◆), 0,070 (◆) e 0,085 (◆) g L⁻¹ de ssDNA. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, Velocidade de varredura: 0,010 V s⁻¹.

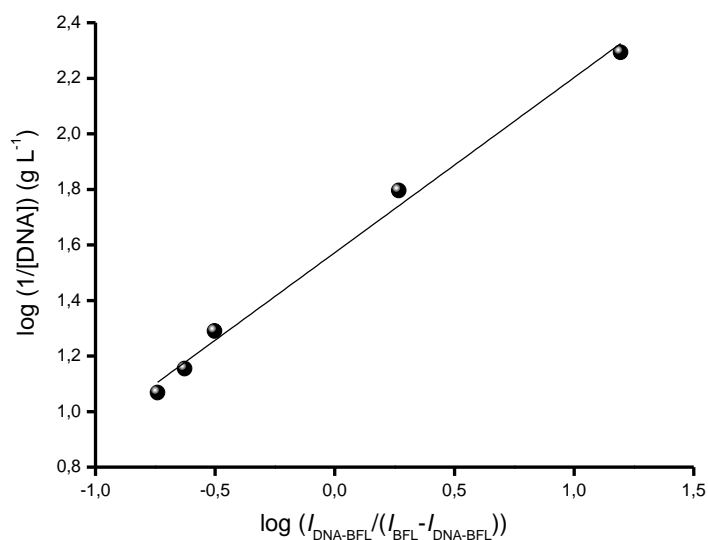


Fonte: Autor, 2011.

Em relação à variação do potencial de redução da quinona, o potencial de pico se deslocou positivamente com o aumento da concentração de DNA. Deslocamento positivo do potencial seria devido a pequenas moléculas interagirem com o DNA de maneira intercalativa, enquanto deslocamento negativo de potencial seria quando haveria formação de ligação eletrostática entre as espécies (Carter *et al.*, 1989; Tian *et al.*, 2008). Desta forma, podemos concluir que a ligação entre a biflorina e o DNA, diferentemente da oncolicalixona, seria baseada em uma interação intercalativa entre as moléculas, tendo como produto formado, um aduto eletroquimicamente inerte.

Por sua vez, o decaimento da corrente de pico da biflorina através do aumento da concentração de DNA em solução (0,006 a 0,085 g L⁻¹), foi utilizado para a obtenção da constante de associação do complexo, aplicando-se a equação descrita anteriormente (**Equação 8**). A constante de associação calculada foi de 37,342 (\pm 0,02) g L⁻¹, obtida por meio do coeficiente de correlação linear do gráfico abaixo (**Figura 84**).

Figura 84. Gráfico do $\log (I_{\text{DNA-BFL}}/I_{\text{BFL}}-I_{\text{DNA-BFL}})$ vs. $\log (1/[\text{DNA}])$ usado para calcular a constante de associação do complexo DNA- Biflorina. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, coef. linear: 1,5722, coef. angular: 0,6303, r : 0,9911.



Fonte: Autor, 2011.

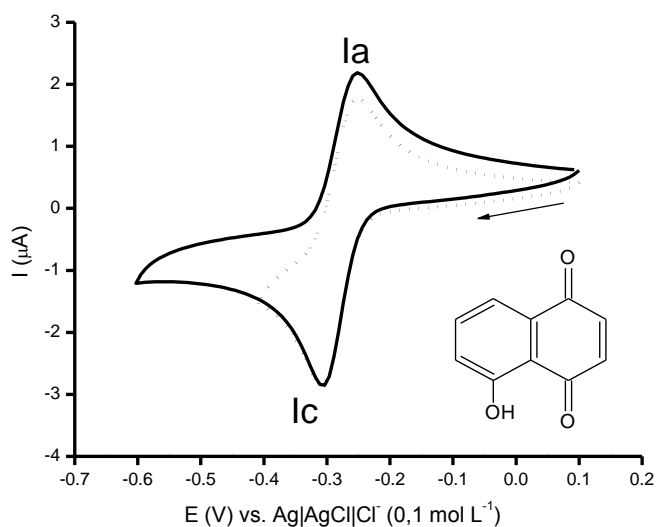
Considerando o valor da constante obtida para a biflorina, e mesmo comparando-a com os dados apresentados para a onocalixona, a constante encontrada nos revela uma afinidade relativamente alta entre a biflorina e o DNA, sendo desta forma, uma substância promissora no desenvolvimento de novos fármacos, cujo enfoque seja a interação com DNA.

5.3. Parte 3. Análise Eletroquímica da Juglona

5.3.1. Análise Eletroquímica da Juglona

Nos voltamogramas cíclicos da juglona (em carbono vítreo), a análise mostrou um comportamento característico de redução de quinonas em meio prótico [tampão acetato etanólico (20%, v/v) pH 7,0] (De Abreu *et al.*, 2007), representado por um, sistema eletroquímico reversível ($E_{plc} = -0,303$ V, $E_{pla} = -0,251$ V, em velocidade de varredura de $0,100$ V s⁻¹), de natureza difusional (**Figura 85**).

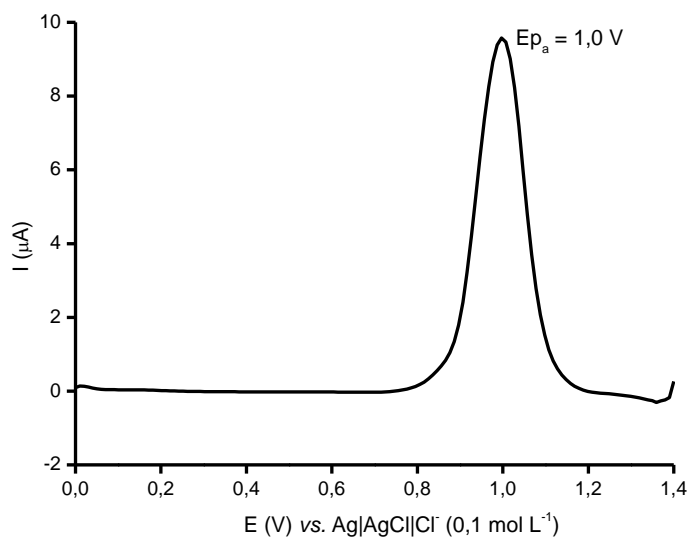
Figura 85. Voltamograma cíclico da juglona $c = 1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Meio: tampão acetato etanólico (20%, v/v), pH 7,0. Velocidade de varredura: $0,1$ V s⁻¹, eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl⁻ ($0,1$ mol L⁻¹).



Fonte: Autor, 2011.

A análise da oxidação da juglona em voltametria de pulso diferencial (realizado em VPD, devido a sensibilidade e no intuito de comparação em futuras análises com ssDNA), em meio prótico [tampão acetato etanólico (20%, v/v), pH 4,5] em eletrodo de carbono vítreo, mostrou a presença de um pico de oxidação bem definido, $E_{pa} = 1,0$ V (**Figura 86**), o qual servirá como referência nas análises seguintes utilizando DNA.

Figura 86. Voltamograma de pulso diferencial, com correção de linha de base, para a oxidação da juglona ($2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em meio prótico, tampão acetato etanólico (20%, v/v) pH 4,5. Amplitude de pulso: 0,05 V, velocidade de varredura: $0,01 \text{ V s}^{-1}$, eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl^- ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

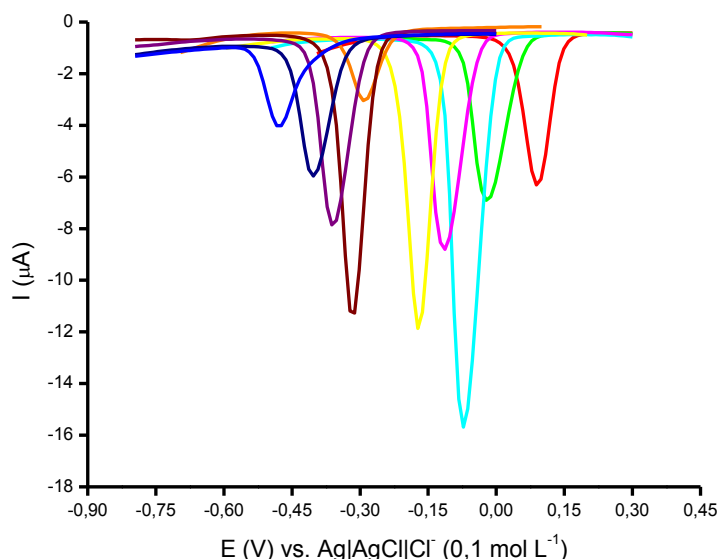


Fonte: Autor, 2011.

5.3.2. Análise da Influência do pH da Solução no Potencial de Pico de Redução da Juglona e Determinação do pKa

A redução da juglona foi também estudada usando voltametria de pulso diferencial, para uma larga faixa de pH, em meio prótico misto tamponado [tampão acetato etanólico (20%, v/v), em eletrodo de carbono vítreo]. Como visto anteriormente nas análises em VC, a juglona apresentou apenas um pico de redução, sendo suas correntes (I_{p_c}) e potenciais de pico (E_{p_c}) dependentes do pH do meio (**Figura 87**).

Figura 87. Voltamogramas de pulso diferencial para $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de juglona em função do pH da solução. Valores de pH analisados: 0,8 (♦), 2,5 (◆), 3,22 (◆), 3,85 (◆), 4,83 (◆), 6,85 (◆), 7,96 (◆), 9,18 (◆), 10,06 (◆) e 12,36 (◆). Meio: tampão fosfato etanólico (20%, v/v). Amplitude de pulso: 0,05 V, velocidade de varredura: 0,005 V s⁻¹, eletrodo de referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹), contra-eletrodo: fio de platina.

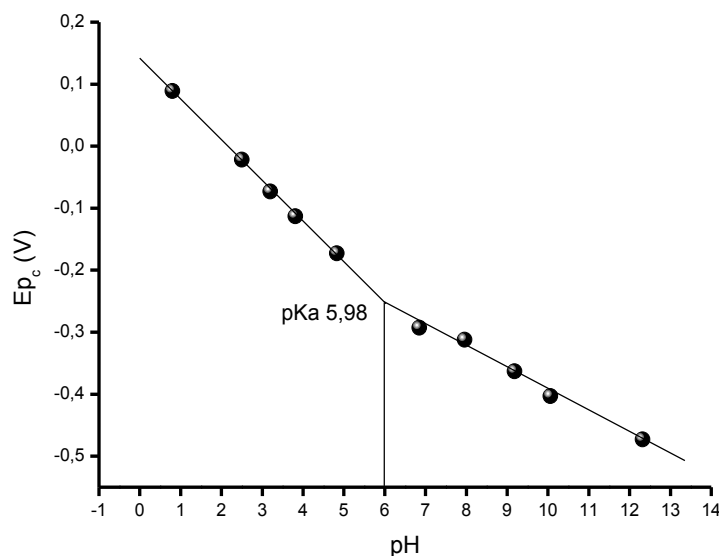


Fonte: Autor, 2011.

Nesta análise, os potenciais de pico de redução deslocaram-se em direção a valores mais negativos, com o aumento do pH da solução. Isto se deve à diminuição da disponibilidade de prótons existentes na solução, uma vez que, o meio mais ácido leva à protonação da quinona, que passa a se reduzir mais facilmente, já, em meio muito alcalino, a redução é dificultada devido à baixa disponibilidade de prótons na solução.

