



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

**ATIVIDADE ANTITUMORAL DE NITROQUINONA DERIVADA DA
NOR- β -LAPACHONA.
CONTRIBUIÇÃO DA FARMACOELETROQUÍMICA NA PESQUISA DO
MECANISMO DE AÇÃO DE NOVOS FÁRMACOS.**

Maria Aline Barros Fidelis de Moura

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marília Oliveira Fonseca Goulart
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiane Caxico de Abreu**

Maceió-Al
-2008-



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

**ATIVIDADE ANTITUMORAL DE NITROQUINONA DERIVADA DA
NOR- β -LAPACHONA.
CONTRIBUIÇÃO DA FARMACOELETROQUÍMICA NA PESQUISA DO
MECANISMO DE AÇÃO DE NOVOS FÁRMACOS.**

Maria Aline Barros Fidelis de Moura

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

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marília Oliveira Fonseca Goulart
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiane Caxico de Abreu**

Maceió-Al
-2008-

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

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

M929a

Moura, Maria Aline Barros Fidelis de.

Atividade antitumoral de nitroquinona derivada da Nor- β -lapachona :
contribuição da farmacoeletoquímica na pesquisa do mecanismo de ação de
novos fármacos / Maria Aline Barros Fidelis de Moura. – Maceió, 2008.
xii, 147 f. : il. tabs., grafs.

Orientadora: Marília Oliveira Fonseca Goulart.

Co-Orientadora: Fabiane Caxico de Abreu.

Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de
Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2008.

Bibliografia: f. 132-146.

1. Nitroquinona. 2. Nor- β -lapachona. 3. Farmacoeletoquímica.
4. Genotoxicidade. 5. Citotoxicidade. I. Título.

CDU: 615.277:547



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
Instituto de Química e Biotecnologia
Universidade Federal de Alagoas
Tel. 55 82 3214-1384 Fax. 55 82 3214-1389
www.qui.ufal.br

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

Membros da Comissão Julgadora da Tese de Doutorado de Maria Aline Barros Fidelis de Moura intitulada: "Atividade Antitumoral de Nitroquinona Derivada da Nor- β -Lapachona. Contribuição da Farmacoeletrólise na Pesquisa do Mecanismo de Ação de Novos Fármacos", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 23 de abril de 2008, às 9hs na sala de Reuniões do IQB da UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

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

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

Prof.^a Dr.^a Suely Lins Galdino
Faculdade de Farmácia/UFPE

Prof.^a Dr.^a Lídia Moreira Lima
Faculdade de Farmácia/UFRJ

Prof.^a Dr.^a Iara de Barros Valentim
Pesquisadora IQB/UFAL

Prof. Dr. João Xavier Araujo Júnior
ENENFAR/PPGQB/UFAL

Prof.^a Dr.^a Adriana Santos Ribeiro
Arapiraca/UFAL

A imaginação nos faz criadores, acalenta-nos com os sonhos, organiza nossas metas, fortifica nossos objetivos e faz nosso ser vibrar. E se Deus nos deu o privilégio e o poder de sonhar, deu-nos também, a capacidade de transformá-los em realidade.

(Fidelis e Maria José)



Dedico esta tese aos meus pais,

Maria José e Fidelis.

E ao meu esposo, Daniel.

Agradeço,

a Deus, por estar comigo em toda caminhada, por me levantar a cada tropeço, dúvida ou medo e, principalmente, pelas provas constantes da Sua presença em minha vida.

ao meu esposo, Daniel, a quem, juntamente com meus pais, dedico esta etapa, pelo apoio, incentivo, desprendimento, exemplo de tranqüilidade e determinação. E por ser a pessoa que, por meios distintos, visa fins comuns aos meus, aos nossos.

à minha mãe, pelo apoio, pela postura presente em todos os momentos, pelos valores que sempre me ensinou e, principalmente, pela inspiração de FÉ, FORÇA e ESPERANÇA diante das situações mais conflitantes. Aos poucos as metas estão sendo atingidas. Mulher forte, exemplo de luta e conquistas. Sem vocês eu não teria conseguido.

ao meu pai, por me ensinar que força de vontade e fé em si mesmo é o primeiro e, às vezes, o único passo para o sucesso. Entre seus “sonhos”, constelações, telescópios e versos, encontra das formas mais originais de nos dar lições fundamentais. É pela tua força de vontade e entusiasmo que estás aqui para compartilhar comigo esta vitória.

ao meu irmãozinho, Francisco (Professor Dr. Francisco Fidelis), pela experiência passada com sinceridade, pelos ensinamentos, por todo apoio e incentivo prestados ao longo de nossa convivência e por ser um exemplo a ser seguido.

à Vovó Iracema (in memoriam), pois sempre foi para mim exemplo de garra, força e inteligência. Uma mulher a frente do seu tempo. Graças a Deus, nos aproximamos no “final”.

à Mada (in memoriam) por ter sido mais que uma tia durante minha infância e formação. Exemplo de carinho e... Que saudade do seu abraço!

aos meus sogros, Sr. Geraldo e D. Marluce, pois sem eles eu não teria meu Dani.

aos docentes da Universidade Federal de Alagoas, pelos ensinamentos, incentivos, pelas demonstrações de confiança quando dos convites para participações em bancas de TCC dos seus alunos, e, bem antes disso, pelas suas contribuições na construção do meu aprendizado, pois como diria Henry Adams “Um professor afeta a eternidade, é impossível dizer até onde vai sua influência”.

Agradeço especialmente ao professor Dr. Josealdo Tonholo, por todo seu exemplo em empreendedorismo e principalmente pelo incentivo e apoio de sempre nessa minha caminhada.

à Professora Dra. Adriana Ribeiro pelo incentivo. Exemplo de amor à pesquisa e por essa mania de ser “zen”, que sempre me “carrega positivamente”.

à Professora Dra. Magna Suzana Moreira do Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI) do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da UFAL, pelo exemplo de entusiasmo pelo que faz, por sua praticidade e por transmitir sempre tranquilidade.

aos Professores: Dr. Gilberto Fontes e Dra. Eliana M. Rocha, do ICBS - UFAL, pela oportunidade dos primeiros “passos” da minha vida acadêmica.

aos amigos do Grupo de Eletroquímica e do Instituto de Química da Universidade Federal de Alagoas pelos momentos de estudo, discussões de resultados e também de descontração. Agradeço a todos. Antonio (Antonitxe), Alane (Alanitxe), Francisco (obrigada pela ajuda), Fabrícia, Dani, Paulo, Cícero, Cris, Augusto, Waldomiro, Erivaldo, Ana Jú, Marcelo, Vanessa, Kelly, Manu, Thiago, Andresa, Bruna, Álex, Odilon, Amaro, Manoel, Almir, Allani, Sandovânio, Valéria, e a todos sem exceções.

ao meu amigo José Rui Machado Reys, pelos anos de convivência feliz, sincera, amável, descontraída. - Um dia de resultados “ruins” no laboratório, nunca foi um dia ruim quando você estava por perto. Exemplo de garra, energia, vida.

à amiga Dra. Francine Santos de Paula (Francietxe) por suas risadas (“dupla café com leite” segundo o professor Nivaldo) e, principalmente, pelos primeiros ensinamentos no laboratório, importantíssimos para o desenrolar da minha vivência no Grupo de Eletroquímica. Exemplo de paciência.

à amiga Professora Dra. Sandra Mary da Faculdade de Nutrição da UFAL por seu entusiasmo e principalmente, por estar sempre na minha “torcida”.

à amiga Dra. Iara Valentin, pelas palavras sensatas de sempre, incentivo, ensinamentos, correções e idéias.

ao professor Dr. Vitor Francisco Ferreira da Universidade Federal Fluminense e ao amigo virtual e colaborador acadêmico Eufrânio Nunes da Silva Júnior, seu aluno, por terem cedido as quinonas heterocíclicas estudadas neste trabalho.

aos professores Dr. Ivan da Rocha Pitta e Dra. Suely Lins Galdino do Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, por terem cedido as acridinas estudadas neste trabalho.

aos professores que participaram da banca de qualificação e da defesa da tese e que, com isso, muito contribuíram. Dra. Simoni Meneghetti, Dra. Adriana Ribeiro, Dra. Ana Rosa Alves, Dra. Magna Suzana, Dra. Iara Valentim, Dra. Suely Lins Galdino, Dra. Lídia Moreira Lima e Dr. João Xavier Araújo Júnior.

aos professores responsáveis pelo Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade do estágio no LOE, extremamente importante para minha formação e que, sem dúvida, muito contribuiu para o enriquecimento deste trabalho e para minha formação. Por esse motivo agradeço aos professores: Dr. Manoel Odorico de Moraes, Dra. Claudia do Ó Pessoa e Dra. Letícia Veras Costa-Lotuf.

Agradeço especialmente a pessoa da professora Dra. Raquel Montenegro (LOE – UFC) pela acolhida, por ter ficado mais próxima no laboratório, pelo incentivo, paciência e, principalmente, pelos grandes ensinamentos, sem contar que é uma pessoa e pesquisadora extraordinária.

aos amigos do Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, pela acolhida, incentivo, ajuda nos experimentos, discussão de resultados e, principalmente, pelos vários momentos lúdicos. Por esses e outros motivos agradeço a Jérsia, Delano, Carlinha, Diego, Danilo, Zé Roberto (UFAL/UFC), Marne, Paulinha e a todos sem exceções.

à Profa. Dra. Teresa Trevisan por todo apoio e por ter me recebido em Fortaleza.

às minhas amigas, Kelma, Suzana, Daiana e Érika por lembrarem sempre de mim, por nunca desistirem de me convidar para aquele “papo”, mas, principalmente por sempre entenderem quando eu digo - Não posso, não tenho tempo! Tenho em vocês o exemplo da mais pura e verdadeira amizade.

ao Aldy pelas cópias da qualificação e da tese, por todos os “dispositivos” e vidrarias e, principalmente, por ser uma pessoa iluminada que sempre tem uma palavra amiga.

aos meus alunos, “people”, principalmente aqueles que se tornaram mais próximos, por serem de grande importância para o meu desenvolvimento profissional.

ao CNPq pela concessão da bolsa, como também, CAPES e FAPEAL pelo suporte financeiro ao grupo.

Agradeço Especialmente

*à minha orientadora, professora Dra. **Marília Goulart**, tudo que tenho a agradecer-la não pode ser materializado em palavras, pelo simples fato de quão grande o é. Ainda assim, agradeço, pela orientação, pelo seu incentivo à independência, por todas as injeções de ânimo. E, principalmente, pelo especial apoio nas horas difíceis, que não foram poucas, sendo estas das mais diversas ordens. Em **todos** esses momentos, ela esteve presente.*

Não posso esquecer quando da ocasião do resultado do concurso para professor substituto, quando ela me chamou e disse: “- Você agora é uma professora, será o referencial para os seus alunos!” Quando disse isto, naturalmente falou com propriedade, com a propriedade de ser a referência para seus alunos e para todos que tem a oportunidade de conviver com ela.

Agradeço ainda pelas oportunidades de estágios em outras Universidades, pois, sem dúvida, estes contribuíram de forma imensurável para a minha formação.

*ao Professor **Nivaldo Soares** por ser meu “Pai Científico”. Durante a disciplina de Química Orgânica, ainda na graduação de Farmácia, o conheci e a partir disto as “portas do mundo acadêmico se abriram” para mim, por esses e outros motivos o apelidaram de meu “**Pai**” e a mim de sua “**Filha**”, até hoje, alguns anos depois, ainda vigora o codinome que é confirmado a cada conversa, a cada troca de idéias, a cada desabafo, a cada “bronca”, a cada discussão de resultados, correções em língua portuguesa e, principalmente, a cada risada.*

*à Professora Dra. Fabiane Caxico de Abreu – **Fabi** – agradeço especialmente pelos primeiros ensinamentos no laboratório de eletroquímica e a todo apoio no período da seleção de doutorado. A Fabi foi uma pessoa da maior importância, em um dos períodos mais conflitantes. Nunca ninguém ouviu dizer ser fácil fazer um doutorado (segundo Marília, “Não é nada trivial”) e no meu momento de maior fraqueza a Fabi foi uma pessoa muito importante, fazendo-me enxergar, voltar atrás e, o mais importante, não desistir.*

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	v
Lista de Tabelas.....	xv
Lista de Abreviaturas	xviii
RESUMO	xx
ABSTRACT.....	xxi
I – Introdução.....	1
I.1 – Eletroquímica em Química Medicinal.....	1
I.2 – Câncer.....	11
I.2.1 – Tratamento do Câncer e Epidemiologia.....	19
I.3 – Quinonas: Atividades farmacológicas e mecanismos gerais.....	24
I.4 – Biossensor Eletroquímico de DNA.....	34
II – Objetivos.....	40
II.1 – Objetivos Gerais.....	40
II.2 – Objetivos Específicos.....	40
III – Material e Métodos.....	42
III.1 – Reagentes e Solventes.....	42
III.2 – Estudos Eletroquímicos.....	44
III.2.1 – Meio Aprótico.....	45
III.2.1.1 – Síntese e purificação de TBAP.....	45
III.2.2 – Meio Prótico.....	46
III.3 – Estudos em Biossensor de DNA.....	46
III.3 – 1 – Preparação do gel de dsDNA:	47
III.3 – 2 – Condicionamento do Eletrodo:	47
III.3 – 3 – Estudo da interação das substâncias-teste com o dsDNA:.....	48
III.3 – 4 – Adaptação da Metodologia do Biossensor de DNA (Wang, 2006) para avaliação de substâncias insolúveis. Pasta de Carbono modificada com as substâncias teste (ACRIDINAS):	48