É sabido que quinonas dão origem a derivados hidroquinônicos correspondentes quando reduzidas em meio aquoso (De Abreu *et al.*, 2007; Salimi, 1999; Salimi, 1999), em redução de $2e^-$ e $2H^+$, em valores de pH próximos ao neutro. Porém, em valores de pH mais alcalinos, geram o ânion hidroquinônico, em processo de redução de $2e^-$ e $1H^+$ (Manisankar, 2005).

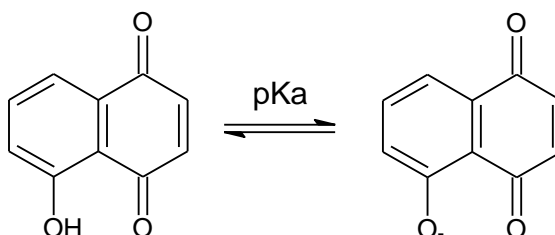
Figura 88. Gráfico de E_p vs. pH para os potenciais de pico obtidos para a redução da juglona em voltametria de pulso diferencial. Meio: tampão fosfato etanólico (20%, v/v).



Fonte: Autor, 2011.

Porém, para a juglona, a análise da interseção das retas formadas no gráfico do E_{p_c} vs. pH (**Figura 88**), mostrou um pH de 5,98, sendo este o valor do pKa da quinona. Este pKa, pode ser atribuído a desprotonação do grupo fenólico da quinona em questão (**Figura 89**), sendo comparável aos dados de pKa obtidos para o lapachol (pKa 5,98) e isolapachol (pKa 5,75) realizados pelo grupo de pesquisa do laboratório de eletroquímica, UFAL (Ossowski *et al.*, 2008; Kim, 2001). Desta forma, o valor de pKa obtido para a juglona por meio puramente eletroquímico estaria próximo aos valores encontrados para outras quinonas já estudadas, corroborando o método utilizado neste trabalho.

Figura 89. Representação esquemática para o equilíbrio ácido-base do grupo fenolato da juglona.



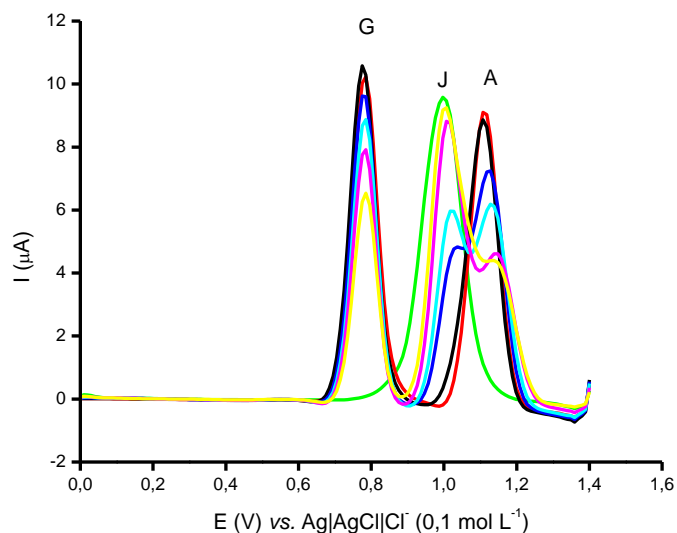
Fonte: Autor, 2011.

5.3.3. Análises com DNA

5.3.3.1. Análise da Interação da Juglona com ssDNA

O estudo da interação entre a juglona e o ssDNA foi realizado em VPD (com eletrodo de carbono vítreo) em meio tamponado misto [tampão acetato etanólico (20%, v/v), pH 4,5]. Os voltamogramas referentes à oxidação do ssDNA, apresentam dois picos referentes à oxidação das bases ligadas ao DNA, guanina (G) e adenina (A), como já foi descrito anteriormente. À medida que era adicionada juglona à solução de ssDNA, uma mudança no voltamograma da biomolécula foi observada, acompanhada pelo aparecimento do pico de oxidação da juglona em concentrações superiores a $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em regiões próximas à oxidação da adenina (**Figura 90**).

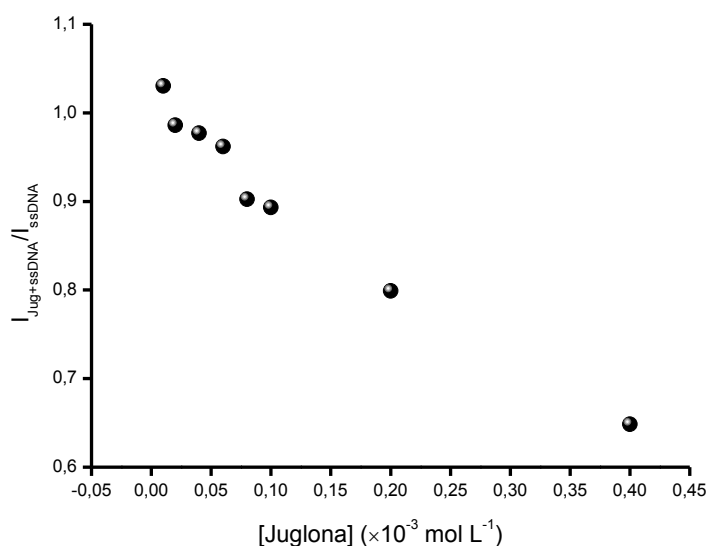
Figura 90. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para o ssDNA (♦) [tampão acetato etanólico (20%, v/v), pH 4,5] em presença de 10 (♦), 60 (♦), 100 (♦), 200 (♦) e 400 (♦) $\times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de juglona (J). Para comparação, juglona em ausência de ssDNA foi conduzido na concentração de $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (♦) em solução tampão. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹), contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,01 Vs⁻¹.



Fonte: Autor, 2011.

Concomitantemente ao aumento da concentração da juglona em solução, foi observada uma diminuição na intensidade da corrente de pico da guanina com diminuição máxima de 40% (**Figura 91**), sendo, portanto, um forte indício de interação entre as espécies analisadas, tendo em vista a diminuição na disponibilidade de bases no DNA passíveis de serem oxidadas.

Figura 91. Dependência da corrente de pico anódica (I_p) da base guanina (do ssDNA) em relação à concentração da juglona, em VPD. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹), contra-eletródo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,01 V s⁻¹.

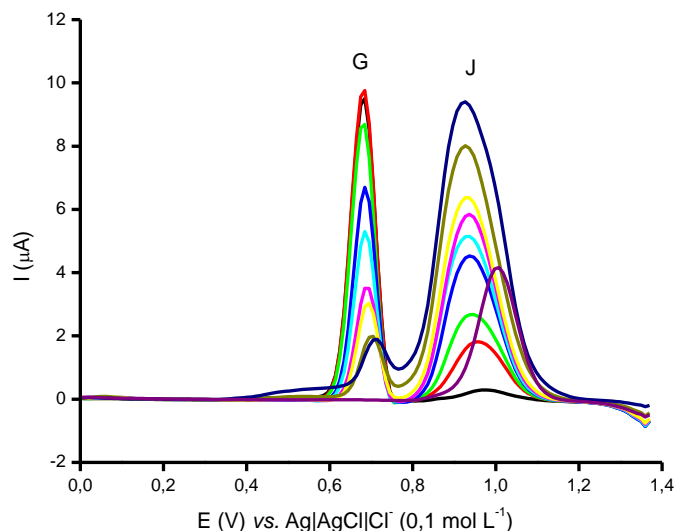


Fonte: Autor, 2011.

5.3.3.2. Análise da Interação da Juglona com as Bases Guanina e Adenina

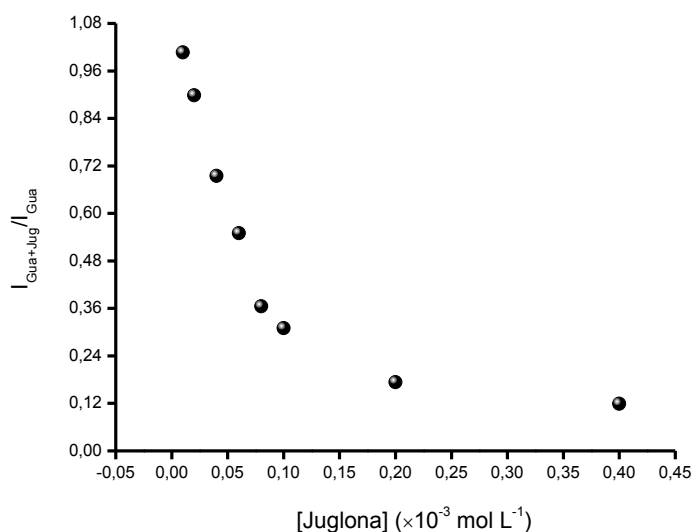
No intuito de confirmar se a interação observada no tópico anterior seria de fato entre as bases e a quinona, foi estudada em VPD [tampão acetato etanólico (20%, v/v), pH 4,5], cada base individualmente em presença de juglona. Um comportamento similar ao descrito no experimento anterior foi constatado nas análises, tanto com a guanina (**Figura 92**) quanto com a adenina (**Figura 93**).

Figura 92. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ da guanina (\blacklozenge) [tampão acetato etanólico (20%, v/v), pH 4,5] em presença de 10 (\blacklozenge), 20 (\blacklozenge), 40 (\blacklozenge), 60 (\blacklozenge), 80 (\blacklozenge), 100 (\blacklozenge), 200 (\blacklozenge) e 400 (\blacklozenge) $\times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de juglona. Para comparação, juglona em ausência de guanina foi analisada na concentração de $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (\blacklozenge). Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl^- ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: $0,01 \text{ V s}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2011.

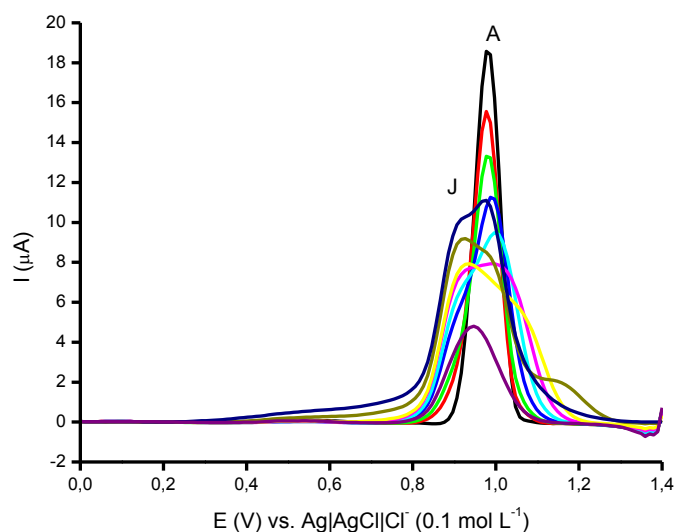
Figura 93. Dependência da corrente de pico anódica (I_p) da base guanina em relação à concentração da juglona, em VPD. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl^- ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: $0,01 \text{ V s}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2011.

Quando foram adicionadas à solução das bases, alíquotas de juglona, a corrente de oxidação da guanina diminuiu de forma mais intensa do que quando ligada ao ssDNA (máximo em torno de 88%, **Figura 93**, quando c_{juglona} era de $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) enquanto que a adenina se comportou de forma semelhante ao observado no experimento com ssDNA, devido à contribuição da corrente de oxidação da juglona que se apresenta em potencial próximo ao da base (**Figura 94**), corroborando a análise observada no experimento anterior.

Figura 94. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ da de Adenina (\blacklozenge) [tampão acetato etanólico (20%, v/v), pH 4,5] em presença de 10 (\blacklozenge), 20 (\blacklozenge), 40 (\blacklozenge), 60 (\blacklozenge), 80 (\blacklozenge), 100 (\blacklozenge), 200 (\blacklozenge) e 400 (\blacklozenge) $\times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de juglona. Para comparação, juglona em ausência de adenina foi analisada na concentração de $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (\blacklozenge). Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹), contra-eletródo: fio de platina, velocidade de varredura: $0,01 \text{ V s}^{-1}$.