III.3 – 5 – Preparação da solução de ssDNA:	49
III.3 – 6 – Estudo da interação das substâncias teste (imobilizadas na pasta de carbono - ACRIDINAS) com a solução de ssDNA:	49
III.4 – Técnicas Eletroanalíticas.....	49
III.4 – 1 – Voltametria Cíclica (VC).....	50
III.4 – 2 – Voltametria de Pulso Diferencial (VPD).....	51
III.4 – 3 – Voltametria de Onda Quadrada (VOQ).....	52
III.4 – 4 – ESR (Ressonância de Spin do Elétron) - Acoplada a Voltametria Cíclica – Espectroeletróquímica.....	54
III.5 – Estudos Farmacológicos.....	55
III.5 – 1 – Materiais utilizados e equipamentos.....	55
III.5 – 2 – Soluções utilizadas.....	56
III.5 – 3 – Reagentes.....	58
III.5 – 4 – Experimental.....	59
III.5 – 4.1 – Estudo da citotoxicidade <i>in vitro</i>	59
III.5 – 4.2 – Manutenção das células.....	59
III.5 – 4.3 – Teste de citotoxicidade <i>in vitro</i> – Ensaio do MTT.....	60
III.5 – 4.4 – Teste de citotoxicidade <i>in vitro</i> – Viabilidade celular por Exclusão por azul de tripan.....	61
III.5 – 4.5 – Análise morfológica – Coloração diferencial por Hematoxilina/Eosina.....	61
III.5 – 4.6 – Análise morfológica - Coloração por May-Grunwald-Giemsa...	62
III.5 – 4.7 – Análise morfológica – Coloração diferencial por Laranja de Acridina / Brometo de Etídio.....	63
III.5 – 4.8 – Síntese de DNA por incorporação de BrDU.....	64
III.5 – 4.9 – Avaliação farmacológica <i>in vitro</i> do potencial genotóxico da nitroquinona – Ensaio do Cometa.....	65
III.5 – 4.10 – Análises por citometria de fluxo.....	67

1º) Determinação da integridade da membrana celular por Citometria de Fluxo - Viabilidade Celular.	67
2º) Análise do Ciclo Celular e Fragmentação de DNA.	68
3º) Determinação do Potencial Transmembrânico da Mitocôndria.	69
IV – Resultados e Discussões	71
IV.1 – Estudos Eletroquímicos	72
IV.1 – 1 – Meio Aprótico	72
Série 1	72
IV.1 – 1.1 – Composto 1	74
IV.1 – 1.2 – Composto 2	75
IV.1 – 1.3 – Composto 3	76
IV.1 – 1.4 – Composto 4	77
IV.1 – 1.5 – Composto 5	78
Série 2	87
IV.1 – 1.6 – Composto 6	90
IV.1 – 1.7 – Composto 7	91
IV.1 – 1.8 – Composto 8	92
IV.1 – 1.9 – Composto 9	93
IV.1 – 2 – Racionalização dos resultados em meio aprótico	94
IV.1 – 3 – Meio Prótico	96
Série 1	96
IV.1 – 3.1 – Composto 5	96
Série 2	98
IV.1 – 3.2 – Composto 6	100
IV.1 – 3.3 – Composto 7	100
IV.1 – 3.4 – Composto 8	101
IV.1 – 3.5 – Composto 9	101
IV.2 – Estudos em Biossensor de DNA	102

IV.2.1 – Composto 5	102
IV.2.2 – Resultado da adaptação da metodologia do Biossensor de DNA (Wang <i>et al.</i> , 2006) para avaliação de substâncias insolúveis. Pasta de carbono modificada com as substâncias teste (acridinas):.....	104
IV.3 – Estudos Farmacológicos.....	108
IV.3 – 1 – Teste de citotoxicidade <i>in vitro</i> – Ensaio do MTT.....	108
IV.3 – 2 – Viabilidade celular – Exclusão por Azul de Tripan.....	112
IV.3 – 3 – Análise morfológica – Coloração diferencial por hematoxilina/eosina (HE)	113
IV.3 – 4 – Análise morfológica - Coloração por May-Grunwald-Giemsa....	114
IV.3 – 5 – Análise morfológica – Coloração diferencial por Laranja de Acridina / Brometo de Etídio.....	116
IV.3 – 6 – Síntese de DNA por incorporação de BrDU	118
IV.3 – 7 – Avaliação farmacológica <i>in vitro</i> do potencial genotóxico da nitroquinona – Teste do Cometa.....	118
IV.3 – 8 – Análises por citometria de fluxo.....	121
1º) Determinação da integridade da membrana celular por Citometria de Fluxo - Viabilidade Celular	121
2º) Análise do Ciclo Celular e Fragmentação de DNA.....	121
3º) Determinação do Potencial Transmembrânico da Mitocôndria.....	123
IV.4 – Racionalização dos resultados dos ensaios farmacológicos – proposição do mecanismo de ação da nitroquinona.....	126
V – Conclusões.....	128
VI – Perspectivas.....	130
VII – Referências Bibliográficas.....	132

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação esquemática de mecanismos pelos quais pró-fármacos ativados por biorredução exercem suas atividades farmacológicas. A: Ativação seletiva em hipóxia; B: Ativação em condições normóxicas, geração do Estresse Oxidativo. Adaptado de Wardman *et al.*, 2001. 4
- Figura 2:** Potenciais redox (pH 7,0) da redutase NADPH-citocromo P-450 (FAD-FMN, $E_{m,7}$) e potenciais de redução monoelétrônicos de xenobióticos (E^1_7). Os valores para as enzimas foram determinados por Iyanagi e colaboradores e os dos produtos químicos são valores da literatura. Adaptado de Livertoux *et al.*, 1996. 6
- Figura 3:** Estrutura das flavoproteínas FNM (forma oxidada) e FNMH₂ (reduzida). 7
- Figura 4.** Tipos de câncer mais incidentes, estimados para 2008, na população brasileira, exceto câncer de pele não-melanoma (INCA, 2008). 12
- Figura 5:** Esquema das bases moleculares da formação do câncer. 14
- Figura 6:** Representação do ciclo celular. Fases G₀/G₁, S e G₂. (Foster *et al.*, 2007). 15
- Figura 7:** Esquema de indução das vias Intrínseca (mitocondrial) e Extrínseca (receptor de morte) da apoptose, por meio de indutores particulares para estas vias. Ativação final da caspase-3 e indução de morte celular programada. Adaptado de Hengartner *et al.*, 2000. 18
- Figura 8a:** Representação espacial das taxas de incidência por 100.000 homens estimadas para o ano de 2002, segundo a unidade da federação (todas as neoplasias, exceto pele não melanoma) (Almeida *et al.*, 2005). 20

Figura 8b: Representação espacial das taxas de incidência por 100.000 mulheres estimadas para o ano de 2002, segundo a unidade da federação (todas as neoplasias, exceto pele não melanoma) (Almeida <i>et al.</i> , 2005).	21
Figura 9a: Representação espacial das taxas de incidência por 100.000 homens estimadas para o ano de 2008, segundo a unidade da federação (todas as neoplasias, exceto pele não melanoma) (INCA, 2008).	21
Figura 9b: Representação espacial das taxas de incidência por 100.000 mulheres estimadas para o ano de 2008, segundo a unidade da federação (todas as neoplasias, exceto pele não melanoma) (INCA, 2008).	22
Figura 10: Classificação de antineoplásicos segundo Chabner (1995) <i>adaptado</i> .	23
Figura 11: Estrutura Química da Mecloretamina, agente alquilante de DNA.	24
Figura 12: (a) Estrutura química da Coenzima Q; (b) Estrutura química da Vitamina K; (c-1 e c-2) Metabolismo oxidativo com geração de quinonas tóxicas a partir de acetaminofeno (c-1).	25
Figura 13: Redução de quinonas (Q) via 1 e 2 elétrons, gerando semiquinonas (Q [•]) e hidroquinonas (QH ₂), respectivamente.	26
Figura 14: Esquema quadrado representativo da oxirredução de quinonas em vários meios. Adaptado de Jettic, 1970.	27
Figura 15: Mecanismos gerais de ação biológica de quinonas. Adaptado de Monks <i>et al.</i> , 1992.	28
Figura 16: Atuação de quinonas na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e destoxificação, pelo emprego de catalase e superóxido-dismutase (SOD).	29

Figura 17: Sumário dos potenciais mecanismos moleculares citotóxicos para quinonas. Adaptado de Bolton <i>et al.</i> , 2000.	30
Figura 18: Interrupção da Cadeia Respiratória Mitocôndrica. Fp: flavoproteína; Cit: citocromo. Adaptado de Stryer <i>et al.</i> , 1995.	31
Figura 19. Quinonas, E_{redox} e atividade tripanocida (Goulart <i>et al.</i> , 1997).	33
Figura 20. Mecanismos de funcionalização do DNA por ligação intra-fitas, inter-fitas e inter-hélices, como também por agentes alquilantes e intercalantes. A e B representam grupos eletrofílicos dos agentes de interesse. Adaptado Chaires <i>et al.</i> , 2006.	35
Figura 21: Estrutura de derivados de acridina (Pitta <i>et al.</i> , WO/2007/109871, 2007).	36
Figura 22: Representação do modo de operação do biossensor de DNA. O analito entra entre as fitas do dsDNA, modifica sua conformação, o que leva à exposição de suas bases, passíveis de oxidação anódica.	37
Figura 23: Voltamogramas de pulso diferencial (carbono vítreo) do biossensor de dsDNA (tampão acetato pH 4,5). $v = 5 \text{ mVs}^{-1}$, amplitude 50 mV. Antes e após interação de acridina (substância intercalante).	38
Figura 24: Voltametria de pulso diferencial do biossensor de dsDNA com β -lapachona (a), $6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de (...dsDNA) e (___ após 24, 30 e 48 h.). Tampão acetato, pH 4,5, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Amplitude de pulso: 50 mV, tempo de pulso: 70 ms, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. (Brett <i>et al.</i> , 2002).	39
Figura 25: Substâncias derivadas da <i>nor</i> - β -Lapachona. Objeto de estudo.	42 – 43

Figura 26: Derivados de Acridina.	44
Figura 27: Técnica da VC. a) Perturbação aplicada e b) resposta obtida.	50
Figura 28: Voltametria de Pulso Diferencial. Perfil corrente-potencial esquemático.	52
Figura 29: Voltametria de Onda Quadrada. 1, 2 e 3 – Esquema de aplicação de potenciais; 4 – Perfil corrente-potencial esquemático.	53
Figura 30: Voltametria de Onda Quadrada. Representações de: (1) processo reversível; (2) processo irreversível.	53
Figura 31: Tipos de cometas: Representação dos cometas corados com brometo de etídeo e visualizados no microscópio de fluorescência, sendo indicado o escore atribuído para cada cometa de acordo com o dano. Adaptado de Collins <i>et al</i> , 2004.	66
Figura 32. Voltamogramas Cíclicos dos compostos da série 1 (exceto composto 5) (3 mmolL ⁻¹) em DMSO/TBAP (0,1 molL ⁻¹). Eletrodo de CV. $\nu = 100 \text{ mVs}^{-1}$. E / V vs Ag/AgCl/Cl ⁻ (0,1 molL ⁻¹).	73
Figura 33a. Análise do transporte de massa da VC $f(\nu)$ do composto 1 , lp_{1c} vs $\nu^{1/2}$. Eletrodo de Carbono Vítreo. E / V vs Ag/AgCl/Cl ⁻ (0,1 molL ⁻¹).	74
Figura 33b: Gráfico de E_{p1c} vs $\log \nu$ (0,035 a 0,5 Vs ⁻¹) do composto 1 (DMSO/TBAP 0,1 mol L ⁻¹), em eletrodo de CV; $c = 3 \text{ mmol L}^{-1}$. E / V vs Ag/AgCl/Cl ⁻ (0,1 molL ⁻¹).	74
Figura 34a. Análise do transporte de massa da VC $f(\nu)$ do composto 2 , lp_{1c} vs $\nu^{1/2}$. Eletrodo de Carbono Vítreo. E / V vs Ag/AgCl/Cl ⁻ (0,1 molL ⁻¹).	75

- Figura 34b:** Gráfico de $E_{p_{ic}}$ vs $\log \nu$ (0,035 a 0,5 Vs^{-1}) do composto **2** 75
(DMSO/TBAP 0,1 mol L^{-1}), em eletrodo de CV; $c = 3$ mmol L^{-1} . E / V vs
Ag/AgCl/ Cl^{-} (0,1 mol L^{-1}).
- Figura 35a.** Análise do transporte de massa da VC $f(\nu)$ do composto **3**, Ip_{ic} 76
vs $\nu^{1/2}$. Eletrodo de Carbono Vítreo. E / V vs Ag/AgCl/ Cl^{-} (0,1 mol L^{-1}).
- Figura 35b:** Gráfico de $E_{p_{ic}}$ vs $\log \nu$ (0,035 a 0,5 Vs^{-1}) do composto **3** 76
(DMSO/TBAP 0,1 mol L^{-1}), em eletrodo de CV; $c = 3$ mmol L^{-1} . E / V vs
Ag/AgCl/ Cl^{-} (0,1 mol L^{-1}).
- Figura 36a.** Análise do transporte de massa da VC $f(\nu)$ do composto **4**, Ip_{ic} 77
vs $\nu^{1/2}$. Eletrodo de Carbono Vítreo. E / V vs Ag/AgCl/ Cl^{-} (0,1 mol L^{-1}).
- Figura 36b:** Gráfico de $E_{p_{ic}}$ vs $\log \nu$ (0,035 a 0,5 Vs^{-1}) do composto **4** 77
(DMSO/TBAP 0,1 mol L^{-1}), em eletrodo de CV; $c = 3$ mmol L^{-1} . E / V vs
Ag/AgCl/ Cl^{-} (0,1 mol L^{-1}).
- Figura 37:** Voltamograma Cíclico do composto **5** (3 mmol L^{-1}) em 78
DMSO/TBAP (0,1 mol L^{-1}). Eletrodo de CV. $\nu = 100$ mVs $^{-1}$. E / V vs
Ag/AgCl/ Cl^{-} (0,1 mol L^{-1}).
- Figura 38a.** Análise do transporte de massa da VC $f(\nu)$ do composto **5**, Ip_{ic} 79
vs $\nu^{1/2}$. Eletrodo de Carbono Vítreo. E / V vs Ag/AgCl/ Cl^{-} (0,1 mol L^{-1}).
- Figura 38b:** Gráfico de $E_{p_{ic}}$ vs $\log \nu$ (0,035 a 0,5 Vs^{-1}) do composto **5** 79
(DMSO/TBAP 0,1 mol L^{-1}), em eletrodo de CV; $c = 3$ mmol L^{-1} . E / V vs
Ag/AgCl/ Cl^{-} (0,1 mol L^{-1}).

- Figura 39.** Voltamograma Cíclico do composto **5** (em 2 ciclos) (3 mmol L^{-1}) 80 em DMSO/TBAP ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de CV. $\nu = 100 \text{ mVs}^{-1}$. E / V vs Ag/AgCl/Cl^- ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).
- Figura 40:** Mecanismo de redução do composto **5**. Redução da Quinona e 80 do Nitro em meio aprótico.
- Figura 41.** Voltamogramas cíclicos de **5**, $c = 1,2 \text{ mmol L}^{-1}$, em CV (0.07 cm^2), em $\text{CH}_3\text{CN}/n\text{-Bu}_4\text{NPF}_6$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Voltamogramas obtidos em vários $E\lambda$ (potenciais de inversão), ν : 100 mV s^{-1} . 81
- Figura 42:** Espectro de ESR do Composto **5** em banda de raio X (9.85 GHz), 83 utilizando um instrumento Bruker ELEXSYS 500 com uma cavidade retangular TE_{102} .
- Figura 43:** Estrutura numerada do Composto **5**. 83
- Figura 44:** Espectro de ESR para as espécies radicalares eletrogeradas no 85 2° processo de redução ($E = -1.80 \text{ V}$ vs Fc^+/Fc). (A) Espectro experimental obtido; (B) Espectro teórico obtido por deconvolução do espectro A e (C) Simulação da mistura radicalar obtida do espectro A e B.
- Figura 45:** Estruturas radicalares caracterizadas para as duas etapas de 86 redução do composto **5**, com formação da semiquinona e do ânion radical nitro, independentes.
- Figura 46.** Voltamogramas Cíclicos dos compostos da série **2** (3 mmol 88 L^{-1}) em DMF/TBAP ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de CV. $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$. E / V vs Ag/AgCl/Cl^- ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).
- Figura 47.** Voltamogramas de Onda Quadrada (VOQ) dos compostos da 89 série **2** (3 mmol L^{-1}) em DMF/TBAP ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de CV. $f = 25 \text{ Hz}$. E / V vs Ag/AgCl/Cl^- ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

- Figura 48a.** Análise do transporte de massa da VC $f(\nu)$ do composto **6**, $I_{p_{lc}}$ vs $\nu^{1/2}$. Eletrodo de Carbono Vítreo. E / V vs $Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ molL}^{-1}$). 90
- Figura 48b:** Gráfico de $E_{p_{lc}}$ vs $\log \nu$ ($0,035$ a $0,5 \text{ Vs}^{-1}$) do composto **6** (DMF/TBAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), em eletrodo de CV; $c = 3 \text{ mmol L}^{-1}$. E / V vs $Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ molL}^{-1}$). 90
- Figura 49a.** Análise do transporte de massa da VC $f(\nu)$ do composto **7**, $I_{p_{lc}}$ vs $\nu^{1/2}$. Eletrodo de Carbono Vítreo. E / V vs $Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ molL}^{-1}$). 91
- Figura 49b:** Gráfico de $E_{p_{lc}}$ vs $\log \nu$ ($0,035$ a $0,5 \text{ Vs}^{-1}$) do composto **7** (DMF/TBAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), em eletrodo de CV; $c = 3 \text{ mmol L}^{-1}$. E / V vs $Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ molL}^{-1}$). 91
- Figura 50a.** Análise do transporte de massa da VC $f(\nu)$ do composto **8**, $I_{p_{lc}}$ vs $\nu^{1/2}$. Eletrodo de Carbono Vítreo. E / V vs $Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ molL}^{-1}$). 92
- Figura 50b:** Gráfico de $E_{p_{lc}}$ vs $\log \nu$ ($0,035$ a $0,5 \text{ Vs}^{-1}$) do composto **8** (DMF/TBAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), em eletrodo de CV; $c = 3 \text{ mmol L}^{-1}$. E / V vs $Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ molL}^{-1}$). 92
- Figura 51a.** Análise do transporte de massa da VC $f(\nu)$ do composto **9**, $I_{p_{lc}}$ vs $\nu^{1/2}$. Eletrodo de Carbono Vítreo. E / V vs $Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ molL}^{-1}$). 93
- Figura 51b:** Gráfico de $E_{p_{lc}}$ vs $\log \nu$ ($0,035$ a $0,5 \text{ Vs}^{-1}$) do composto **9** (DMF/TBAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), em eletrodo de CV; $c = 3 \text{ mmol L}^{-1}$. E / V vs $Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ molL}^{-1}$). 93

Figura 52. (A) VC do composto **5** (**Série 1**), no domínio catódico. (B) VC do composto **5**, no domínio anódico. Composto **5** a 1 mmolL^{-1} em meio prótico (Tampão Acetato pH 4,5). Eletrodo de CV. $\nu = 100 \text{ mVs}^{-1}$. E / V vs $\text{Ag/AgCl/Cl}^- (0,1 \text{ molL}^{-1})$. 97

Figura 53. (A) Voltametria de Pulso Diferencial do composto **5**, no domínio catódico. (B) Voltametria de Pulso Diferencial do composto **5**, no domínio anódico. Composto **5** em $C = 1 \text{ mmolL}^{-1}$, em meio prótico (Tampão Acetato pH 4,5). Eletrodo de Carbono Vítreo. $\nu = 5 \text{ mVs}^{-1}$. E / V vs $\text{Ag/AgCl/Cl}^- (0,1 \text{ molL}^{-1})$. 97

Figura 54. Voltametrias Cíclicas dos compostos da série **2** (1 mmolL^{-1}) em meio aquoso tamponado (prótico, pH 4,5). Eletrodo de Carbono Vítreo. $\nu = 35 \text{ mVs}^{-1}$. E / V vs $\text{Ag/AgCl/Cl}^- (0,1 \text{ molL}^{-1})$. 98

Figura 55. Análise do transporte de massa da Voltametria Cíclica $f(\nu)$ dos compostos da série **2**, $I_{p,c}$ vs $\nu^{1/2}$. Eletrodo de Carbono Vítreo. E / V vs $\text{Ag/AgCl/Cl}^- (0,1 \text{ molL}^{-1})$. 99

Figura 56. Voltametria de Pulso Diferencial do biossensor de DNA, com e sem adição do composto **5**. Composto **5** em $C = 3 \text{ mmolL}^{-1}$. Todos os voltamogramas foram realizados em meio aquoso (tampão Acetato pH 4,5). Eletrodo de CV modificado com dsDNA. $\nu = 5 \text{ mVs}^{-1}$. E / V vs $\text{Ag/AgCl/Cl}^- (0,1 \text{ molL}^{-1})$. 103

Figura 57. Voltamogramas de Pulso Diferencial em eletrodo de carbono vítreo modificado com o gel de dsDNA com e sem adição (de $20 \mu\text{L}$) das substâncias teste (Acridinas, Compostos **A**, **B**, **C** e **D**) $C = 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (EtOH). A VPD do biossensor foi realizado em tampão acetato pH 4,5. $\nu = 5 \text{ mVs}^{-1}$. 105

Figura 58. Voltamogramas de Pulso Diferencial ($\nu = 5 \text{ mVs}^{-1}$) da pasta de carbono modificada com os derivados de acridina ($10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ em EtOH), imersa em uma solução de ssDNA em tampão acetato pH 4,5. 107

Figura 59: Relação entre os potenciais de pico catódicos (E_{plc}) e Concentração Inibitória mínima (CI_{50}) das quinonas heterocíclicas das séries **1** e **2** em linhagem HL – 60. 111

Figura 60: – Efeitos da *Nor*- β -Lapachona e do composto **5** na viabilidade de células HL – 60, determinados por exclusão do Azul de Tripán, após 24 horas de incubação. **(C)** Controle negativo tratado com veículo (Meio RPMI); **(D)** Doxorubicina usada como controle positivo ($0,3 \mu\text{g/mL}$). $p < 0.05$ comparado com o controle pela ANOVA seguido do teste de Dunnett, para dois experimentos realizados em duplicata ($n=4$). 113

Figura 61: Coloração Hematoxilina/Eosina. **(A)** Controle. **(B)** e **(C)** Composto **5**, $c = 2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. 114

Figura 62: **A** Coloração May-Grunwald-Giemsa (Controle). **B** Coloração May-Grunwald-Giemsa Composto **5**, $c = 2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. 115

Figura 63: – Efeito da *Nor*- β -Lapachona e do Composto **5** na viabilidade celular da linhagem HL – 60. Coloração diferencial por acridina laranja e brometo de etídio. (AO/EB), por microscopia de fluorescência (após 24 horas de incubação); **(C)** Controle Negativo (meio RPMI); **(D)** Controle positivo – Doxorubicina ($0.3 \mu\text{g/mL}$). Foi considerado $p < 0.05$ comparado ao controle por ANOVA seguido de teste de Dunnett. Os valores apresentados foram comparados de dois experimentos distintos realizados em triplicata. ($n=6$). 116

Figura 64: Fotos da coloração diferencial com acridina Laranja/Brometo de Etídio. **(A)** Controle; **(B)** Composto **5** $[0,5] \mu\text{M}$; **(C)** Composto **5** $[1,0] \mu\text{M}$; **(D)** Composto **5** $[1,5] \mu\text{M}$; **(E)** Composto **5** $[2,0] \mu\text{M}$. **(F)** Doxorubicina. 117

Figure 65 – Inibição da incorporação do BrDu (5-bromo-2'-desoxiuridina) em 118 células HL-60 tratadas com Nor- β -Lapachona e composto **5**. **(D)** Doxorubicina (0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$), como controle positivo. Dados apresentados como valores médios de dois experimentos independentes, realizados em duplicata ($n=4$), de percentagem de positividade de BrDU por 200 células. $p < 0.05$ comparado ao controle por ANOVA, seguido de teste de Dunnett.

Figura 66: (A) – Índice de dano em um tempo de 3 horas e (B) – Índice de 120 dano em um tempo de 24 horas no teste do cometa em HL – 60. * $p < 0,05$ vs. controle (ANOVA, teste de Dunnett).

Figura 67: Análise da integridade de membrana celular células HL – 60 121 tratadas com Nor- β -Lapachona e com o composto **5** (nitroquinona).

Figura 68: Análise do Ciclo Celular. (A) Controle; (B) Doxorubicina; (C) 122 Nitroquinona 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (D) Nitroquinona 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (E) Nitroquinona 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 69: Análise do Ciclo Celular. (A) Controle; (B) Doxorubicina; (C) Nor- 123 β -Lapachona 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (D) Nor- β -Lapachona 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 70: Análise do potencial transmembrânico de mitocôndria. (A) 124 Controle; (B) Doxorubicina; (C) Nitroquinona 0,5 μM ; (D) Nitroquinona 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (E) Nitroquinona 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 71: Análise do potencial transmembrânico de mitocôndria. (A) 125 Controle; (B) Doxorubicina; (C) Nor- β -Lapachona 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (D) Nor- β -Lapachona 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação entre os potenciais dos eletrodos de referência em meio aquoso e meio aprótico.	10
Tabela 2: Testes diagnósticos em VC para processos reversíveis, irreversíveis e quase-reversíveis.	51
Tabela 3: Soluções utilizadas nos ensaios farmacológicos.	56- 57
Tabela 4: Linhagens celulares tumorais utilizadas nos ensaios de citotoxicidade <i>in vitro</i> .	59
Tabela 5: Parâmetros eletroquímicos encontrados para o composto 1. Estudo em função da velocidade de varredura. <i>Epc vs Ag/AgCl/Cl⁻</i> (0,1 molL ⁻¹)	74
Tabela 6: Parâmetros eletroquímicos encontrados para o composto 2. Estudo em função da velocidade de varredura. <i>Epc vs Ag/AgCl/Cl⁻</i> (0,1 molL ⁻¹)	75
Tabela 7: Parâmetros eletroquímicos encontrados para o composto 3. Estudo em função da velocidade de varredura. <i>Epc vs Ag/AgCl/Cl⁻</i> (0,1 molL ⁻¹)	76
Tabela 8: Parâmetros eletroquímicos encontrados para o composto 4. Estudo em função da velocidade de varredura. <i>Epc vs Ag/AgCl/Cl⁻</i> (0,1 molL ⁻¹)	77
Tabela 9: Parâmetros eletroquímicos encontrados para o composto 5. Estudo em função da velocidade de varredura. <i>Epc vs Ag/AgCl/Cl⁻</i> (0,1 molL ⁻¹)	79
Tabela 10. Constantes de acoplamento hiperfinas e larguras de banda para o ânion radical obtido (formado pela redução <i>in situ</i>) e para a estrutura biânion radical para o composto 5.	84