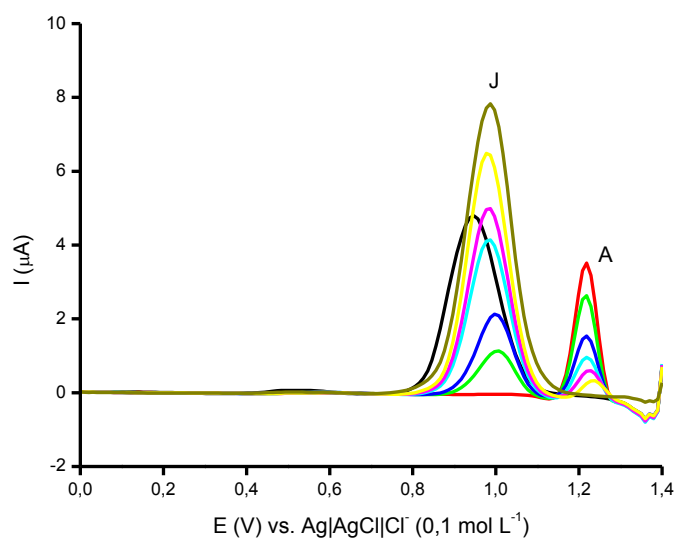
Fonte: Autor, 2011.

5.3.3.3. Análise da Interação da Juglona com os Ácidos Poliguanílico (poliG) e Poliadenílico (poliA)

Do mesmo modo como foram realizados os estudos com as bases individualmente, os estudos utilizando os ácidos poliG e poliA foram conduzidos em voltametria de pulso diferencial [em tampão acetato etanólico (20%, v/v), pH 4,5],

objetivando a análise da influência do substituinte açúcar-fosfato do nucleotídeo em relação à oxidação da base, em presença de juglona (**Figura 95**).

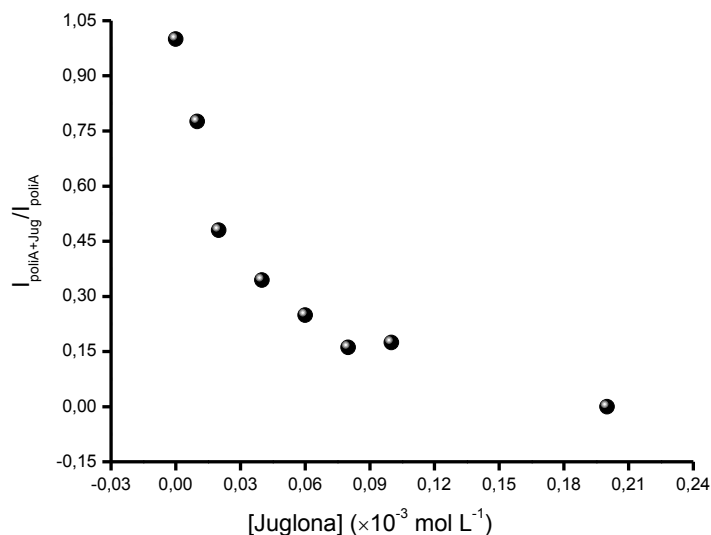
Figura 95. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para o poliA (♦) [tampão acetato etanólico (20%, v/v), pH 4,5] em presença de 10 (♦), 20 (♦), 40 (♦), 60 (♦), 100 (♦) e 200 (♦) $\times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de juglona. Para comparação, juglona em ausência de adenina foi analisada na concentração de $4,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (♦). Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹), contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,01 V s⁻¹.



Fonte: Autor, 2011.

Como observado, há uma forte diminuição na corrente de oxidação da base adenina presente no poliA (aproximadamente 99%) (**Figura 96**), conforme há o aumento na concentração de juglona no meio eletrolítico, sendo portanto, indícios claros de que mesmo com a presença do substituinte açúcar-fosfato ligado à base, a interação ocorre entre as duas espécies.

Figura 96. Dependência da corrente de pico anódica (I_p) da base adenina, do poliA, em relação a concentração da juglona, em VPD. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹), contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,01 V s⁻¹.



Fonte: Autor, 2011.

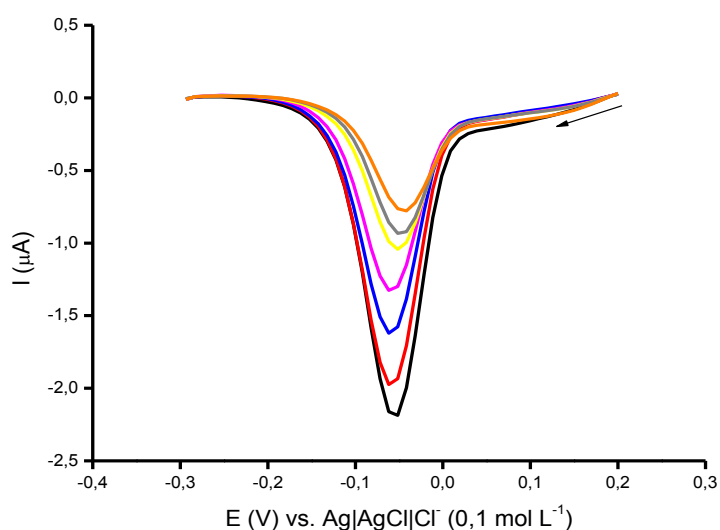
Em relação às análises com poliG, os potenciais de oxidação da juglona e da base guanina do poliG se mostraram idênticos, impossibilitando uma análise mais aprofundada, devido à contribuição da corrente de oxidação da juglona quando a concentração da mesma era aumentada. Desta forma, a interação entre a juglona e o poliG não foram levados adiante.

5.3.3.4. Análise Voltamétrica da Interação entre Juglona-DNA e Determinação da Constante de Associação, por VPD

Tendo em vista a importância de se determinar a constante de associação para a juglona e o DNA, no intuito de saber o quanto essa interação seria favorável, foi realizado o estudo da redução da quinona com variação da concentração de ssDNA em solução, em voltametria de pulso diferencial (tampão acetato etanólico, 20%, v/v, pH 4,5) da mesma forma que os conduzidos para a oncolixona e biflorina.

A análise da redução de $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de juglona em ausência de ssDNA, apresentou um pico de redução em $E_{pc} = -0,05$ V com $I_{pc} = 2,091$ μ A (vs. Ag|AgCl|Cl⁻ 0,1 mol L⁻¹). À medida que as adições de ssDNA (0,003 a 0,085 g L⁻¹) eram feitas à solução de juglona, diminuição na corrente de redução (máximo de ~ 66%) e deslocamento no potencial de pico da quinona para o lado positivo (cerca de 10 mV), foram observados (**Figura 97**). Essa diminuição, conforme já visto anteriormente, seria devido à formação do complexo DNA-juglona e pela diminuição na difusão das moléculas livres (juglona) na solução resultante.

Figura 97. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de juglona (♦) [tampão acetato etanólico (20%, v/v), pH 4,5] em presença de 0,003 (♦), 0,011 (◆), 0,027 (◆), 0,05 (◆), 0,07 (◆) e 0,085 (◆) g L⁻¹ de ssDNA. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹), contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,01 V s⁻¹.

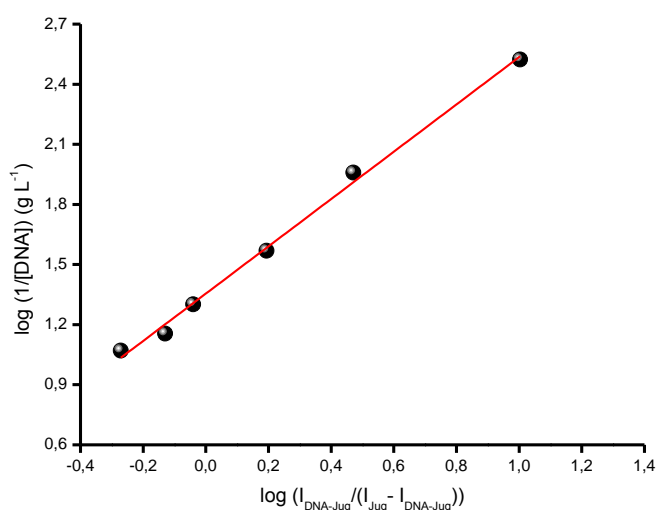


Fonte: Autor, 2011.

Sobre o deslocamento positivo do potencial de redução da juglona conforme o aumento da concentração de ssDNA em solução, seria devido as moléculas da quinona interagirem de uma maneira não covalente com as bases do DNA (Carter *et al.*, 1989; Tian *et al.*, 2008). Por outro lado, o decaimento da corrente de pico da juglona devido ao aumento da concentração de DNA em solução foi utilizado para a obtenção da constante de associação do complexo, conforme equação descrita

anteriormente (**Equação 8**). Desta forma, uma constante de associação calculada de $22,631 (\pm 0,01) \text{ g L}^{-1}$, foi obtida, analisando o coeficiente linear do gráfico abaixo (**Figura 98**).

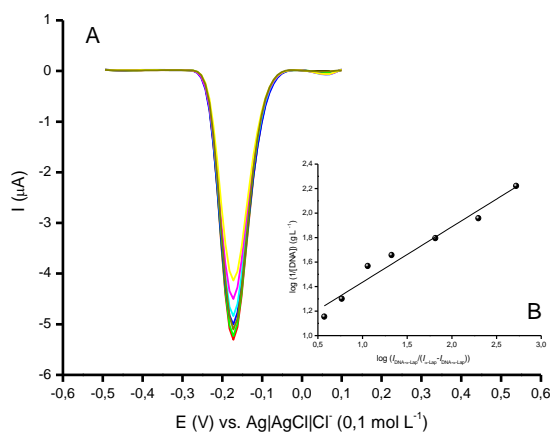
Figura 98. Gráfico do $\log (I_{\text{DNA-Jug}}/I_{\text{Jug}} - I_{\text{DNA-Jug}})$ vs. $\log (1/[\text{DNA}])$ usado para calcular a constante de associação do complexo DNA-Juglona. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, coef. linear: 1,3547, coef. angular: 1,1805, r : 0,9948.



Fonte: Autor, 2011.

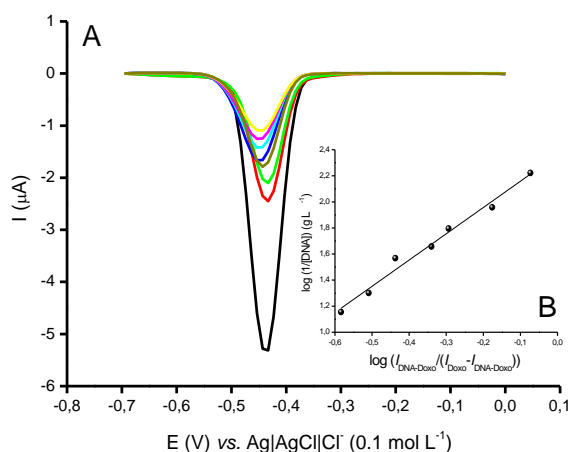
No intuito de se obter respostas de um controle (“probe”) negativo e um positivo em relação à obtenção das constantes de associação das quinonas com ssDNA, foram realizados um experimentos com α -lapachona (negativo) e doxorubicina (positivo) nas mesmas condições experimentais descritas para a oncolixona, biflorina e juglona. Os resultados obtidos para o controle negativo mostraram que apesar de ocorrer um decaimento na corrente de redução α -lapachona, nenhuma mudança no potencial de redução da quinona foi observada (**Figura 99**). Porém, para o controle positivo, um forte decaimento na corrente de pico foi observado seguido de uma variação no potencial de redução da doxorubicina (**Figura 100**). Desta forma, a constante de associação observada para a α -lapachona de $9,637 (\pm 0,06) \text{ g L}^{-1}$, corrobora a baixa inatividade da mesma em relação ao DNA. Em contrapartida a constante observada para a doxorubicina, $229,139 (\pm 0,04) \text{ g L}^{-1}$, demonstra a alta reatividade da mesma frente ao DNA.