Tabela 11: Parâmetros eletroquímicos encontrados para o composto 6 . Estudo em função da velocidade de varredura. <i>Epc vs Ag/AgCl/Cl⁻</i> (0,1 molL ⁻¹)	90
Tabela 12: Parâmetros eletroquímicos encontrados para o composto 7 . Estudo em função da velocidade de varredura. <i>Epc vs Ag/AgCl/Cl⁻</i> (0,1 molL ⁻¹)	91
Tabela 13: Parâmetros eletroquímicos encontrados para o composto 8 . Estudo em função da velocidade de varredura. <i>Epc vs Ag/AgCl/Cl⁻</i> (0,1 molL ⁻¹)	92
Tabela 14: Parâmetros eletroquímicos encontrados para o composto 9 . Estudo em função da velocidade de varredura. <i>Epc vs Ag/AgCl/Cl⁻</i> (0,1 molL ⁻¹)	93
Tabela 15: Valores de $E_{p_{lc}}$ das quinonas heterocíclicas.	95
Tabela 16: Parâmetros eletroquímicos encontrados para o composto 6 . Estudo em função da velocidade de varredura. <i>Epc vs Ag/AgCl/Cl⁻</i> (0,1 molL ⁻¹)	100
Tabela 17: Parâmetros eletroquímicos encontrados para o composto 7 . Estudo em função da velocidade de varredura. <i>Epc vs Ag/AgCl/Cl⁻</i> (0,1 molL ⁻¹)	100
Tabela 18: Parâmetros eletroquímicos encontrados para o composto 8 . Estudo em função da velocidade de varredura. <i>Epc vs Ag/AgCl/Cl⁻</i> (0,1 molL ⁻¹)	101
Tabela 19: Parâmetros eletroquímicos encontrados para o composto 9 . Estudo em função da velocidade de varredura. <i>Epc vs Ag/AgCl/Cl⁻</i> (0,1 mol L ⁻¹)	101
Tabela 20: Atividade Citotóxica da série 1 , expressa em CI_{50} em $\mu\text{mol L}^{-1}$ dos compostos em relação às linhagens de células de câncer. (Da Silva Júnior, <i>et al.</i> , <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry</i> 15 (2007) 7035–7041).	109

Tabela 21: Atividade Citotóxica da série **2**, expressa em CI_{50} em $\mu\text{mol L}^{-1}$ dos 109 compostos em relação às linhagens de células de câncer.

Tabela 22: Coeficiente de partição e parâmetros eletródicos das substâncias 110 da série **2**.

Tabela 23: Atividade Citotóxica expressa em CI_{50} em $\mu\text{mol L}^{-1}$ do composto 5 112 e controle positivo (DOX) (linhagem celular HL-60) em um tempo de 24 horas.

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOH	Ácido acético
ANOVA	Analysys of Variance (Análise de variância)
BE/LA	Brometo de etídio / laranja de acridina
BrdU	Bromodeoxiuridina
CI ₅₀	Concentração inibitória média
CO ₂	Dióxido de carbono (gás carbônico)
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Dox	Doxorrubicina
dsDNA	Ácido Desoxirribonucléico em fita dupla (ou dupla hélice)
<i>e</i>	elétron
<i>E</i> ⁰	Potencial Formal
<i>E</i> _{ap}	Potencial Aplicado
ENH	Eletrodo Normal de Hidrogênio
<i>E</i> _{p1/2}	Potencial a meia altura de onda
<i>E</i> _{pa}	Potencial de Pico Anódico
<i>E</i> _{pc}	Potencial de Pico Catódico
<i>E</i> _{redox}	Potencial Redox
ERN	Espécie Reativa de Nitrogênio
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
ESC	Eletrodo Saturado de Calomelano
ESR	Espectroscopia de Spin do Elétron = RSE (ressonância de spin de <i>e</i>)
EtOH	Etanol
<i>E</i> _λ	Potencial de corte
<i>g</i>	Fator Giromagnético
H/E	Hematoxilina/Eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HFCC	Constante de Acoplamento Hiperfina
HOMO	(Highest Occupied Molecular Orbital) Orbital Molecular Ocupado de

	Mais Alta Energia
I	Força Iônica
IC	Intervalo de confiança
INCA	Instituto Nacional do Câncer
i_{pa}	Corrente de Pico Anódica
i_{pc}	Corrente de Pico Catódica
Log P	Coeficiente de partição
LUMO	(Lowest Unoccupied Molecular Orbital) Orbital Molecular Desocupado de Mais Baixa Energia
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolina Bromido
n	Número de elétrons
NaOAc	Acetato de sódio
Ox	Espécie Oxidada
PBS	Phosphate buffer solution (Tampão fosfato)
PBS	Phosphate buffer solution (Tampão fosfato)
pH	Potencial hidrogeniônico
r	Coeficiente de correlação linear
Red	Espécie Reduzida
Rpm	Rotações por minuto
SOD	Superóxido Dismutase
ssDNA	Ácido Desoxirribonucléico em fita simples (ou simples hélice)
TBAP	Perclorato de tetrabutilamônio
TBS	Tris buffer solution (Tampão de tris)
TE	Transferência eletrônica
US-NCI	United States National Cancer Institute (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos)
VC	Voltametria Cíclica
VOQ	Voltametria de Onda Quadrada
VPD	Voltametria de Pulso Diferencial
v	Velocidade de Varredura
η	Sobrepotencial

RESUMO

O câncer é uma das doenças que mais causam temor na sociedade, devido ao seu potencial de morbidade e mortalidade, seu grande impacto econômico em saúde pública e, em todos os setores produtivos. O desenvolvimento de novos fármacos anticâncer é necessário e urgente. Estudos farmacoeletrouímicos constituem ferramentas importantes em química farmacêutica, farmacologia e biomedicina. No presente trabalho, avaliou-se o potencial citotóxico da nitroquinona 2,2-dimetil-3-(3-nitrofenilamino)-2,3-di-hidronafto[1,2-b]furan-4,5-diona, por meio de métodos farmacológicos e eletroquímicos, visando à elucidação de seu mecanismo de redução e de ação citotóxica. Investigou-se, adicionalmente, o comportamento eletroquímico e citotóxico de naftoquinonas [1,2,3]-triazólicas citotóxicas, com o intuito de determinar seus potenciais de redução para avaliar a possibilidade de correlação com a atividade biológica. Foram realizados estudos eletroquímicos em meio aprótico (DMSO/TBAP e Acetonitrila/TBABF₄) e prótico (tampão acetato pH 4,5). A nitroquinona foi investigada detalhadamente quanto à citotoxicidade, à genotoxicidade, na avaliação de modificações morfológicas celulares, aspectos de imunomodulação, empregando biossensores de DNA e citometria de fluxo, com o intuito de propor o mecanismo de ação farmacológica da atividade antitumoral. Ela não se mostrou genotóxica e seu mecanismo de ação envolve a via apoptótica, dependente da mitocôndria. Todas as quinonas heterocíclicas apresentam comportamento eletroquímico típico de quinonas bem comportadas, em meio aprótico e prótico. O anel triazólico funcionou como um grupo altamente eletroatraente, deslocando positivamente os processos de redução desses compostos. A nitroquinona possui comportamento eletroquímico híbrido devido à presença de dois grupos eletroativos na molécula. A análise por ESR definiu o mecanismo de redução desta substância. Os potenciais de redução catódicos (*E*_{plc}) das duas séries de substâncias não estão diretamente relacionados às atividades farmacológicas dos compostos. Os valores de Log P correlacionam-se melhor com as atividades citotóxicas. As acridinas, estudadas em biossensor de DNA e em presença de ssDNA, mostram interação direta com o DNA. A adaptação da metodologia do biossensor de DNA possibilitou o estudo dessas substâncias (insolúveis) em ssDNA, demonstrando a contribuição da farmacoeletrouímica na descoberta do mecanismo de ação de fármacos.

ABSTRACT

Cancer is one of the most dreadful diseases due to its figure of morbidity and mortality and its strong social and economic impact in public healthy. The development of new chemotherapics is urgently required. Pharmoelectrochemical studies are important tools in pharmaceutical chemistry, pharmacology and biomedicine. In the present work, the cytotoxic activity of the nitroquinone 2,2-dimethyl-3-(3-nitrophenylamine)-2,3-dihydronaphtho[1,2-b]furan-4,5-dione, was performed, using electrochemical and pharmacological methods, in order to elucidate its mechanism of reduction and biological action. Additionally, electrochemical behaviour of cytotoxic arylamine and [1,2,3] triazolic naphthoquinones was investigated, in order to obtain reduction potentials, to correlate them with their biological activity. Studies were undertaken in aprotic medium (DMSO/TBAP and Acetonitrile/TBAPF₄) and protic medium (acetate buffer pH 4.5). The nitroquinone was further investigated, concerning its cytotoxicity, genotoxicity, cells morphological modification and immunomodulation effects in its presence, using, for that, dsDNA biosensors and flow cytometry, with the main goal of proposing its pharmacological mechanism of antitumour action. The nitroquinone is not genotoxic and it caused apoptosis, by an intrinsic (mitochondrial) pathway. The electrochemical behaviour of all the quinones, in aprotic and protic media, are typical of well-behaved quinones. The triazole ring worked as a highly electronwithdrawing group, shifting positively all the redox potentials. The nitroquinone has hybrid electrochemical behaviour due to the presence of two eletroactive groups in the molecule. The analysis by ESR allowed the definition of its reduction mechanism. Reduction potential values (E_{plc}) of the two sets of substances are not directly related to the pharmacological activities of the compounds. Log P values showed better correlation with the biological activity. With the aid of dsDNA biosensor, and ssDNA in a modified electrode, it was possible to analyse the positive and direct interaction of acridines with DNA. The adaptation of the methodology of ssDNA, enabling the study of these (insoluble) substances in ssDNA, demonstrated the contribution of pharmoelectrochemistry to the discovery of the mechanism of action of drugs.

Introdução

I – Introdução

I.1 – Eletroquímica em Química Medicinal

Os estudos que envolvem a transferência de elétrons são importantes para a compreensão de vários processos que ocorrem no meio biológico, auxiliando, assim, o desenvolvimento das áreas químico-farmacêutica, farmacológica, toxicológica e biomédica, em geral. Muitos dos mais importantes processos em célula viva, desde seu metabolismo até sua defesa, envolvem processos de oxidação e redução. Os mais importantes processos fisiológicos são governados ou estimulados por cadeias oxidorreduativas, como por exemplo, a cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias e o processo de neurotransmissão. As enzimas redox, que catalisam os processos de oxidação e redução, são onipresentes nos organismos vivos. Estes processos necessitam de um ambiente redox finamente ajustado, de maneira a realizar, eficientemente, sua função. Esse ambiente redox é mantido por um complexo grupo de proteínas, peptídeos e genes e é baseado em uma série de transformações redox e não-redox, catalisadas enzimaticamente, ou não, e envolvem transferências de elétrons e de átomos (Fry *et al.*, 2006; Schaffer *et al.*, 2001). Qualquer mudança nesse delicado equilíbrio pode causar alteração na homeostase celular ou em outros ambientes.

A Eletroquímica é o método padrão para o estudo das reações redox e a literatura fornece farto material sobre o uso de técnicas eletroquímicas com aplicação em biologia (Hillard *et al.*, 2008). Existe um conjunto de similaridades entre as reações biológicas e as eletroquímicas, como: a natureza heterogênea (interface eletrodo-solução, enzima insolúvel-solução); os processos podem ocorrer tanto em meio aquoso, quanto não-aquoso; em temperaturas similares; como também, ambos os processos requerem uma orientação específica dos substratos (Dryhurst *et al.*, 1977).

Os potenciais de redução ou de oxidação de algumas substâncias, obtidos por meio de técnicas eletroquímicas, podem fornecer informações sobre a viabilidade dos processos de transferência de elétrons (TE) *in vivo* ou *in vitro*.

Correlações já divulgadas na literatura entre E_{pc} (potencial de pico catódico), $E_{1/2}$ (potencial a meia altura de onda, principalmente em polarografia) 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 para colaborar com uma possível elucidação do mecanismo de ação de fármacos e no planejamento de compostos biologicamente ativos.

Há uma grande importância em mimetizar condições biológicas em meios não celulares, entretanto esta não é uma tarefa fácil, devido à grande diversidade encontrada nos ambientes celulares e extracelulares. Por exemplo, todas as células possuem regiões hidrofílicas (citoplasmas e interstício) ou lipofílicas (membranas, retículo endoplasmático, sítios ativos enzimáticos), portanto, os estudos dos processos redox devem ser realizados em meio aprótico, similar a sistemas lipofílicos, ou prótico, para imitar ambientes hidrofílicos, o que simula situações em vários fluidos biológicos. O meio misto ou micelar pode também ser utilizado (Bollo *et al.*, 2001; Maya *et al.*, 2003). Um outro fator importante relaciona-se ao conteúdo de O_2 da célula e sua participação em rotas metabólicas alternativas ou laterais; outro fator é o valor do pH do meio. Todos esses fatores devem ser considerados na tentativa de mimetizar ambientes biológicos (De Abreu *et al.*, 2002; Hillard *et al.*, 2008).

O comportamento eletroquímico de determinada classe de substâncias, pode ser completamente distinto, pelo fato de que mudanças estruturais afetam curvas voltamétricas de diferentes maneiras. Elas podem causar deslocamentos nos potenciais redox, ocasionar 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, pode prever propriedades redox, de um grupo bem mais amplo de compostos (Zuman *et al.*, 1967).