Figura 99. A) Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de α -Lapachona (\blacklozenge) [tampão acetato etanólico (20%, v/v), pH 4,5] em presença de 0,006 (\blacklozenge), 0,011 (\blacklozenge), 0,016 (\blacklozenge), 0,022 (\blacklozenge), 0,027, (\blacklozenge) 0,050 (\blacklozenge) e 0,070 (\blacklozenge) g L⁻¹ de ssDNA. B) Gráfico do $\log(I_{\text{DNA-}\alpha\text{-Lap}}/I_{\alpha\text{-Lap}} - I_{\text{DNA-}\alpha\text{-Lap}})$ vs. $\log(1/[\text{DNA}])$ usado para calcular a constante de associação do complexo DNA- α -Lapachona. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹), contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,01 V s⁻¹, coef. linear: 0,98394, coef. angular: 0,45219, r : 0,95628.



Fonte: Autor, 2011.

Figura 100. A) Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de Doxorubicina (\blacklozenge) [tampão acetato etanólico (20%, v/v), pH 4,5] em presença de 0,006 (\blacklozenge), 0,011 (\blacklozenge), 0,016 (\blacklozenge), 0,022 (\blacklozenge), 0,027, (\blacklozenge) 0,050 (\blacklozenge) e 0,070 (\blacklozenge) g L⁻¹ de ssDNA. B) Gráfico do $\log(I_{\text{DNA-Doxo}}/I_{\text{Doxo}} - I_{\text{DNA-Doxo}})$ vs. $\log(1/[\text{DNA}])$ usado para calcular a constante de associação do complexo DNA-Doxorubicina. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹), contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: 0,01 V s⁻¹, coef. linear: 2,3601, coef. angular: 2,0155, r : 0,9803.



Fonte: Autor, 2011.

Considerando os valores das constantes obtidos para a juglona, biflorina e oncocalixona, bem como o valor obtido para a α -lapachona e o encontrado na literatura (**Tabela 12**), esses resultados são relevantes no intuito de sua utilização como referência em futuras análises, tendo em vista a necessidade de confecção de novos fármacos baseados em interações específicas com moléculas biológicas. Desta forma, a facilidade de formação do aduto quinona-DNA e sua quantificação seria um dado relevante na busca por novos fármacos baseados em interação com DNA.

Tabela 12. Constantes de associação com DNA para algumas substâncias analisadas.

Composto	K	Solução de DNA	Meio analisado
Oncocalixona	63,314	ssDNA	Tampão acetato etanólico, pH 4,5
Biflorina	37,342	ssDNA	Tampão acetato etanólico, pH 4,5
Juglona	22,631	ssDNA	Tampão acetato etanólico, pH 4,5
α -Lapachona	9,637	ssDNA	Tampão acetato etanólico, pH 4,5
Doxorrubicina	229,139	ssDNA	Tampão acetato etanólico, pH 4,5

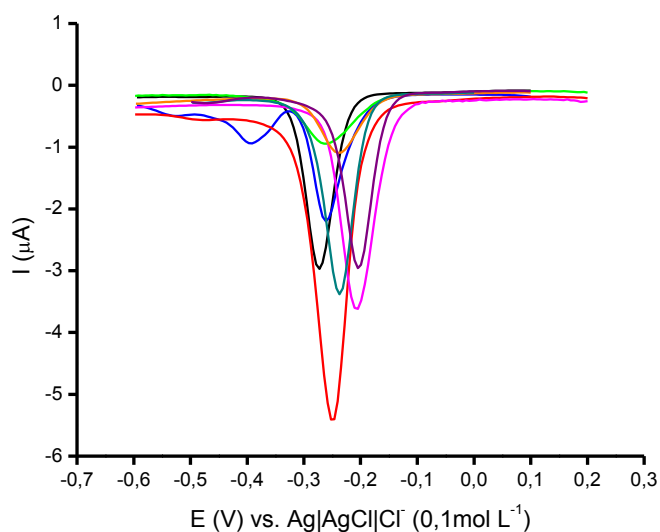
5.3.4. Estudos de Correlação da Atividade Moluscicida e Larvicida em Relação à Estrutura e o Potencial de Redução de Algumas Quinonas

O parâmetro de interesse direto visando à análise de uma possível correlação entre parâmetros eletroquímicos e a atividade biológica das quinonas é o E_{pc} [potencial de pico catódico (redução) de primeira onda]. Baseado na literatura, os potenciais de redução ou de oxidação de algumas substâncias fornecem informações sobre a viabilidade de ocorrência dos processos de transferência de elétrons (TE) *in vivo* ou *in vitro*. Correlações realizadas e divulgadas (Goulart *et al.*, 1997) entre E_{pc} (potencial de redução catódico), $E_{1/2}$ (potencial de meia-onda) ou E_{redox} (potencial redox) e atividades biológicas (De Abreu *et al.*, 2002) demonstram a relevância de estudos eletroquímicos como ferramentas úteis numa possível

elucidação do mecanismo de ação de fármacos e no planejamento de compostos biologicamente ativos.

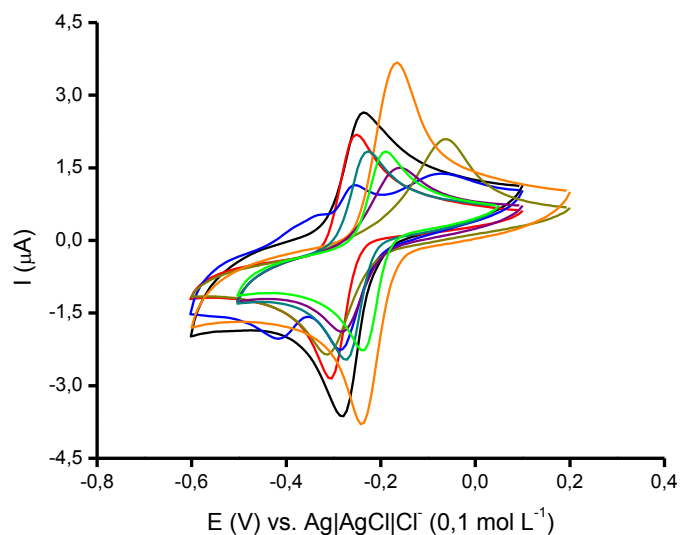
Visando correlacionar os E_{pc} das quinonas (Q1, Q2, Q3, Q4, Q5, Q6, Q7 e Q9, **Tabela 8**, pg. 89) com os dados obtidos em testes moluscidas e larvicidas, foram realizadas análises eletroquímicas em VPD ($0,005 \text{ V s}^{-1}$) (**Figura 101**) e VC ($0,1 \text{ V s}^{-1}$) (**Figura 102**) com cada quinona, na concentração de $4,76 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, em tampão fosfato etanólico (40%, v/v), pH 7,0.

Figura 101. Voltamogramas de pulso diferencial para a redução das quinonas Q1 (◆), Q2 (◆), Q3 (◆), Q4 (◆), Q5 (◆), Q6 (◆), Q7 (◆) e Q9 (◆), na concentração de $4,76 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ [tampão fosfato etanólico (40%, v/v), pH 7,0]. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{Cl}^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), contra-eletrodo: fio de platina, velocidade de varredura: $0,005 \text{ V s}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2011.

Figura 102. Voltamogramas cíclicos para a redução das quinonas Q1 (♦), Q2 (♦), Q3 (♦), Q4 (♦), Q5 (♦), Q6 (♦), Q7 (♦) e Q9 (♦), na concentração de $4,76 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ [tampão fosfato etanólico (40%, v/v), pH 7,0]. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹) e contra-eleto: fio de platina, velocidade de varredura: 0,1 V s⁻¹.



Fonte: Autor, 2011.

Como observado nos voltamogramas obtidos, os mesmos apresentam características típicas de quinonas (com excessão da Q2), possuindo um único par de ondas catódica e anódica. Analisando os E_{pc} , as quinonas mais fáceis de reduzir estão na seguinte ordem Q6>Q7>Q9>Q4>Q3>Q5>Q2>Q1, sendo os potenciais de pico catódico E_{plc} (V) mostrados na **Tabela 13**, juntamente com os dados obtidos com os estudos das atividades moluscicida e larvicida, representados por valores de CL_{50} e CL_{90} .

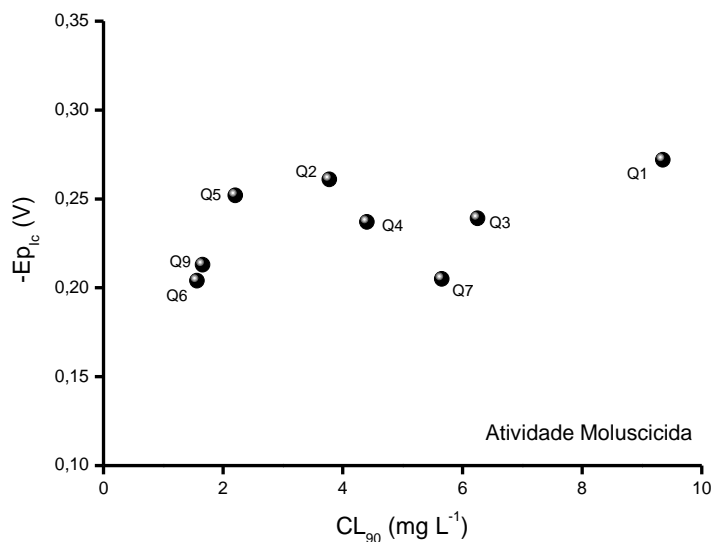
Tabela 13. Atividades larvicidas (contra *A. aegypti*) e moluscicidas (contra *B. glabrata*) das quinonas.

COMPOSTOS	Larvicida (mg L ⁻¹)	Moluscicida (mg L ⁻¹)	Eplc (V) – Elet. Cv
5-Hidroxi-1,4-naftoquinona (juglona) (Q1)	CL ₅₀ 3,587 [3,035 – 4,065] CL ₉₀ 6,641 [5,882 – 7,774]	CL ₅₀ 1,474 [1,304–1,654] CL ₉₀ 9,352 [7,664–11,941]	-0,272
5-Acetoxi-1,4- naftoquinona (Q2)	CL ₅₀ 4,553 [2,405 – 5,844] CL ₉₀ 7,993 [6,178–20,475]	CL ₅₀ 1,213 [1,098–1,331] CL ₉₀ 3,774 [3,391–4,251]	-0,261
5-Metoxi-1,4-naftoquinona (Q3)	CL ₅₀ 7,919 [7,415 – 8,419] CL ₉₀ 10,833 [10,081–11,90]	CL ₅₀ 2,458 [2,324–2,598] CL ₉₀ 6,252 [5,720–6,926]	-0,239
2-Bromo-5-hidroxi-1,4- naftoquinona (Q4)	CL ₅₀ 1,391 [1,220 – 1,690] CL ₉₀ 2,501 [1,982 – 3,718]	CL ₅₀ 1,181 [1,092–1,275] CL ₉₀ 4,404 [3,947–4,974]	-0,237
2-Bromo-5-acetoxi-1,4- naftoquinona (Q5)	CL ₅₀ 1,170 [0,891 – 1,451] CL ₉₀ 4,550 [3,636 – 6,078]	CL ₅₀ 0,948 [0,882–1,014] CL ₉₀ 2,205 [2,018–2,443]	-0,252
2-Bromo-5-metoxi-1,4- naftoquinona (Q6)	CL ₅₀ 9,703 [8,827 – 10,749] CL ₉₀ 16,99 [14,739 –20,844]	CL ₅₀ 0,746 [0,703–0,787] CL ₉₀ 1,563 [1,457–1,694]	-0,204
3-Bromo-5-hidroxi-1,4- naftoquinona (Q7)	CL ₅₀ 0,873 [0,807 – 0,955] CL ₉₀ 1,417 [1,242 – 1,739]	CL ₅₀ 2,494 [2,365–2,628] CL ₉₀ 5,6543 [5,212–6,211]	-0,205
3-Bromo-5-metoxi-1,4- naftoquinona (Q9)	CL ₅₀ 5,752 [3,977 – 7,664] CL ₉₀ 12,453 [9,068 – 25,069]	CL ₅₀ 0,893 [0,850–0,937] CL ₉₀ 1,659 [1,559–1,779]	-0,213
Niclosamida	CL ₅₀ >100*	CL ₅₀ 0,15**	-

*Laurens *et al.*, 1997; ** Oliveira e Paumgarten, 2000.

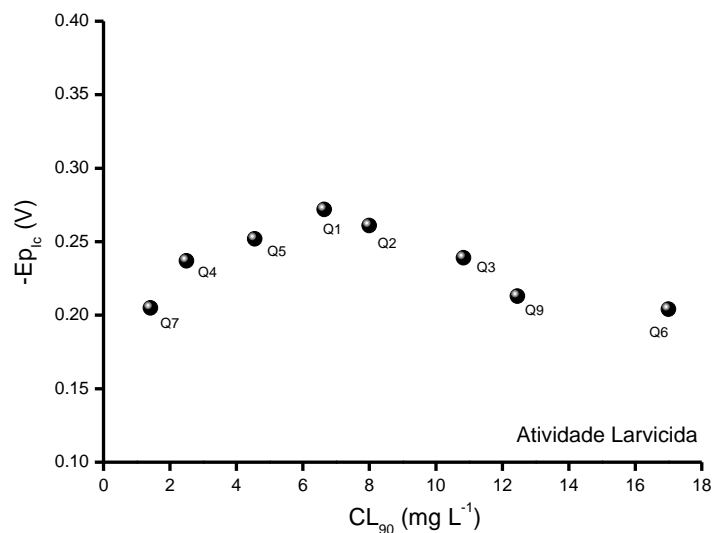
Relacionando os valores dos potenciais de redução obtidos, em VPD, com os valores de CL₉₀ de cada quinona listados na **Tabela 13**, é possível fazer uma correlação entre a atividade biológica (moluscicida e larvicida) com os Eplc de cada substância (**Figuras 103 e 104**).

Figura 103. Relação entre potenciais de pico catódico ($E_{p_{lc}}$) e concentração letal (CL_{90}) em relação à atividade moluscicida obtida para cada quinona.



Fonte: Autor, 2011.

Figura 104. Relação entre potenciais de pico catódicos ($E_{p_{lc}}$) e concentração letal (CL_{90}) em relação a atividade larvicida obtida para cada quinona.



Fonte: Autor, 2011.

Como observado nas **Figuras 103 e 104**, não houve correlação direta entre a atividade biológica e o potencial de redução da quinona, uma vez que o esperado

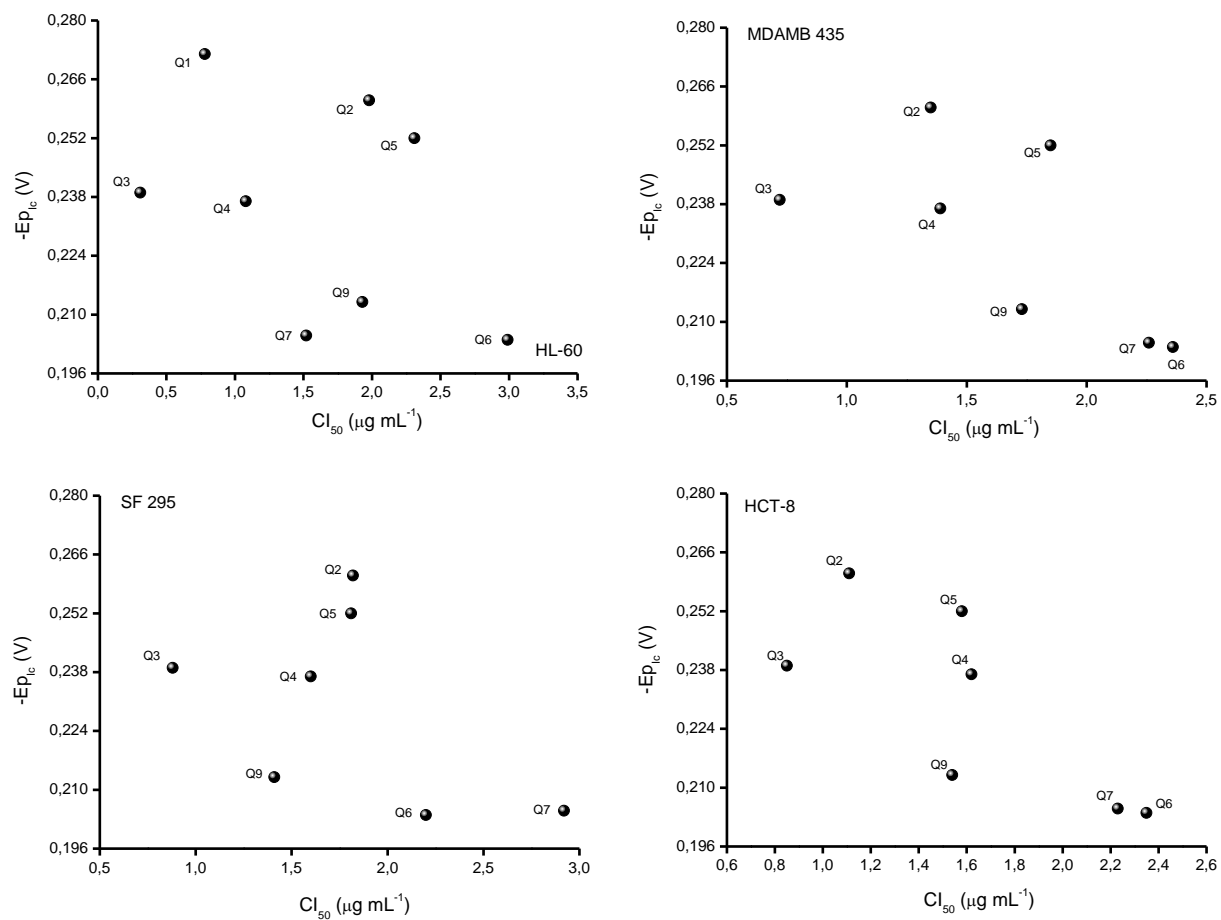
seria que quanto mais fácil de reduzir, mais ativa seria a substância. A mesma correlação mostrada anteriormente foi realizada em relação à atividade citotóxica dos derivados juglônicos (**Tabela 14, Figura 105**), porém qualquer relação direta não foi observada entre a atividade e o potencial de redução dessas quinonas.

Tabela 14. Atividades citotóxicas da juglona e seus derivados (Montenegro *et al.* 2010) e a correlação com os potenciais de redução dessas quinonas. CI: concentração inibitória, CE: concentração efetiva, Nd: não determinado.

	MTT CI_{50} $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)					Eplc (V) – Eletrodo Cv
	HL-60	MDAMB 435	SF-295	HCT-8	PBMC	
Q1	0,78 (4,5) (0,48-1,25)	Nd	Nd	Nd	Nd	-0,272
Q2	1,98 (9,2) 1,69 – 2,33	1,35 (6,2) 1,03 – 1,77	1,82 (8,4) 1,6 – 2,07	1,11 (5,1) 0,77-1,6	Nd	-0,261
Q3	0,31 (1,7) 0,23 – 0,43	0,72 (3,8) 0,62 – 0,95	0,88 (4,7) 0,72 – 1,07	0,85 (4,5) 0,71-1,05	0,69 (3,7) 0,49 – 0,99	-0,239
Q4	1,08 (4,3) 0,93 – 1,23	1,39 (5,5) 1,06 – 1,82	1,6 (6,3) 1,29 – 1,99	1,62 (6,4) 1,12-2,35	Nd	-0,237
Q5	2,31 (7,8) 1,86 – 2,89	1,85 (6,3) 1,37 – 2,5	1,81 (6,1) 1,47 – 2,23	1,58 (5,3) 1,32-1,86	Nd	-0,252
Q6	2,99 (11,2) 2,4 – 3,7	2,36 (8,8) 1,84 – 3,03	2,2 (8,2) 1,02 – 4,71	2,35 (8,8) 1,59 – 3,46	Nd	-0,204
Q7	1,52 (6,0) 1,04 – 2,25	2,26 (8,9) 1,48 – 3,42	2,92 (11,5) 2,31 – 3,69	2,23 (8,8) 1,78 – 2,79	Nd	-0,205
Q9	1,93 (7,2) 1,54 – 2,42	1,73 (6,5) 1,38 – 2,16	1,41 (5,3) 1,18 – 1,67	1,54 (5,8) 1,08 – 2,19	Nd	-0,213
Dox	0,02 (0,03) 0,01 – 0,02	0,48 (0,8) 0,34 – 0,66	0,23 (0,4) 0,19 – 0,25	0,01 (0,02) 0,01 – 0,02	0,97 (1,7) 0,52 – 1,80	-

Linhagens celulares: HL-60 (Leucemia promielocítica humana), SF-295 (Glioblastoma humano), HCT-8 (Carcinoma de cólon humano), PBMC (células mononucleares sanguíneas periféricas).

Figura 105. Relação da atividade citotóxica da juglona e derivados em diferentes linhagens de células (concentração inibitória, CI_{50}) e sua correlação com os potenciais de pico catódicos (E_{plc}) das quinonas em questão.



Fonte: Autor, 2011.

Apesar dessas substâncias não seguirem uma correlação direta entre a atividade e os potenciais de pico catódico (E_{plc} , em meio prótico), todas elas estão dentro da faixa ótima de facilidade de redução requerida para uma atividade biológica relevante (meio aprótico: -0,7 V; meio prótico: -0,5 V), conforme dados disponíveis na literatura (Goulart *et al.*, 1997).

6. CONCLUSÕES

A obtenção dos parâmetros eletroquímicos da oncocalixona e biflorina, nos meios prótico e aprótico, permitiu concluir que tais substâncias, têm comportamento eletroquímico típico de quinonas. Para a oncocalixona foi desenvolvido um sensor eletroquímico baseado em uma bicamada de FeTSPc/FeT₄MPyP em carbono vítreo, onde a resposta eletroquímica para este sensor foi da ordem de nanomolar. Para a juglona, foi determinado o pKa através de método puramente eletroquímico e comparável ao valores de pKa disponíveis na literatura para quinonas com grupos enólicos presentes.