Em termos qualitativos, a presença de substituintes eletrodoadores dificulta o processo de redução e grupos eletrorretiradores facilitam este processo. Sabe-se

que os substituintes eletrorretiradores diminuem a energia do LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital – Orbital Molecular Ocupado de Mais Baixa Energia), facilitando assim a transferência de elétrons do eletrodo para a substância eletroativa, em um processo de redução. No caso de substituintes eletrodoadores, o processo acontece de forma inversa, há um aumento da energia do LUMO, o que dificulta o processo de transferência de elétrons para esse orbital. No caso de uma oxidação, que envolve o HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital – Orbital Molecular Ocupado de Mais Alta Energia), os substituintes influenciam a reação eletródica na direção oposta, pois, substituintes eletrodoadores facilitam o processo de oxidação, por aumentar a densidade eletrônica no orbital, enquanto grupos eletrorretiradores o dificultam. (Zuman *et al.*, 1967).

Em termos eletroquímicos relacionados aos aspectos biomédicos, um dos mais importantes processos a serem estudados, relaciona-se ao dueto Transferência de elétrons-Estresse Oxidativo (TE-EO) (Kovacic *et al.*, 2000). A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas, é parte integrante do metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas. ERO e ERN têm importante função biológica, como na fagocitose, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor. Por outro lado, quando sua produção é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. O desbalanço redox resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, com predomínio dos oxidantes (Valko *et al.*, 2007).

A alquilação biorredutiva é outro processo redox relacionado aos mecanismos principais e descreve o efeito de compostos, que expressam seu modo de ação farmacológica como agentes alquilantes, mas o fazem após sofrerem redução *in vivo*. A grande maioria dos agentes alquilantes empregados clinicamente são pró-fármacos e comportam-se como armadilhas eletrofílicas para nucleófilos moleculares ou endobióticos, após redução por enzimas (Fry *et al.*, 2006; Kovacic *et al.*, 2000; Rajski *et al.*, 1998; Sinhababu *et al.*, 1996).

Os dois mecanismos não são mutuamente exclusivos e podem ocorrer simultaneamente. A predominância de um sobre o outro depende do conteúdo de

oxigênio dos sistemas biológicos envolvidos, conforme demonstrado na figura 1 (Wardman *et al.*, 2001) e do ambiente redox celular (Fry *et al.*, 2006). Em células cancerosas, o balanço redox celular pode estar 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. 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).

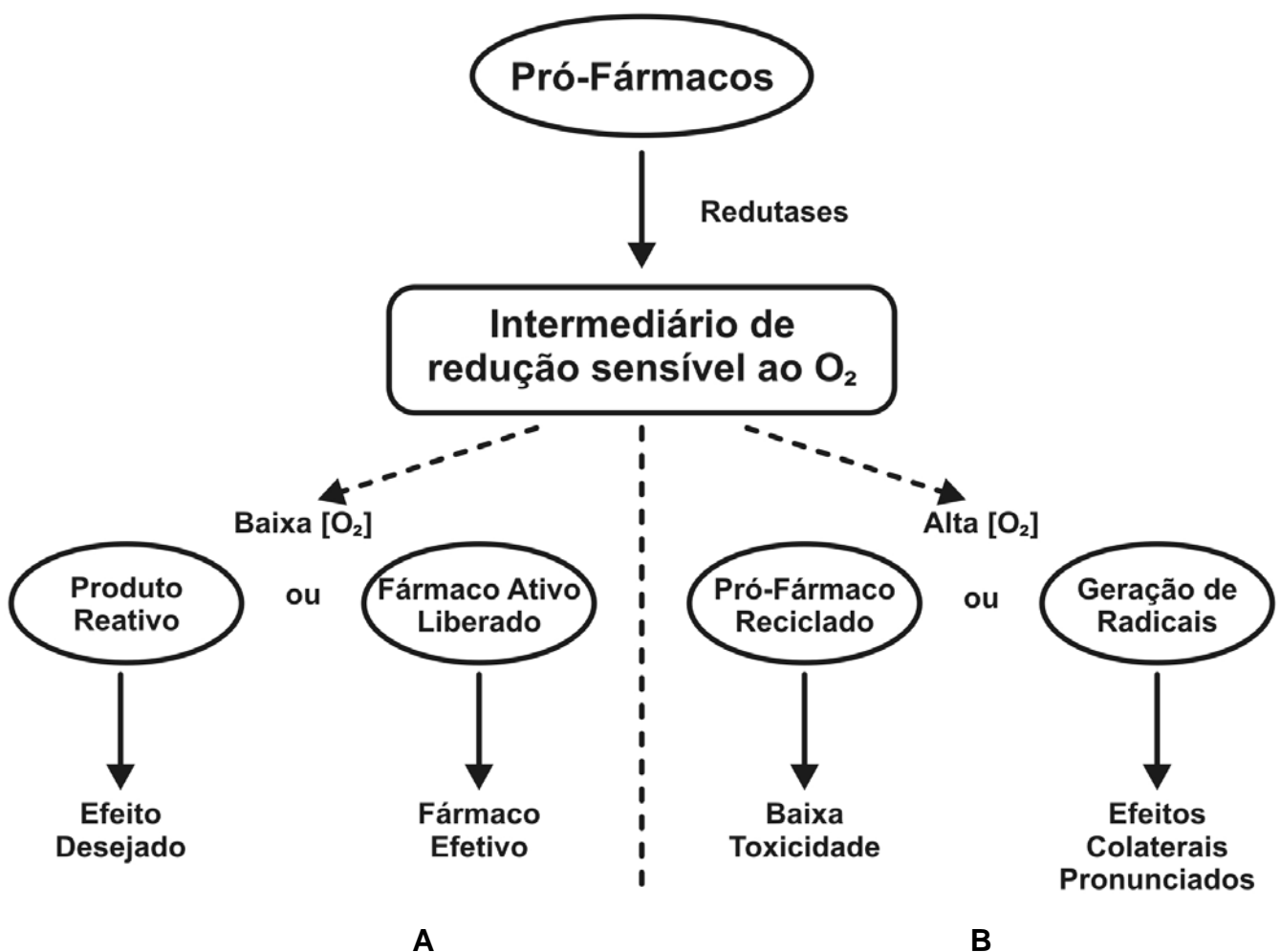


Figura 1: Representação esquemática de mecanismos pelos quais pró-fármacos ativados por biorredução exercem suas atividades farmacológicas. A: Ativação seletiva em hipóxia; B: Ativação em condições normóxicas, geração do Estresse Oxidativo. Adaptado de Wardman *et al.*, 2001.

Uma ampla variedade de moléculas (naturais ou sintéticas) tem a capacidade de, após TE, gerar espécies oxigenadas tóxicas, em profusão (O_2^{\bullet} , H_2O_2 , HO^{\bullet}), fenômeno responsável pelo estresse oxidativo (EO), ou se comportar como agentes alquilantes do DNA ou de outras macromoléculas fisiologicamente importantes. Podemos observar muitos destes comportamentos em relação às quinonas.

Um número significativo de substâncias fisiologicamente ativas mostra valor de $E_{1/2}$, mais positivo do que $-0,5$ V vs. ENH (Eletrodo Normal de Hidrogênio), em faixa de potencial ótima para permitir captura eletrônica a partir de doadores biológicos, principalmente enzimas, ou, pode sofrer modificações metabólicas, fornecendo derivados facilmente redutíveis (Kovacic *et al.*, 2000^A, Kovacic *et al.*, 2000^B). Uma atividade ótima, relacionada à geração do estresse oxidativo, pode ser alcançada quando o potencial de redução monoelétrica da substância se situa na faixa intermediária entre a faixa dos redutores celulares (cerca de $-0,4$ V vs. ENH) e quando da reação O_2/O_2^{\bullet} em cerca de $-0,2$ V vs. ENH (em pH fisiológicos ~ 7), embora essa faixa possa se estender ligeiramente por efeitos Nernstianos de concentração ou por efeitos cinéticos de rápida re-oxidação dos íons-radicaís intermediários.

Para facilitar a compreensão, a equação de Nernst, que define a razão entre as concentrações do oxidante (Ox) e do redutor (Red), no equilíbrio de uma reação redox com potencial padrão E^0 é, aqui, apresentada:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{[Ox]}{[Red]} \right)_{equil} \quad \text{Eq. 1}$$

onde n é o número de elétrons transferidos na reação redox ($Ox + ne^- \Leftrightarrow Red$), F é o valor do Faraday (ca. 95,600 coulombs/mole), R é a constante dos gases e T , a temperatura absoluta. O potencial padrão é definido, quando $[Ox] = [Red]$, no equilíbrio, em condições termodinâmicas-padrão.

A figura 2 apresenta alguns valores de E_{pc} e E_{pa} de moléculas endógenas que participam de processos fisiológicos, como também de alguns fármacos, em comparação com os valores dos potenciais de redução dos mais importantes cofatores de enzimas redox, e aquele do oxigênio molecular (Livertoux *et al.*, 1996).

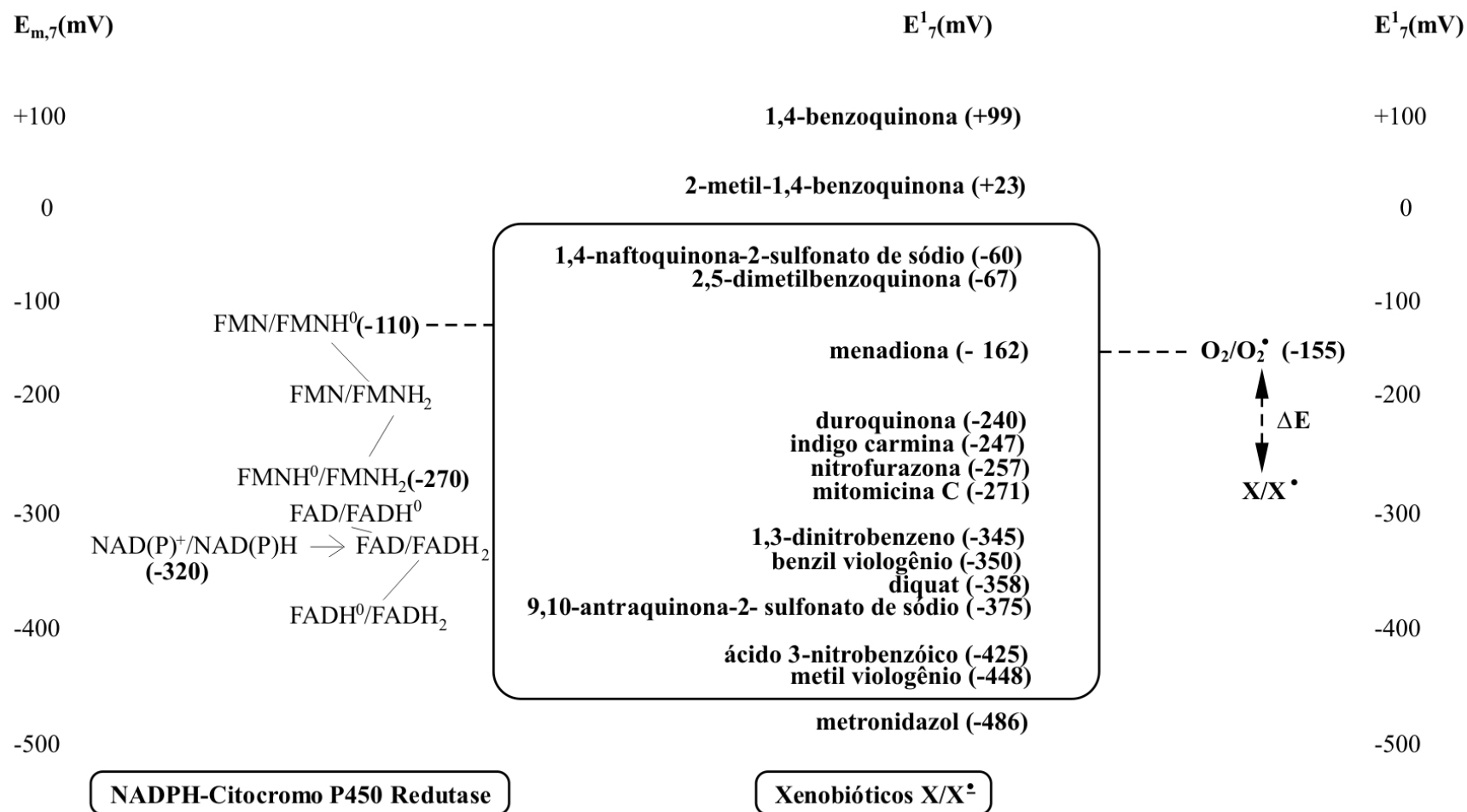
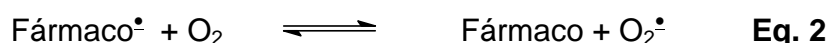


Figura 2: Potenciais redox (pH 7,0) da redutase NADPH-citocromo P-450 (FAD-FMN, E_{m,7}) e potenciais de redução monoelétrônicos de xenobióticos (E¹₇). Os valores para as enzimas foram determinados por Iyanagi e colaboradores e os dos produtos químicos são valores da literatura. Adaptado de Livertoux *et al.*, 1996.

No caso de pró-fármacos, após a redução, há de se considerar a reação com O_2 , gerando O_2^{\bullet} (Figura 1, página 4), com potenciais de redução dependentes do conteúdo de oxigênio ($E \sim -0,18$ V (se $[O_2] = 1$ mol L^{-1}) ou $\sim -0,35$ V (se $pO_2 = 1$ atm) vs. ENH (Wardman *et al.*, 1989). Quando se trata de fármacos geradores do estresse oxidativo (Figura 1B), os potenciais de redução monoelétrica controlam a posição do equilíbrio (Equação 2).