As análises de interações entre as quinonas (oncocalixona, biflorina e juglona) e ssDNA mostraram-se positivas, e que a presença do substituinte açúcar-fosfato não interfere nessas interações. No intuito de se verificar a ordem de interação dessas quinonas com ssDNA, a constante de associação foi determinada, sendo oncocalixona > biflorina > juglona > α -Lapachona, com esta última sendo considerada um controle negativo. Este método foi de grande importância, pois possibilitou quantificar a interação das quinonas estudadas em relação ao DNA, sendo importante em análises futuras.

Os estudos de ESR (ressonância de spin do elétron) permitiram caracterizar o mecanismo eletroquímico de redução da oncocalixona, indicando a existência de um intermediário (ânion-radical), que pode ser responsável pelas atividades biológicas do composto, após reduções biológicas.

Foi verificado também, que os potenciais de redução catódicos (E_{pc}) da juglona e derivados não estão diretamente relacionados às atividades biológicas observadas, sendo todas elas ativas. Entretanto, todas as quinonas estudadas sofrem redução na faixa ótima de potencial de redução, capaz de transferir elétrons para o oxigênio, desencadeando atividades biológicas, baseadas em desbalanço redox.

7. PERSPECTIVAS

- Determinação da capacidade antioxidante com sensores de DNA.
- Determinação da estequiometria para adutos formados entre quinonas e DNA em análises utilizando dsDNA em solução.
- Análises com biochips de DNA no intuito de se determinar mudanças em sequências específicas de nucleotídeos.
- Uso de microscopia de força atômica no intuito de se comparar os dados sobre a interação das quinonas estudadas no presente trabalho e os possíveis dados obtidos com AFM.

Muitas dessas análises poderão ser realizadas futuramente no laboratório de eletroquímica da UFAL, bem como em colaboração com outros institutos, tendo em vista que muito dos instrumentos requeridos ainda não são acessíveis.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu, F.C.; Moura, M.A.F.B.; Ferreira, D.C.M.; Cavalcanti, J.C.M.; Goulart, M.O.F.; *Química Medicinal*, 1ª Ed, Ed. Edusp: São Paulo, **2009**.

Aguilar-Martinez, M.; Macías-Ruvalcaba, N. A.; Bautista-Martínez, J. A.; Gómez, M.; González, F. J.; González, I.; *Curr. Org. Chem.*, **2004**, 8, 1721.

Aithal, B.K.; Kumar, M.R.S.; Rao, B.N.; Udupa, N.; Rao, B.S.S.; *Cell Biol. Internat.*, **2009**, 33, 1039.

Aleixo, L.M.; Sousa, M.F.B.; Godinho, O.E.S.; Oliveira-Neto, G.; Gushikem, Y.; Moreira, J. C.; *Anal. Chim. Acta*, **1993**, 271, 143.

Almeida, V. L.; Leitão, A.; Reina, L.C.B.; Montanari, C.A.; Donnici, C.L.; *Química Nova*, **2005**, 28 (1), 118.

Analytical Methods Committee, *Analyst*, **1987**, 112, 199.

Andrade-Neto, V.F.; Goulart, M.O.F.; Filho, J.F.S.; Silva, M.J.; Pinto, M.C.F.R.; Pinto, A.V.; Zalis, M.G.; Carvalho, L.H.; Krettli, A.U.; *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, **2004**, 14(5), 1145.

Angnes, L.; Azevedo, C.M.N.; Araki, K.; Toma, H.E.; *Anal. Chim. Acta*, **1996**, 329, 91.

Arora, K.; Prabhakar, N.; Chand, S.; Malhotra, B.D.; *Biosens. Bioelectronics*, **2007**, 23, 613.

Atkins, P.; Jones, L.; *Princípios de Química*, 3ª ed., Bookman: Porto Alegre, **2006**.

Asche, C.; *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2005**, 5, 449.

Avdeef, A.; Box, K.J.; Comer, J.E.A.; Gilges, M.; Hadley, M.; Hibbert, C.; Patterson, W.; Tam, K.Y.; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1999**, *20*, 631.

Azevedo, C.M.N.; Araki, K.; Angnes, L.; Toma, H.E.; *Electroanalysis*, **1998**, *10*, 467.

Azevedo, C.M.N.; Araki, K.; Toma, H.E.; Angnes, L.; *Anal. Chim. Acta*, **1999**, *387*, 175.

Babula, P.; Adam, V.; Havel, L.; Kizek, R.; *Current Pharmaceutical Analysis*, **2009**, *5*, 47.

Bachur, N.R.; Gordon, S.L.; Gee, M.V.; Kon, H.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1979**, *76* (2), 954.

Bard, A.J.; Faulkner, L.R.; *Electrochemical Methods: Fundamentals and applications*, 2nd edition, John Wiley & Sons: New York, **2001**.

Biesaga, M.; Pyrzynska, K.; Trojanowicz, M.; *Talanta*, **2000**, *51*, 209.

Blonder, R.; BenDov, I.; Dagana, A.; Willner, I.; Zisman, E.; *Biosens. Bioelectron.*, **1997**, *12*, 627.

Bolt, A.W.; *Current Separations*, **1997**, *16* (1), 23.

Bolton, J. L.; Trush, M.; Penning, T.; Dryhurst, G.; Monks, T. J.; *Chem. Res. Toxicol.*, **2000**, *13*, 135.

Boussicault, F.; Robert, M.; *Chem. Rev.*, **2008**, *108*, 2622.

Brady, J.E.; *General Chemistry*, 5th edition, John Wiley & Sons: New York, **1990**.

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

Brett, A.M.O.; Serrano, S.H.P.; Gutz, I.G.R.; La-Scalea, M.A; *Electroanal.* **1997**, 110.

Brett, A.M.O.; Macedo, T.R.A.; Raimundo, D.; Marques, M.H.; Serrano, S.H.P.; *Biosens. Bioelectron*, **1998**, 13, 861.

Brett, A.M.O.; Diculescu, V.; *Bioelectrochemistry*, **2004**, 64, 143.

Cardellina, J.H.; *J. Nat. Prod.*, **2002**, 65, 1073.

Carey, F.A.; Sundberg, R.J.; *Advanced Organic Chemistry Part A: Structure and Mechanisms*, 4th Edition, Springer: New York, **2007**.

Carter, M.T.; Rodriguez, M.; Bard, A.J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 8901.

Cash, K.J.; Heeger, A.J.; Plaxco, K.W.; Xiao, Y.; *Anal. Chem.*, **2009**, 81, 656.

Chambers, J.Q.; *The Chemistry of Quinonoid Compounds*, John Wiley & Sons: New York, **1974**, 737.

Chen, J.; Huang, Y.W.; Liu, G.; Afrasiabi, Z.; Sinn, E.; Padhye, M.Y.; *Toxicology and Applied Pharmacology*, **2004**, 197, 40.

Christian, G.D.; *Analytical Chemistry*, 6th edition, John Wiley & Sons: New York, **2004**.

Collins, M.D.; *Chemical methods in prokaryotic systematic*, John Wiley & Sons: New York, **1994**.

Costa-Lotufo, L.V.; Ferreira, M.A.D.; Lemos, T.L.G.; Pessoa, O.D.L.; Viana, G.S.B.; Cunha, G.M.A.; *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **2002**, 35, 927.

Crawford, P.W.; Carlos, E.; Ellegood, J.C.; Cheng, C.C.; Dong, Q.; Liu, D.F.; Luo, Y.L.; *Electrochim. Acta*, **1996**, 41 (15), 2399.

De Abreu, F.C.; Ferraz, P.A.L.; Goulart, M.O.F.; *J. Braz. Chem. Soc.*, **2002**, 13, 19.

De Abreu, F.C.; Ferreira, D.C.M.; Goulart, M.O.F.; Buriez, O.; Amatore, C.; *J. Electroanal. Chem.*, **2007**, 608, 125.

De Abreu, F.C.; De Paula, F.S.; Ferreira, D.C.M.; Nascimento, V.B.; Santos, A.M.C.; Santoro, M.M.; Salas, C.E.; Lopes, J.C.D.; Goulart, M.O.F.; *Sensors*, **2008**, 8, 1519.

De Moura, M.A.B.F.; *Tese*, Universidade Federal de Alagoas, Brasil, **2008**.

De Paula, F.S.; *Tese*, Universidade Federal de Alagoas, **2006**.

Deng, Q.; Dong, S.J.; *Analyst*, **1996**, 121, 1123.

Diculescu, V.C.; Paquim, A.M.C.; Brett, A.M.O.; *Sensors*, **2005**, 5, 377.

Feng, Q.; Li, N. Q.; Jiang, Y.Y.; *Anal. Chim. Acta*, **1997**, 344, 97.

Ferreira, M.A.D.; Nunes, O.D.R.H.; Leal, L.K.A.M.; Pessoa, O.D.L.; Lemos, T.L.G.; Viana, G.S.B.; *Biol. Pharm. Bull.*, **2003**, 26, 595.

Ferreira, M.A.D.; Nunes, O.D.R.H.; Fontenele, J.B.; Pessoa, O.D.L.; Lemos, T.G.L.; Viana, G.S.B.; *Phytomedicine*, **2004**, 11, 315.

Filanovsky, B.; *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 394, 91.

Fonseca, A.M.; Pessoa, O.L.D.; Silveira, E.R.; Lemos, T.L.G.; Monte, F.J.Q.; Braz-Filho, R.; *Magnetic Resonance in Chemistry*, **2003**, 41, 1038.

Frydman, B.; Marton, L.J.; Sun, J.S.; Neder, K.; Witiak, D.T.; Liu, A.A.; Wang, H.; Mao, Y.; Wu, H.; Sanders, M.M.; Liu, L.F.; *Cancer Res.*, **1997**, 57, 620.

Gordillo, G.; SCHIRIN, D.J.; *Faraday Discuss.*, **2000**, 116, 89.

Goulart, M.O.F.; Freitas, L.R.; Tonholo, J.; Abreu, F.C.; Raslan, D.S.; Starling, S.; Zani, C.L.; Oliveira, A.B.; Chiari, E.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, 7 (15), 2043.

Greef, R.; Peat, R.; Peter, L.M.; Pletcher, D.; Robinson, J.; *Instrumental Methods in Electrochemistry*, John Wiley & Sons: New York, Ellis Horwood Limited, **1985**.

Hamburger, M.; Hostettmann, K.; *Phytochem.*, **1991**, 30, 3864.

Hillard, E.A.; De Abreu, F.C.; Ferreira, D.C.M.; Jaouen, G.; Goulart, M.O.F.; Amatore, C.; *Chem. Commun.*, **2008**, 23, 2612.

Ho, K.C.; Cheu, C.Y.; Hsu, H.C.; Cheu, L.C.; Shiesh, S.C.; Lin, X.Z.; *Biosens. Bioelectron.*, **2004**, 20, 3.

Hurley, L.H.; *Nature Reviews Cancer*, **2002**, 2(3), 188.

IPAC, Instituto Português de Acreditação, Guia para a acreditação de laboratórios químicos, **2011**.

Jacq, J.; *Electrochim. Acta*, **1967**, 12, 1345.

Jeftic, L.; Manning, G.; *J. Electroanal. Chem.*, **1970**, 26, 195.

Jelen, F.; Fojta, M.; Palecek, E.; *J. Electroanal. Chem.*, **1997**, 427, 49.

Kamel, A.H.; Moreira, F.T.C.; Matos, C.D.; Sales, M.G.F.; *Biosensors and Bioelectronics*, **2008**, 24, 591.

Kim, H.-s.; Chung, T.D.; Kim, H.; *J. Electroanal. Chem.*, **2001**, 498, 209.

Kitagawa, R.R.; Raddi, M.S.G.; Santos, L.C.; Vilegas, W.; *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **2004**, 52, 1487.