Considerando-se a constante de equilíbrio para a equação 1 como $K_1 = 10^{\Delta E/0,06}$, aproximadamente, para $K_1 > 1$, teríamos $E(\text{fármaco}/\text{fármaco}^{\bullet}) < -0,2$ V vs. ENH, sendo o processo TE-EO desfavorecido em potenciais mais positivos, embora possa ocorrer, em caso de consumo de O_2^{\bullet} , pela presença, por exemplo de SOD (superóxido dismutase) (Wardman *et al.*, 2001). Daí, supondo o potencial de redução mínimo necessário para ativação de flavoproteínas (Figura 3) e o potencial máximo de proteção contra redução do oxigênio, o potencial de redução necessário para uso em terapias redox (como por exemplo na Figura 1) estaria na região de potencial entre $-0,5$ V a $-0,1$ V (vs ENH, em água, em pH 7), ou de $-0,230$ V a $-0,700$ V vs. ESC (Wardman *et al.*, 2001; Livertoux *et al.*, 1996).

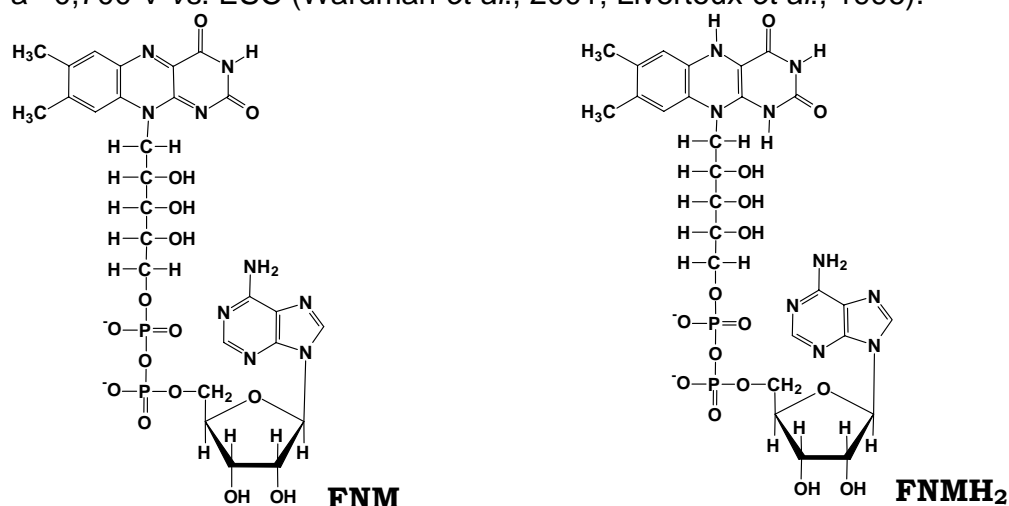


Figura 3: Estrutura das flavoproteínas FMN (forma oxidada) e FMNH₂ (reduzida).

Estudos semelhantes em meio aprótico são realizados. Esses ensaios mostram-se relevantes, como no caso da NADPH-Citocromo P-450 redutase e muitos outros, pois os ambientes das membranas biológicas são tanto polares como lipofílicos, uma vez que a flavoproteína encontra-se ancorada na dupla camada fosfolipídica do retículo endoplasmático via peptídeo amino-terminal hidrofóbico e encontra-se exposta na face citoplasmática desse sistema de membrana. Os potenciais de redução medidos em meio aprótico são, de modo geral e em relação ao meio aquoso, mais negativos. Meios próticos permitem a transferência de prótons aos intermediários eletrogerados, estabilizando-os, facilitando, portanto, o processo de redução. Os valores anteriormente estabelecidos para meio aquoso assumem valores mais negativos, em meio aprótico, na faixa útil de $E_{\text{redox}} = -0,700$ a $-1,100$ V vs. ECS (eletrodo de calomelano saturado) (Livertoux *et al.*, 1996).

Os aspectos exclusivamente termodinâmicos não são, na maioria das vezes, suficientes, para a compreensão da atividade farmacológica de fármacos. Aspectos cinéticos revelam-se extremamente importantes na liberação de fármacos ativos ou na geração do estresse oxidativo nos sítios-alvo. Moléculas com baixa afinidade eletrônica (potenciais de redução mais negativos) são ativadas inadequadamente por enzimas, enquanto moléculas facilmente redutíveis podem ser rapidamente metabolizadas ou excretadas ou ainda ativadas fora do alvo (Kelson *et al.*, 1998). O potencial de redução do fármaco (que pode controlar a rapidez de reação) pode influenciar quanto a atividade do fármaco (Wardman *et al.*, 2001; Iyanagi *et al.*, 1974). A equação 3 correlaciona a dependência entre os parâmetros cinéticos e os termodinâmicos (Wardman *et al.*, 2001).

$$\text{Log (velocidade de redução)} = \text{constante} + (\text{dependência redox} \times E_p) \quad \text{Eq. 3}$$

A velocidade de redução é a constante de velocidade ou parâmetros tais como a V_{max}/K_m (razão de Michaelis) ou k_{cat}/K_m (Céna *et al.*, 1994). Valores típicos para a dependência redox encontram-se na faixa ~ 11 a 15 V^{-1} . Esses valores indicam um aumento da velocidade de redução de um fator de cerca de 12 a 30 vezes para uma variação de potencial de 0,1 V. (Adams *et al.*, 1976).

As investigações, em relação aos processos redox, são realizadas em sistemas não aquosos, mimetizando situações em sistemas lipofílicos, como, por exemplo, em membranas biológicas ou, em meios aquosos, correspondendo a situações na maioria dos fluidos biológicos (De Abreu *et al.*, 2002). O número de elétrons transferidos nas diversas situações é diferente, assim como o mecanismo eletródico.

Um exemplo das complicações decorrentes de processos redox e que justifica a necessidade de estudos constantes e sistemáticos, refere-se às quinonas. O potencial de redução para a captura monoelétrica, para formar uma semiquinona (Q^{\bullet}) é geralmente bem diferente daquele para a redução envolvendo dois ou mais elétrons. Daí, o potencial $E(Q/Q^{\bullet})$ é distinto do $E(Q, 2H^+/QH_2)$. Semiquinonas sofrem desproporcionamento rápido para QH_2 e Q , daí, é mais fácil medir $E(Q/QH_2)$ do que potenciais de duplas (oxidante/redutor) que envolvem intermediários instáveis. Esses últimos podem ser medidos utilizando-se técnicas eletroquímicas ultra-rápidas (Wardman *et al.*, 2001).

Um problema adicional envolve o uso de diferentes eletrodos de referência: ENH, ECS, Ag|AgCl. Nesse caso é possível fazer a interconversão entre os eletrodos de referência, conforme ilustrado na tabela 1. Os valores listados nas respectivas colunas são adicionados aos valores medidos de E_p . A melhor estratégia é realizar estudos eletroquímicos em diferentes meios, inclusive meios mistos (geralmente compostos por dois solventes) e em condições micelares e incluir um padrão interno nos experimentos eletroquímicos, no caso, o ferroceno (para meio aprótico). Este deve ser adicionado ao final do experimento. Deve-se ressaltar, no entanto, que os desvios em potencial, em uma série de compostos estruturalmente relacionados, medidos nas mesmas condições e em relação a um

dados eletrodo de referência, apresentarão sempre a mesma tendência em outro sistema de solventes (Wardman *et al.*, 1990; Wardman *et al.*, 2001).

Tabela 1: Relação entre os potenciais dos eletrodos de referência em meio aquoso e meio aprótico.

	DMF/TBAP			Meio aquoso tamponado		
	ENH	Ag AgCl	ESC	ENH	Ag AgCl	ESC
ENH	—	0,216 V	0,176 0,183 V	—	0,197 V	0,242 V
Ag AgCl	-0,216 V	—	-0,040	-0,197 V	—	-0,045 V

*(Fc⁺/Fc) 0.41 V vs SCE (Gritzner *et al.*, 1984)

Partindo do princípio da relevância sobre o conhecimento dos potenciais redox de substâncias eletroativas com atividades biológicas em potencial, sabe-se que dentre as classes principais de grupos farmacofóricos e eletroquimicamente ativos, destacam-se as quinonas (ou seus precursores fenólicos) e seus análogos, como quinonametídeos e quinonaiminas e, assim como as quinonas, também podem encaixar-se nesta denominação, os compostos nitroaromáticos. As atividades farmacológicas e toxicológicas advêm das propriedades redox, diretamente ou após metabolismo (Monks *et al.*, 2002). A atuação de quinonas em câncer e sua correlação com parâmetros eletroquímicos foram revisadas por diversos pesquisadores (Fry *et al.*, 2006; Kovacic *et al.*, 2000^A; Kovacic *et al.*, 2000^B; Asche *et al.*, 2006). Dependendo do grupo funcional farmacofórico, há diferenças: os potenciais de redução de quinonas farmacologicamente ativas são, de modo geral, mais positivos (menos negativos) que o de nitrocompostos e os de sais de imínio (Figura 2, página 6) (Livertoux *et al.*, 1996).

Para os estudos dos parâmetros eletródicos, em muitos casos há necessidade de técnicas adicionais às eletroquímicas. Essas podem ser usadas concomitantemente ou alternativamente, como por exemplo experimentos de

Ressonância de Spin do Elétron os quais auxiliam na definição estrutural e na medida do tempo de vida de radicais eletrogerados (Goldberg *et al.*, 1996).

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. A ESR foi descoberta pelo Físico russo Zavoiski, em 1945. Ela tem uma ampla gama de aplicações em química, física, biologia, e ciências médicas em geral. É usada para mapear a distribuição de um elétron desemparelhado em uma molécula, fornecendo várias informações sobre os níveis de energia. Resumidamente, ela permite determinar a presença e a estrutura de radicais eletrogerados. Pode comprovar a estrutura estática de sistemas sólidos e líquidos e é também muito utilizada no estudo de processos dinâmicos (Weil *et al.*, 1994). Apresenta grande aplicabilidade e é de extrema importância para definições mecanísticas em eletroquímica, como por exemplo no trabalho de Itoh e colaboradores, no qual foi caracterizada a formação do ânion radical semiquinônico da coenzima PQQ, em meio aprótico (Itoh *et al.*, 1998), como também no trabalho de Frontana & González. (2007), onde foram estudados os efeitos da estrutura molecular em relação aos parâmetros eletroquímicos de α -hidroquinonas por meio de estudos espectroeletróquímicos (ESR) (Frontana & González, 2007).

I.2 – Câncer

O câncer é uma das doenças que mais causam temor na sociedade, pelo fato de ter se tornado um estigma de mortalidade e dor. Na verdade, a palavra câncer é de origem latina (*cancer*) e significa “caranguejo”. Esta denominação foi, provavelmente, empregada em analogia ao modo de crescimento infiltrante do tumor, que pode ser comparado às pernas do crustáceo, que as introduz na areia ou lama para se fixar e dificultar sua remoção (Almeida *et al.*, 2005).

Atualmente, a definição científica de câncer refere-se ao termo neoplasia, especificamente aos tumores malignos, como sendo uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células (Almeida *et al.*, 2005).

Existem quase 200 tipos de câncer correspondentes aos vários sistemas de células do corpo, os quais se diferenciam pela capacidade de invadir tecidos e órgãos, vizinhos ou distantes. Estatisticamente, em pesquisa realizada pela Organização Mundial da Saúde, o câncer é a terceira causa de óbitos no mundo com 12%, matando cerca de 6 milhões de pessoas por ano. Atualmente, é a segunda causa de mortes por doença no Brasil (INCA, 2008) (Figura 4).

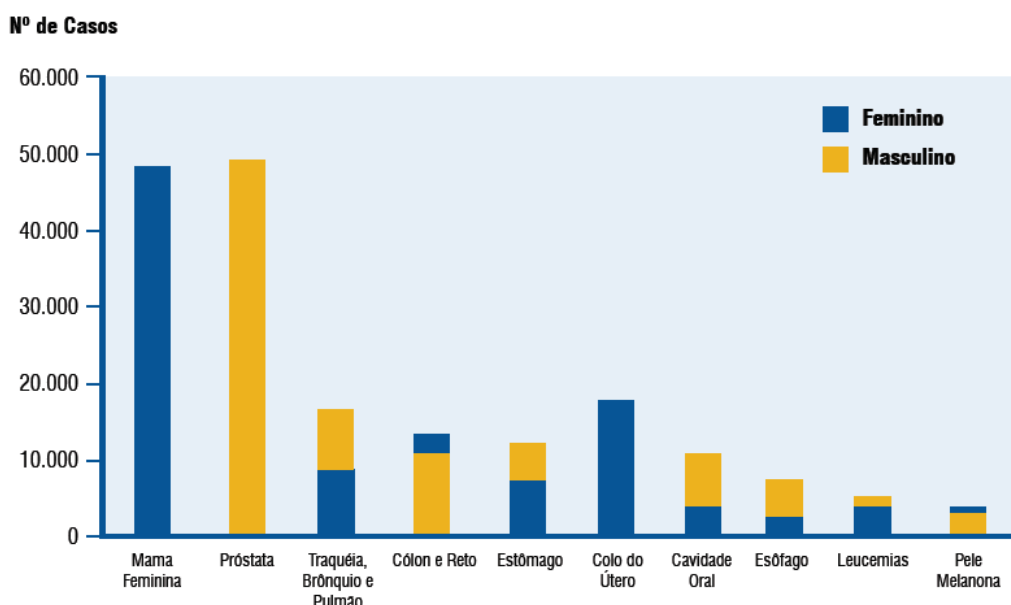


Figura 4. Tipos de câncer mais incidentes, estimados para 2008, na população brasileira, exceto câncer de pele não-melanoma (INCA, 2008).

As células cancerosas são, geralmente, menos especializadas nas suas funções à medida que substituem as células normais, esta característica é chamada de desdiferenciação e geralmente é seguida de infiltração, tendo como resultado, as metástases (INCA, 2008).

A mais antiga evidência de câncer data de 8.000 a.C. O tipo mais comum de neoplasia encontrada em fósseis, e ainda assim raramente, é o osteossarcoma, um câncer ósseo. As primeiras descrições de tumores foram

encontradas em papiros do Egito, e datam de 1.600 a.C. Existem também documentos na Índia, de 600 a.C., que descrevem lesões na cavidade bucal parecidas com câncer (Eggers, 2002).

As causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo e, geralmente, ambas estão inter-relacionadas. Entende-se por ambiente, o meio em geral (água, terra e ar), o ambiente ocupacional (quando insalubre), o ambiente social e cultural (estilo e hábitos de vida) e o ambiente de consumo (alimentos, medicamentos). As mudanças provocadas no meio ambiente pelo próprio homem, os hábitos e estilos de vida adotados pelas pessoas podem determinar os diferentes tipos de câncer. As causas internas, na maioria das vezes geneticamente pré-determinadas, estão ligadas à capacidade do organismo defender-se das agressões externas (INCA, 2008). Como por exemplo, os fatores genéticos, tais como: mutações espontâneas, diferenças herdadas de genes envolvidos com a proliferação celular, apoptose e/ou sistema de reparo do material genético, ou ainda alterações somáticas na expressão destes genes, entre outros, agem em conjunto com os fatores ambientais e com a susceptibilidade para o desenvolvimento do câncer (Perera *et al.*, 1997).

Em última instância, pode-se afirmar que o câncer é uma doença genética onde há um acúmulo de mutações principalmente nos proto-oncogenes e nos genes supressores de tumor (Foster *et al.*, 2008). Essas alterações simultâneas ocorrem, geralmente, em genes relacionados à proliferação, diferenciação e morte celular. Dentre as evidências experimentais que corroboram esta teoria está o fato de que a célula cancerosa é capaz de transmitir as suas características fenotípicas às células “filhas” em sucessivos ciclos celulares (Balmain *et al.*, 2003). O processo de oncogênese resultante dessas alterações culmina com o crescimento de sucessivas populações ou clones celulares, nos quais as mutações se acumularam em um processo denominado expansão clonal (Silva *et al.*, 2004). A figura 5 mostra esquematicamente como esse processo ocorre.

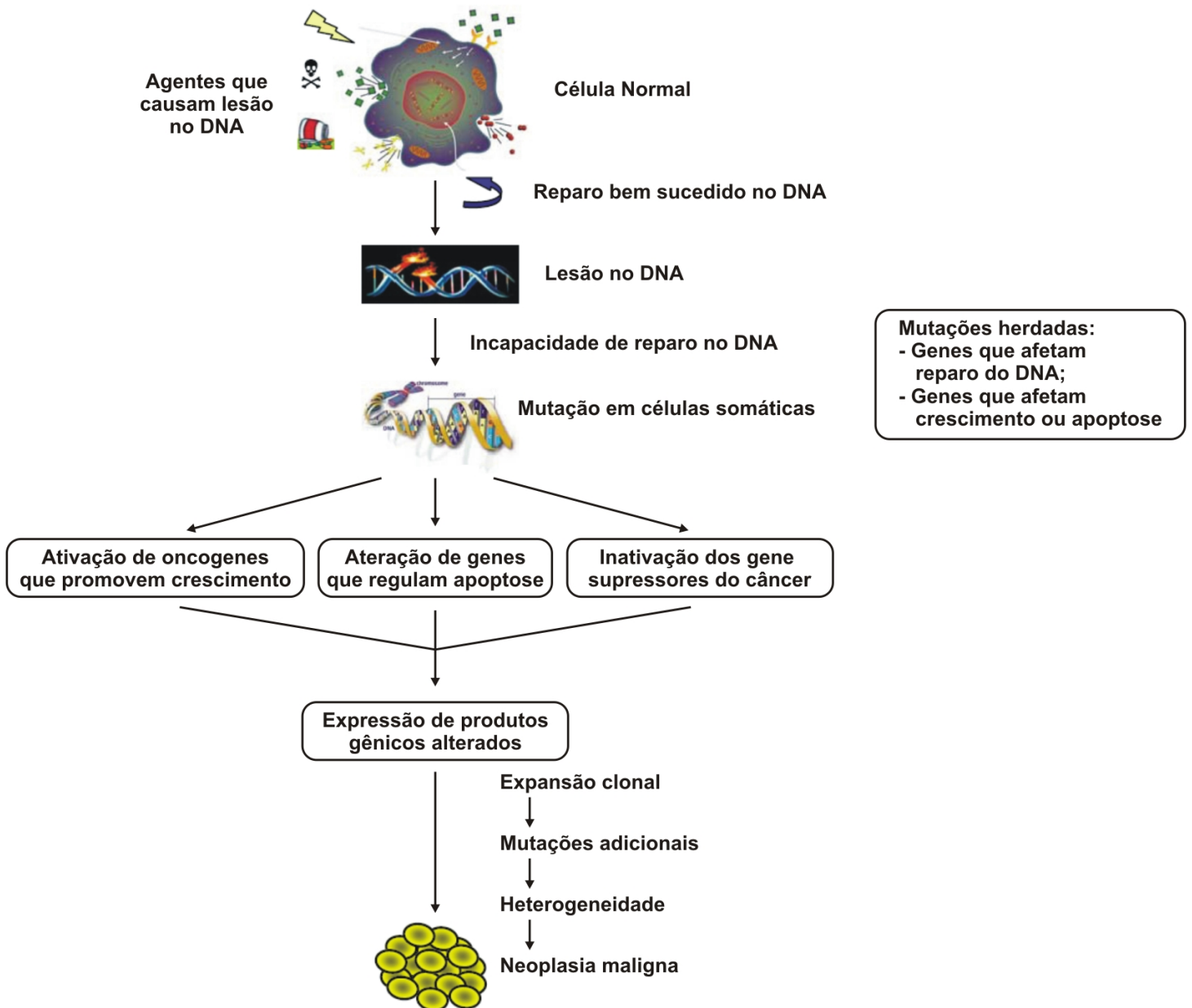


Figura 5: Esquema das bases moleculares da formação do câncer. Adaptado de Silva *et al.*, 2004.

Em geral as células seguem por uma seqüência de eventos governada por fatores internos e externos, chamada de ciclo celular. O ciclo celular permite às células normais (como também às células malignas) crescerem e se dividirem. O estímulo para o crescimento começa com a liberação de fatores de crescimento, os quais se ligam aos receptores na membrana das células e desencadeiam a liberação de fatores de transcrição. Essa seqüência de eventos impulsiona a célula pelo ciclo celular (Foster *et al.*, 2008). As células que irão se replicar, movem-se da fase *G0* (Célula em repouso) para a fase *G1*, na fase *G1* ocorre o crescimento celular, onde tem início a síntese de RNA e proteínas. Para as células normais, o balanço entre sinais proliferativos e de inibição da proliferação em *G1* irá determinar se o ciclo vai progredir para a fase *S*, onde se inicia a replicação ou síntese de DNA, que resulta na duplicação do conteúdo de DNA. A fase *S* é seguida por *G2*, onde as células se preparam para entrar em mitose (*M*) e se dividir em duas células idênticas. (Foster *et al.*, 2008; Louro *et al.*, 2002) conforme representado na Figura 6.

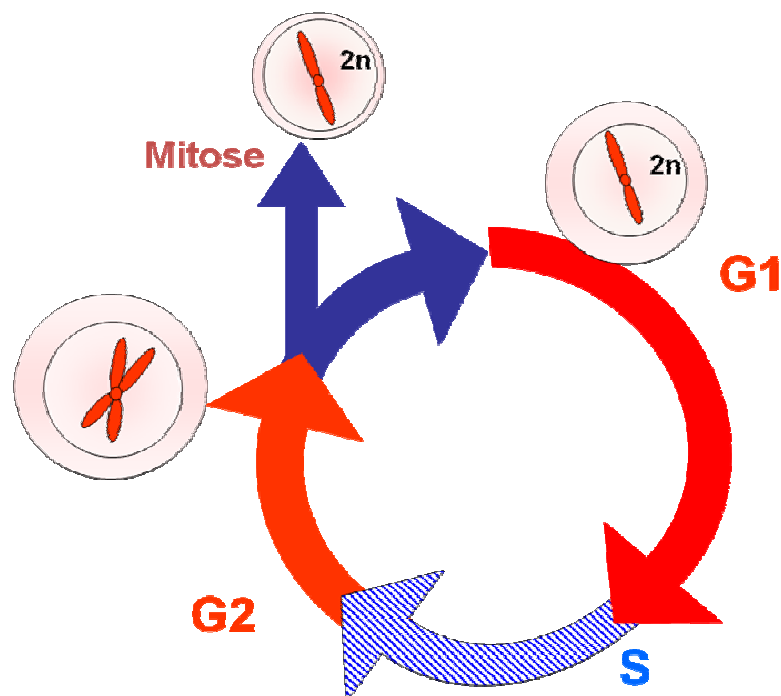


Figura 6: Representação do ciclo celular. Fases *G0/G1*, *S* e *G2* (Foster, 2007).

Os eventos descritos para o ciclo celular na figura 6, em especial, o balanço entre sinais proliferativos e de inibição da proliferação em *G1*, estão, geralmente, desordenados nas células malignas e, por exemplo, uma perda ou inativação dos genes supressores de tumor podem levar ao desenvolvimento do câncer. Como exemplo de genes supressores tumorais, pode-se citar um dos mais importantes, o TP53, o qual codifica o produto gênico P53. A perda ou mutação do TP53 está associada ao aumento de suscetibilidade ao câncer, justamente devido a uma diminuição da síntese da proteína p53 (Vousden *et al.*, 2007). Hipóxia, privação de nutrientes e dano direto ao DNA podem ativar o TP53, resultando em parada do ciclo celular, o que pode levar a dois caminhos: reparo do DNA ou morte celular por apoptose (Vidal *et al.*, 2000; Tyteca *et al.*, 2006).

A apoptose, de maneira geral, é um mecanismo de defesa para remover células infectadas, mutantes, supérfluas ou que sofreram algum dano, prevenindo processos patológicos como a imunodeficiência, a auto-reatividade imune e, principalmente, o câncer. Este tipo de morte celular é programado, desde a geração do tecido ou da célula, uma vez que a apoptose está diretamente associada a processos de embriogênese, morfogênese, metamorfose e reciclagem celular (Curi *et al.*, 2005).

A morte celular programada é caracterizada por uma série de alterações morfológicas nas células. Uma das primeiras alterações características do processo apoptótico é a condensação da cromatina em grandes massas granulares compactas que se ligam à carioteca. Ocorrem também diminuição do volume celular, aumento do tamanho de nucléolo com presença de grânulos pronunciados e dispersos, fragmentação do DNA e formação de protuberâncias na superfície celular (*blebs*), as quais se destacam e formam os corpos apoptóticos (que consistem em organelas celulares e/ou material nuclear envolvido pela membrana plasmática). A maioria das características morfológicas encontradas na apoptose é resultado da ativação de proteases denominadas caspases (Hengartner *et al.*, 2000). Todas as células contêm caspases, conforme pode ser visto na figura 7 e, em geral, estas estão na forma inativa (ou de pró-caspases) (Cruchten *et al.*, 2002).

As características moleculares e bioquímicas da apoptose podem ou não estar associadas às modificações morfológicas. Assim, embora alterações na mitocôndria, retículo endoplasmático e lisossomos, muitas vezes, não possam ser observados morfológicamente, estas organelas participam ativamente do processo apoptótico (Curi *et al.*, 2005).

A apoptose pode ser iniciada por duas vias básicas, conhecidas como intrínseca ou mitocondrial e extrínseca ou dos receptores de morte, conforme pode-se observar na figura 7. O mecanismo via receptor de membrana, em geral ativa a caspase-8 e o outro mecanismo, via mitocôndria, ativa a caspase-9. Ambos os mecanismos ativam a caspase-3, que é o executor da apoptose (Hengarter *et al.*, 2000; Cruchten *et al.*, 2002).

Para entender melhor este processo é importante saber que as caspases supracitadas são uma superfamília de proteínas, assim denominadas devido à definição proveniente do inglês *Cysteine Aspartate Proteases*. Objetivamente, elas são proteínas evolutivamente conservadas que possuem um resíduo de cisteína em seus sítios ativos, o qual é crítico para a atividade proteolítica sobre resíduos de ácido aspártico das proteínas-alvo. Filogeneticamente, as caspases são divididas em três superfamílias: iniciadoras ou desencadeantes (caspases 2, 8, 9 e 10); efetoras ou executoras (caspases 3, 6 e 7) e o terceiro grupo que possui função inflamatória (caspases 1, 4 e 5) (Curi *et al.*, 2005).

As caspases estão presentes nas células na forma de zimogênios. A maioria das pró-caspases são citosólicas, mas algumas também podem estar presentes no espaço intermembranas da mitocôndria (por exemplo, caspases 2, 3 e 9). O processamento das pró-caspases (figura 7) para atingir a forma ativa se dá por proteólise, mecanismo de controle mais rápido que a síntese de uma nova proteína ativa. Desta forma, a célula pode rapidamente disparar apoptose, diminuindo o risco de dano às células vizinhas (Curi *et al.*, 2005).