Klaus, V.; Hartmann, T.; Gambini, J.; Graf, P.; Stahl, W.; Hartwig, A.; Klotz, L.O.; *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2010**, 496, 93.

Koyama, J.; Morita, I.; Tagahara, K.; Osakai, T.; Hotta, H.; Yang, M.X.; Mukaianaka, T.; Nishino, H.; Tokuda, H.; *Chem. Pharm. Bull.*, **2001**, *49*, 1214.

Lane, R.F.; Hubbard, A.T.; *J. Phys. Chem.*, **1973**, *77*, 1401.

La-Scalea, M.A.; Serrano, S.G.P.; Ferreira, E.I.; Brett, A.M.O.; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2002**, *29*, 561.

Laurens, A.; Fourneau, C.; Hocquemiller, R.; Cavé, A.; Bories, C.; Loiseau, P.M.; *Phytotherapy Research*, **1997**, *11*, 145.

Lima, G.O.; D'albuquerque, I.L.; Magalhães, N.B.; Albuquerque, M.M.; *Rev. Instituto de Antibióticos de Recife*, **1958**, *1*, 95.

Lima, N.M.F.; Correia, C.S.; Ferraz, P.A.L.; Pinto, A.V.; Pinto, M.C.R.F.; Sant'Ana, A.E.G.; Goulart, M.O.F.; *J. Braz. Chem. Soc.*, **2002**, *13*, 822.

Lima, N.M.F.; Santos, A.F.; Porfirio, Z.; Goulart, M.O.F.; *Acta Trop.*, **2002**, *83*, 43.

Liu, G.; Wan, Y.; Gau, V.; Zhang, J.; Wang, L.; Song, S.; Fan, C.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 6820.

Livertoux, M.H.; Lagrange, P.; Minn, A.; *Brain Res.*, **1996**, *725*, 207.

Lown, J.W.; *Acc. Chem. Res.*, **1982**, *15*, 381.

Lusi, E.A.; Passamano, M.; Guarascio, P.; Scarpa, A.; Schiavo, L.; *Anal. Chem.*, **2009**, *81*, 2819.

Luz, R.C.S.; Damos, F.S.; Oliveira, A.B.; Beck, J.; Kubota, L.T.; *Talanta*, **2004**, *64*, 935.

Luz, R.C.S.; Damos, F.S.; Oliveira, A.B.; Beck, J.; Kubota, L.T.; *Electrochim. Acta*, **2005**, *50*, 2675.

Manisankar, P.; Gomathi, A.; *J. Mol. Catalysis A: Chemical*, **2005**, *232*, 45.

Marques, W.B.; Pessoa, O.D.L.; Lemos, T.L.G.; Braz-Filho, R.; *Rev. Latinoamer. Quím.*, **2000**, *28*, 111.

Mascini, M.; Tombelli, S.; Palchetti, I.; *Bioelectrochemistry*, **2005**, *67*, 131.

McKeown, N.B.; *Phthalocyanine Materials: Synthesis, Structure and Function*, Cambridge University Press: Cambridge, **1998**.

Miaw, L.H.L.; Boudreau, P.A.; Pichler, M.A.; Perone, S.P.; *Analytical Chemistry*, **1978**, *50*, 1988.

Molfetta, F.A.; Bruni, A.T.; Honorio, K.M.; Silva, A.B.F.; *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2005**, *40*, 329.

Montanari, C.A.; *Química Medicinal, Métodos e fundamentos em planejamento de fármacos*, 1ª Ed., Editora Edusp: São Paulo, **2009**.

Montenegro, R.C.; Araújo, A.J.; Molina, M.T.; Filho, J.D.B.M.; Rocha, D.D.; López-Montero, E.; Goulart, M.O.F.; Bento, E.S.; Alves, A.P.N.N.; Pessoa, C.; Moraes, M.O.; Costa-Lotufo, L.V.; *Chemico-Biological Interactions*, **2010**, *184*, 439.

Moses, P.R.; Wier, P.; Murray, R.W.; *Anal Chem.*, **1975**, *47*, 1882.

Murakami, K.; Haneda, M.; Iwata, S.; Yoshino, M.; *Toxicology in vitro*, **2010**, *24*, 905.

O'Brien, P.J.; *Chem. Biol. Interact.*, **1991**, *80*, 1.

Oliveira-Filho, E.C.; Paumgarten, F.J.R.; *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2000**, *46*, 342.

Ollinger, K.; Brunmark, A.; *J. Biol. Chem.*, **1991**, 266, 21496.

Oni, J.; Diab, N.; Reiter, S.; Schuhmann, W.; *Sens. Actuators B*, **2005**, 105, 208.

Ough, M.; Lewis, A.; Bey, E.A.; Gao, J.; Ritchie, J.M.; Bornmann, W.; Boothman, D.A.; Oberley, L.W.; Cullen, J.J.; *Cancer Biology & Therapy*, **2005**, 4, 95.

Ozkan-Ariksoysal, D.; Tezcanli, B.; Kosova, B.; Ozsoz, M.; *Anal. Chem.*, **2008**, 80, 588.

Ozoemena, K.; Westbroek, P.; Nyokong, T.; *Electrochem. Comm.*, **2001**, 3, 529.

Palecek, E.; *Electroanal.*, **1996**, 8, 7.

Palecek, E.; *Electroanalysis*, **2009**, 21(3-5), 239.

Pessoa, O.D.L.; Lemos, T.L.G.; Silveira, E.R.; Braz-Filho, R.; *Nat. Prod. Lett.* **1993**, 2, 145.

Pessoa, O.D.L.; Lemos, T.L.G.; Carvalho, M.G.; Braz-Filho, R.; *Phytochemistry*, **1995**, 6, 1777.

Pessoa, C.; Lemos, T.L.G.; Pessoa, O.D.L.; Moraes, M.O.; Vasconcellos, D.; Costa-Lotufo, L.V.; Leyva, A.; *Arkivoc*, **2004**, VI, 89.

Pereira, A.C.; Santos A.S.; Kubota, L.T.; *Quim. Nova*, **2002**, 25 (6), 1012.

Perrin, D.D.; Dempsey, B.; *Buffers for pH and Metal Ion Control*, John Wiley & Sons: New York, **1974**.

Pindur, U.; Jansen, M.; Lemster, T.; *Curr. Med. Chem.*, **2005**, 12, 2805.

Plyta, Z.F.; Li, T.; Papageorgiou, V.P.; Mellidis, A.S.; Assimopoulou, A.S.A.N.; Pitsinos E.N.; Couladouros, E.A.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, *8*, 3385.

Prabhakar, N.; Arora, K.; Singh, S.P.; Pandey, M.K.; Singh H.; Malhotra, B.D.; *Anal. Chim. Acta*, **2007**, *589*, 6.

Rajski, S.R.; Williams, R.M.; *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 2723.

Rauf, S.; Gooding, J.J.; Akhtar, K.; Ghauri, M.A.; Rahman, M.; Anwar, M.A.; Khalid, A.M.; *J. Pharm. Biom. Anal.*, **2005**, *37*, 205.

Reinicke, K.E.; Bey, E.A.; Bentle, M.S.; Pink, J.J.; Ingalls, S.T.; Hoppel, C.L.; Misico, R.I.; Arzac, G.M.; Burton, G.; Bornmann, W.G.; Sutton, D.; Gao, J.; Boothman, D.A.; *Clin. Cancer Res.*, **2005**, *11* (5), 3055.

Revenga-Parra, M.; Lorenzo, E.; Pariente, F.; *Sens. Actuators B*, **2005**, *107*, 678.

Ribeiro, K.A.L.; Carvalho, C.M.; Molina, M.T; Lima, E.P.; López-Montero, E.; Reys, J.R.M.; Oliveira, M.B.F.; Pinto, A.V.; Santana, A.E.G.; Goulart, M.O.F.; *Acta Tropica*, **2009**, *111*, 44.

Rocha, J.R.C.; Demets, G.J.F.; Bertotti, M.; Araki, K.; Toma, H.E.; *J. Electroanal. Chem.*, **2002**, *526*, 69.

Rosa, R.M.; Moura, D.J.; Silva, A.C.R.; Saffi, J.; Henriques, J.A.P.; *Mutation Research*, **2007**, *631*, 44.

Rubin, A.; Perrot, H.; Gabrielli, C.; Pharm, M.C.; Piro, B.; *Electrochim. Acta*, **2010**, doi:10.1016/j.electacta.2010.02.013.

Salimi, A.; Mousavi, M.F.; Sharghi, H.; Shamsipur, M.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1999**, *72*, 2121.

Salimi, A.; Eshghi, H.; Sharghi, H.; Golabi, S.M.; Shamsipur, M.; *Electroanalysis*, **1999**, *11*, 114.

Santos, W. J. R.; Sousa, A. L.; Luz, R. C. S.; Damos, F. S.; Kubota, L. T.; Tanaka, A. A.; Tanaka, S. M. C. N.; *Talanta*, **2006**, *70*, 588.

Schafer, F.Q.; Buettner, G.R.; *Free Rad. Biol. Med.*, **2001**, *30*, 1191.

Serpa, J.; *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade de Recife*, **1958**, *18*, 275.

Sha, A.; Qureshi, R.; Khan, A.M.; Khera, R.A.; Ansari, F.L.; *J. Braz. Chem. Soc.*, **2009**, *1*.

Sharma, S.K.; Sehgal, N.; Kumar A.; *Curr. Appl. Phys.*, **2003**, *3*, 307.

Silva Jr., E.M.; Deus, C.F.; Martins, J.B.L.; Cavalcanti, B.C.; Pessoa, C.; Costa-Lotufo, L.V.; Montenegro, R.C.; Moraes, M.O.; Pinto, M.C.F.R.; Simone, C.A.; Ferreira, V.F.; Goulart, M.O.F.; Andrade, C.K.Z.; Pinto, A.V.; *J. Med. Chem.*, **2010**, *53*, 504.

Southampton Electrochemistry Group. *Instrumental Methods in Electrochemistry*. Edited by Southampton Electrochemistry Group. **2001**.

Souza, D.; Machado, S.A.S.; Avaca, L.; *Quim. Nova*, **2003**, *26* (1), 81.

Squella, J.A.; Bollo, S.; Nuñez-Vergara, L.J.; *Electroanalytical Aspects of Biological Significance Compounds*, Transworld Research Network: Kerala, **2006**.

Suman; Kumar, A.; *Sensors & Transducers Journal*, **2008**, *92* (5), 122.

Tian, X.; Song, Y.H.; Dong, H.M.; Ye, B.X.; *Bioelectrochemistry*, **2008**, *73*, 18.

Ticianelli, E.A.; Gonzalez, E.R.; *Eletroquímica*, 2ª Ed., Edusp, São Paulo, **2005**.

Tiwari, S.B.; Pai, R.M.; Udupa, N.; *J. Drug Target*, **2002**, 10 (8), 585.

Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.D.; Mazur, M.; Telser, J.; *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2007**, 39, 44.

Vasconcellos, M.C.; Tese, Universidade Federal do Ceará, **2007**.

Vasconcellos, M.C.; Bezerra, D.P.; Fonseca, A.M.; Pereira, M.R.P.; Lemos, T.L.G.; Pessoa, O.D.L.; Pessoa, C.; Moraes, M.O.; Alves, A.P.N.N.; Costa-Lotufo, L.V.; *Biological Pharmaceutical Bulletin*, **2007**, 30, 1416.

Vasconcellos, M.C.; Moura, D.J.; Rosa, R.M.; Machado, M.S.; Guecheva, T.N.; Villela, I.; Immich, B.F.; Montenegro, R.C.; Fonseca, A.M.; Lemos, T.L.G.; Moraes, M.E.A.; SaY, J.; Costa-Lotufo, L.V.; Moraes, M.O.; Henriques, J.A.P.; *Archives of Toxicology*, **2010**, 84 (6), 799.

Xiao, Y.; Lou, X.; Uzawa, T.; Plakos, K.J.I.; Plaxco, K.W.; Soh, H.T.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 15311.

Wan, Y.; Lao, R.; Liu, G.; Song, S.; Wang, L.; Li, D.; Fan, C.; *J. Phys. Chem. B*, **2010**, 114, 6703.

Wang, J.; *Nucleic Acids Research*, **2000a**, 28, 16, 3011.

Wang, J; *Anal. Electrochem.*; 2nd ed.; Wiley-VCH: New York, **2000b**, 68.

Wang, J.; Xu, D.K.; Kawde, A.N.; Polsky, R.; *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 5576.

Wardman, P.; *Curr. Med. Chem.*, **2001**, 8 (7), 739.

Watkins, B.F.; Behling, J.R.; Kariv, E.; Miller, L.L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 3549.

Weber, J.H.; Busch, D.H.; *Inorg. Chem.*, **1965**, 4, 469.

World Health Organization. Vector resistance to pesticides: fifteenth report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. *WHO Technical Report Series*, 818, Geneva, **1992**.

Won, B.Y.; Lee, D.W.; Shin, S.C.; Cho, D.; Lee, S.S.; Yoon, H.C.; Park, H.G.; *Biosens. Bioelectron.*, **2008**, 24, 665.

Xu, H.L.; Yu, X.F.; Qu, S.C.; Zhang, R.; Qu, X.R.; Chen, Y.P.; Ma, X.Y.; Sui, D.Y.; *European Journal of Pharmacology*, **2010**, 645, 14.

Yamashita, Y.; Kawada, S.; Fujii, N.; Nakano, H.; *Biochemistry*, **1991**, 24, 5838.

Zhang, S.; Xia, J.; Li, X.; *Anal. Chem.*, **2008a**, 80, 8382.

Zhang, J.; Lao, R.; Song, S.; Yan, Z.; Fan, C.; *Anal. Chem.*, **2008b**, 80, 9029.

Zhang, X.; Jiao, K.; Liu, S.; Hu, Y.; *Anal. Chem.*, **2009**, 81, 6006.

<http://www.meemelink.com/prints%20pages/23993.Juglandaceae%20-%20Juglans%20regia.htm>, acessado em Abril de 2010.

http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?inoid=342&query=simple&search_by_authname=all&search_by_field=tax&search_by_headline=false&search_by_keywords=any&search_by_priority=all&search_by_section=all&search_by_state=all&search_text_options=all&sid=32&site=fio&text=Genilton+Vieira, acessado em Novembro de 2010.

<http://manipulacaodavida.blogspot.com/2008/04/dna-molcula-da-vida.html>, acessado em Novembro de 2010.

<http://theuniversalmatrix.com/pt-br/artigos/?p=639>, acessado em Fevereiro de 2011.

9. GLOSSÁRIO

- **Adição de Michael:** adição de um nucleófilo a uma carbonila α,β -insaturada.
- **Aduto:** é uma molécula resultante (AB) formada pela união direta de moléculas A e B, sem que se produzam mudanças estruturais nas porções A e B.
- **Ação Clastogênica:** agente ou processo que induz a aberrações cromossômicas.
- **Agente Pró-Oxidante:** são substâncias endógenas ou exógenas que possuem a capacidade de oxidar moléculas-alvo.
- **Agente Quimiopreventivo:** é todo produto químico natural ou sintético, capaz de inverter, suprimir ou impedir o processo de evolução do câncer.
- **Apoptose:** tipo de autodestruição celular que requer energia e síntese protéica para sua execução, caracterizado por formação de “blebs, formação de corpos apoptóticos, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, em mecanismo dependente e caspases.
- **Carcinoma:** um tumor maligno, derivado de células epiteliais, que podem ocorrer em uma variedade de sítios, como pele, mama e fígado.
- **Fagocitose:** processo de alimentação de muitos protozoários unicelulares que consiste no englobamento de partículas sólidas pela célula, através da membrana celular – a partícula é envolvida num vacúolo digestivo, a partir do qual a matéria digerida passa depois para o citoplasma.
- **Genotoxicidade:** ação nociva que afeta a integridade do material genético de uma célula.
- **Granulócito:** célula de defesa do corpo humano provenientes da medula óssea.
- **Hipóxia:** Baixo conteúdo de oxigênio na célula, resultante de uma vascularização inadequada.
- **Instar:** estágio larval de alguns insetos (ex. *Aedes aegypti*)
- **Melanoma:** tipo de câncer que atinge o tecido epitelial.
- **MTT:** Ensaio colorimétrico usado para determinação da citotoxicidade de fármacos por meio da ação de enzimas redutoras de MTT.
- **Murino:** espécie de rato da família Muridae.

- **Necrose:** tipo de morte celular caracterizada por degradação de organelas; inchaço da mitocôndria; aumento de vacuolização, ruptura da membrana plasmática e degradação maciça e randômica do DNA nuclear.
- **Neoplasia:** alterações celulares que acarretam em um crescimento exagerado das células, ou seja, proliferação celular anormal, sem controle, autônoma, na qual reduzem ou perdem a capacidade de se diferenciar, em consequência de mudanças nos genes que regulam o crescimento e a diferenciação celulares.
- **Neutrófilos:** classe de células sanguíneas leucocitárias, que fazem parte do sistema imunológico, sendo um dos cinco principais tipos de leucócitos existentes (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos).
- **Pró-Droga:** compostos originalmente inativos, mas que são convertidos por meios químicos ou enzimáticos em compostos ativos.
- **Sarcoma:** tipo de câncer que atinge os ossos, cartilagem, gordura, vasos sanguíneos, músculos e tecidos moles.
- **Topoisomerase:** enzima que controla o estado topológico do DNA e catalisa a interconversão do mesmo.
- **Xenobiótico:** composto sintético estranho ao sistema vivo, ex. drogas inseticidas e anestésicos.
- **Xerófita:** nome que se dá aos vegetais que desenvolvem uma estrutura especial como o reforço das paredes celulares, com grande presença de tecidos mecânicos, e adaptação para resistir às secas.

10. ATIVIDADES EXTRAS

- Co-orientação de Trabalho de Conclusão de Curso do aluno Eivaldo de Oliveira Costa, do curso de Química Licenciatura, da Universidade Federal de Alagoas, intitulado “Estudos Eletroquímicos de Compostos Biologicamente Ativos”, cuja apresentação do TCC foi realizada em 23 de Fevereiro de 2010.
- Co-orientação do aluno de iniciação científica Waldomiro Pinho Junior, do 5º semestre do curso de Química Licenciatura, da Universidade Federal de Alagoas, no projeto atual intitulado “Eletroquímica Medicinal, Ambiental e Alimentar: uso de métodos e dispositivos na pesquisa da atividade biológica e antioxidante, na elucidação do mecanismo de ação, na análise e quantificação de substâncias biologicamente ativas e de contaminantes ambientais”, desde abril de 2006.
- Participação na banca de defesa de Trabalho de Conclusão de Curso do aluno Antonio Claudio Junior, do curso de Química Licenciatura, UFAL, cujo trabalho intitulado “A Metodologia Utilizada pelos Professores no Ensino de Química: Um Estudo de Caso a partir da Realidade das Escolas do Conjunto Graciliano Ramos em Maceió – AL” foi apresentado em 30 de Junho de 2010.
- Intercâmbio Científico na Universidade de Hull em Kingston-upon-Hull, Inglaterra, sob a supervisão do Prof. Dr. Jay D. Wadhawan, na “Pesquisa Voltamétrica de Antioxidantes”, realizado no período de 07 de Setembro a 14 de Novembro de 2008.
- Participação da 1ª Escola de Eletroquímica realizada no Instituto de Química, USP em São Paulo, no período de 04 a 08 de dezembro de 2006.
- Estágio de pesquisa laboratorial utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com complexos metálicos, sob a supervisão do Prof. Dr. Lauro T. Kubota, no Laboratório de Eletroquímica, Eletroanalítica e Desenvolvimento de Sensores (LEEDS) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) – SP, durante o período de 01 de Junho a 05 de Julho de 2006.

11. PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS

Título: Sensor Voltamétrico para Oncocalixona A Usando Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com Bicamadas de FeTSPc e FeT4MPyP

Nome do Evento: XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica

Local: Águas de Lindóia/SP

Período: 15 a 19 de abril de 2007

Título: Conteúdo Total de Fenóis e Capacidade Antioxidante de Farinhas de Resíduos de Frutas.

Nome do Evento: 9º Congresso da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN

Local: São Paulo/SP.

Período: 24 a 27 de outubro 2007.

Título: Estudo comparativo da eletrodegradação do diesel e biodiesel produzido a partir de óleo de soja

Nome do Evento: IV Encontro Nacional de Química Ambiental - ENQAmb.

Local: Aracaju/SE

Período: 11 a 14 de março de 2008

Título: Electrochemical Behaviour, Larvicidal and Molluscicidal Activities of Natural and Synthetic Naphtoquinones

Nome do Evento: The 59th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry

Local: Sevilha/Espanha

Período: 07 a 12 de Setembro de 2008

Título: Estudo do Efeito do pH no Potencial de Redução da Quinona Antitumoral 5-metoxi-1,4-naftoquinona

Nome do Evento: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química

Local: Águas de Lindóia/SP

Período: 26 a 29 de maio de 2008

Título: Estudo da Interação com DNA e do Efeito do pH no Comportamento Eletroquímico de Redução da Oncocalixona, Produto Natural Biologicamente Ativo

Nome do Evento: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química

Local: Águas de Lindóia/SP

Período: 26 a 29 de maio de 2008

Título: Estudo do Efeito do pH no potencial de oxidação do ácido xanturênico

Nome do Evento: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química

Local: Fortaleza/CE

Período: 30 de maio a 02 de junho de 2009

Título: Electrochemical studies of quinones and their interaction with ssDNA, dsDNA, poly-G and Poly-A, in search for anticancer activity

Nome do Evento: Biosensors 2010: 20th Anniversary world congress on biosensors

Local: Glasgow/Reino Unido

Período: 26 a 28 de maio de 2010

Título: Caracterização eletroquímica da Juglona e estudo da interação com ssDNA

Nome do Evento: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química

Local: Águas de Lindóia/SP

Período: 28 a 31 de maio de 2010

12. ANEXOS

COSTA, C.O., MIRANDA, P.R.B, HAZRA, B., DAS SARMA, M., LUZ, R.C.S., KUBOTA, L.T., GOULART, M.O.F., **Development of a voltammetric sensor for diospyrin determination in nanomolar concentrations**, *Talanta*, 68, 2006, 1378-1383.

GOULART, M.O.G., ABREU, F.C., SANT'ANA, A.E.G., MIRANDA, P.R.B., COSTA, C.O., LIWO, A., FALKOWSKI, P., ZARZECZANSKA, D., OSSOWSKI, T., **Determination of the pKa Values of some Biologically Active and Inactive Hydroxyquinones**, *J. Braz. Chem. Soc.*, 19, 2008, 175-183.

COSTA, C.O.; SOUZA, A.A.; LUZ, R.C.S.; LEMOS, T.L.G.; PESSOA, O.D.L.; KUBOTA, L.T.; GOULART, M.O.F.; **Electrochemical determination of oncocalyxone A using an iron-phthalocyanine/iron-porphyrin modified glassy carbon electrode**. *J. Braz. Chem. Soc.*, 19 (4), 2008, 697-703.