Conforme já descrito, a via intrínseca de ativação da apoptose (Figura 7) inicia-se na mitocôndria. Há várias teorias que tentam explicar como os mais variados agentes físicos, químicos ou biológicos (Ex.: estresse oxidativo, quimioterapia, radiação - Figura 7) podem convergir para a mitocôndria e disparar

a fase de iniciação do processo razoavelmente universal como a apoptose, através de segundos mensageiros pró-apoptóticos, entretanto, dentre todas as teorias, sabe-se que a despolarização da mitocôndria é um fator primordial para esta iniciação (Curi *et al.*, 2005).

A via extrínseca (Figura 7) ocorre pela ativação de caspases associadas à via de sinalização dos “receptores de morte”, estes receptores possuem domínios extracelulares ricos em cisteína e domínios citoplasmáticos de morte, estes últimos responsáveis pela formação do complexo sinalizador indutor de morte (*Death-Inducing Signaling Complex*). Os ligantes desses receptores são peptídios (Figura 7), com três sítios de ligação ao receptor, os quais, ao se ligarem, atuam como ativadores extracelulares de apoptose (Curi *et al.*, 2005).

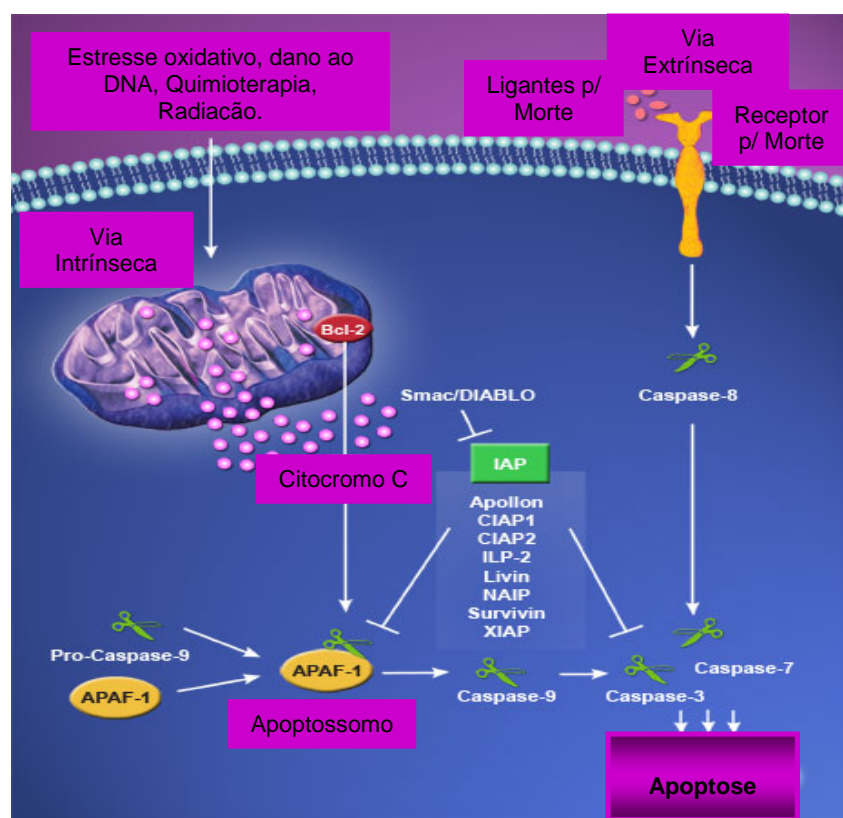


Figura 7: Esquema de indução das vias Intrínseca (mitocondrial) e Extrínseca (receptor de morte) da apoptose, por meio de indutores particulares para estas vias. Ativação final da caspase-3 e indução de morte celular programada. Adaptado de Hengarter *et al.*, 2000.

I.2.1 – Tratamento do Câncer e Epidemiologia.

Atualmente existem três tipos principais de tratamento clínico para o câncer: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Como o objetivo é sempre erradicar o câncer, utiliza-se, normalmente, mais de um tipo de tratamento associado. A massa tumoral originada a partir de um único clone celular é constituída por uma população de células heterogêneas, onde são identificadas diferentes sub-populações. As sub-populações de células diferem em relação a vários atributos fenotípicos, como cariótipo, responsividade hormonal e suscetibilidade a agentes antineoplásicos. Por exemplo, tumores com baixa fração de crescimento como o câncer de mama, de colo do útero e próstata possuem uma menor suscetibilidade à quimioterapia antineoplásica, como também, a ausência de antigenicidade das células proporciona uma maior resistência ao ataque imunológico (Kummar *et al.*, 2004).

No que diz respeito à quimioterapia, o objetivo primordial seria destruir as células neoplásicas malignas preservando as células normais, entretanto, sabe-se que os fármacos mais utilizados na clínica, em sua maioria, possuem um mecanismo de ação não específico, lesando células neoplásicas e normais e com isso, apresentam efeitos colaterais decorrentes da não-seletividade desses agentes, como exemplo: náuseas, perda de cabelo e susceptibilidade maior às infecções (Goodman & Gilman, 2003; Fuchs *et al.*, 2004; Rang & Dale, 2004). Esses efeitos colaterais severos decorrem do fato de que os fármacos antineoplásicos atuam farmacologicamente em células malignas, mas também, em células normais, principalmente as que apresentam em constante multiplicação, como por exemplo as células do trato gastrointestinal, células dos folículos pilosos ou as células de defesa.

Apesar das várias alternativas para tratamento do câncer, a mortalidade, em decorrência dessa patologia, continua absurdamente alta. No Brasil, segundo o Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), a incidência de neoplasias malignas (CID 10-032-052) para o ano de 2008 é de 466.730 casos novos (DATASUS, 2008), dentre estes são esperados 231.860

casos novos, para o sexo masculino, e 234.870 para o sexo feminino. Estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma (115 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (49 mil), de mama feminina (49 mil), de pulmão (27 mil), de cólon e reto (27 mil), de estômago (22 mil) e de colo do útero (19 mil). Estes dados que refletem uma alta incidência de câncer na população brasileira e são confirmados, uma vez que o câncer apresenta-se como a terceira causa de morte, precedido apenas pelas mortes ocasionadas por acidentes e pelas doenças cardiovasculares. Dados do INCA (Instituto do Câncer – Estimativas para o ano de 2002 e 2008, respectivamente) mostram como se comporta a distribuição dos casos de câncer no Brasil (Figuras 8a e 8b), e ainda, a comparação entre esses dados mostra como o incremento na estimativa para o número de casos, de 2002 até então, é assustador (Figuras 9a e 9b).

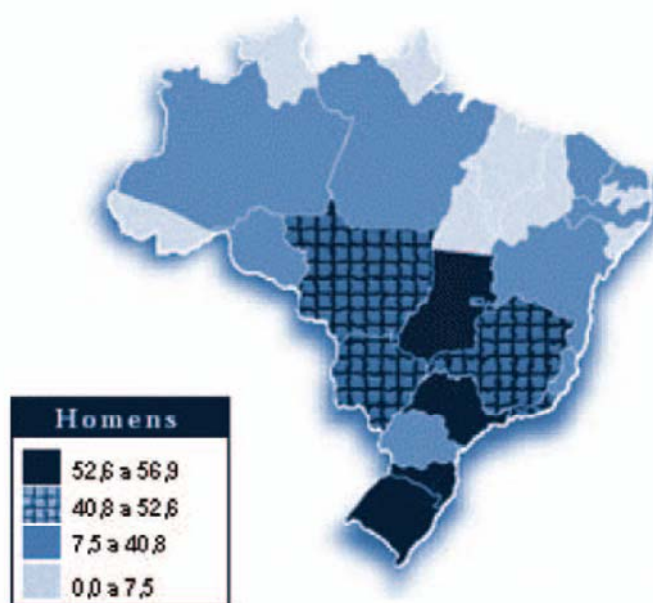


Figura 8a: Representação espacial das taxas de incidência por 100.000 homens estimadas para o ano de 2002, segundo a unidade da federação (todas as neoplasias, exceto pele não melanoma) (Almeida *et al.*, 2005).



Figura 8b: Representação espacial das taxas de incidência por 100.000 mulheres estimadas para o ano de 2002, segundo a unidade da federação (todas as neoplasias, exceto pele não melanoma) (Almeida *et al.*, 2005).

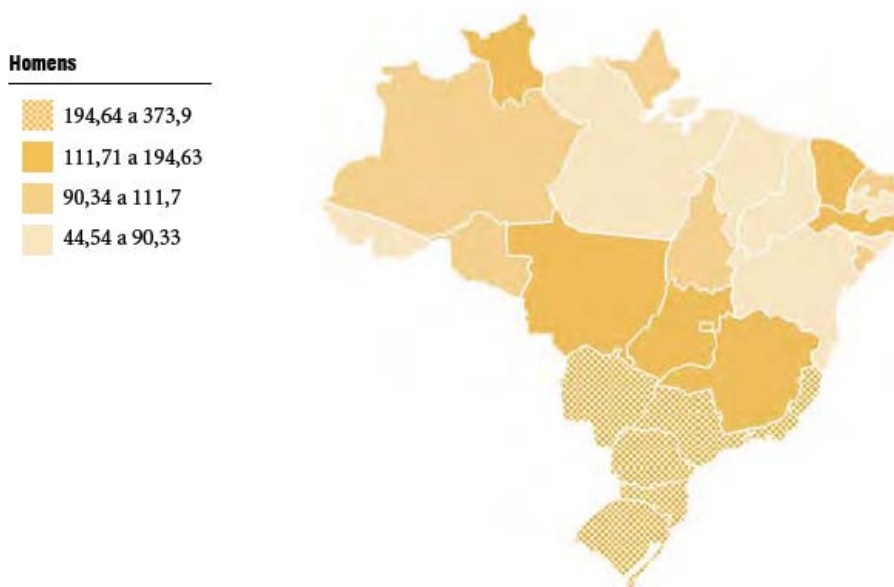


Figura 9a: Representação espacial das taxas de incidência por 100.000 homens estimadas para o ano de 2008, segundo a unidade da federação (todas as neoplasias, exceto pele não melanoma) (INCA, 2008).

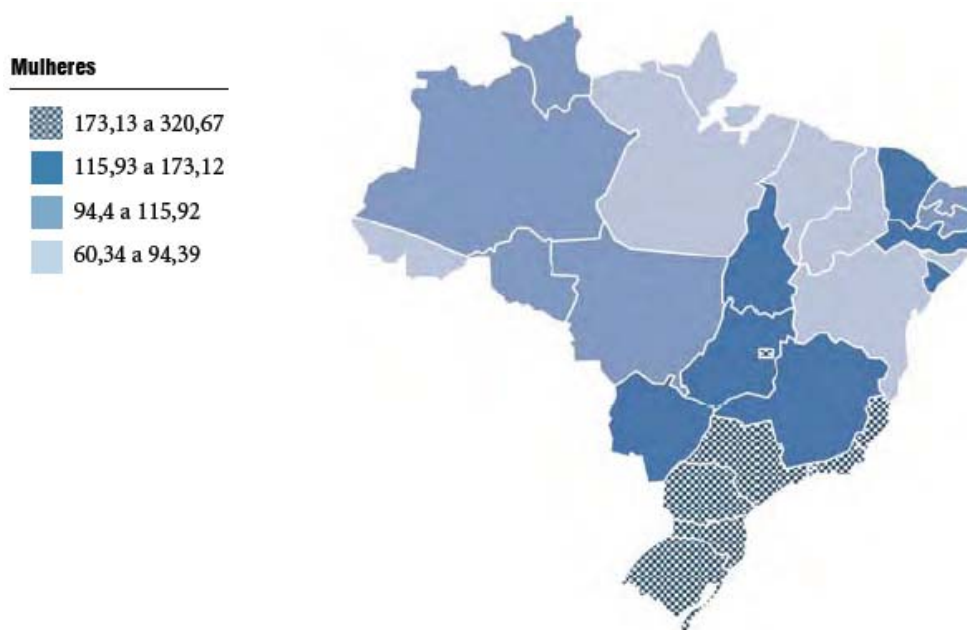


Figura 9b: Representação espacial das taxas de incidência por 100.000 mulheres estimadas para o ano de 2008, segundo a unidade da federação (todas as neoplasias, exceto pele não melanoma) (INCA, 2008).

Além de toda problemática já exposta, apesar do considerável arsenal de fármacos existentes para o tratamento do câncer, em muitos casos, o sucesso terapêutico não é alcançado por causa de falhas nos esquemas terapêuticos, altos índices de recidivas e redução da sobrevida do paciente. (Goodman & Gilman, 2003; Fuchs *et al.*, 2004; Rang & Dale, 2004) Daí a importância da pesquisa constante para o desenvolvimento de novos fármacos.

A importância clínica dos agentes antineoplásicos implica na necessidade de um estudo sistemático, o que primeiramente deveria ser feito com o uso de classificações químicas, levando-se em conta os diferentes grupos funcionais presentes na estrutura das moléculas dos agentes anticancerígenos. Contudo, a variedade de tipos de compostos utilizados em quimioterapia oncológica é tão grande, que tal classificação só pôde ser feita de forma indireta. Chabner (1995) descreveu uma classificação conveniente dos fármacos antineoplásicos, onde o critério classificatório baseia-se no ponto de interferência no mecanismo de ação das diferentes etapas da síntese do DNA (Figura 10), transcrição e transdução.

Entretanto, os autores consideram esta classificação arbitrária, pois, por exemplo, os agentes hormonais, entre outros, não são classificados desta forma (Almeida et al., 2005).

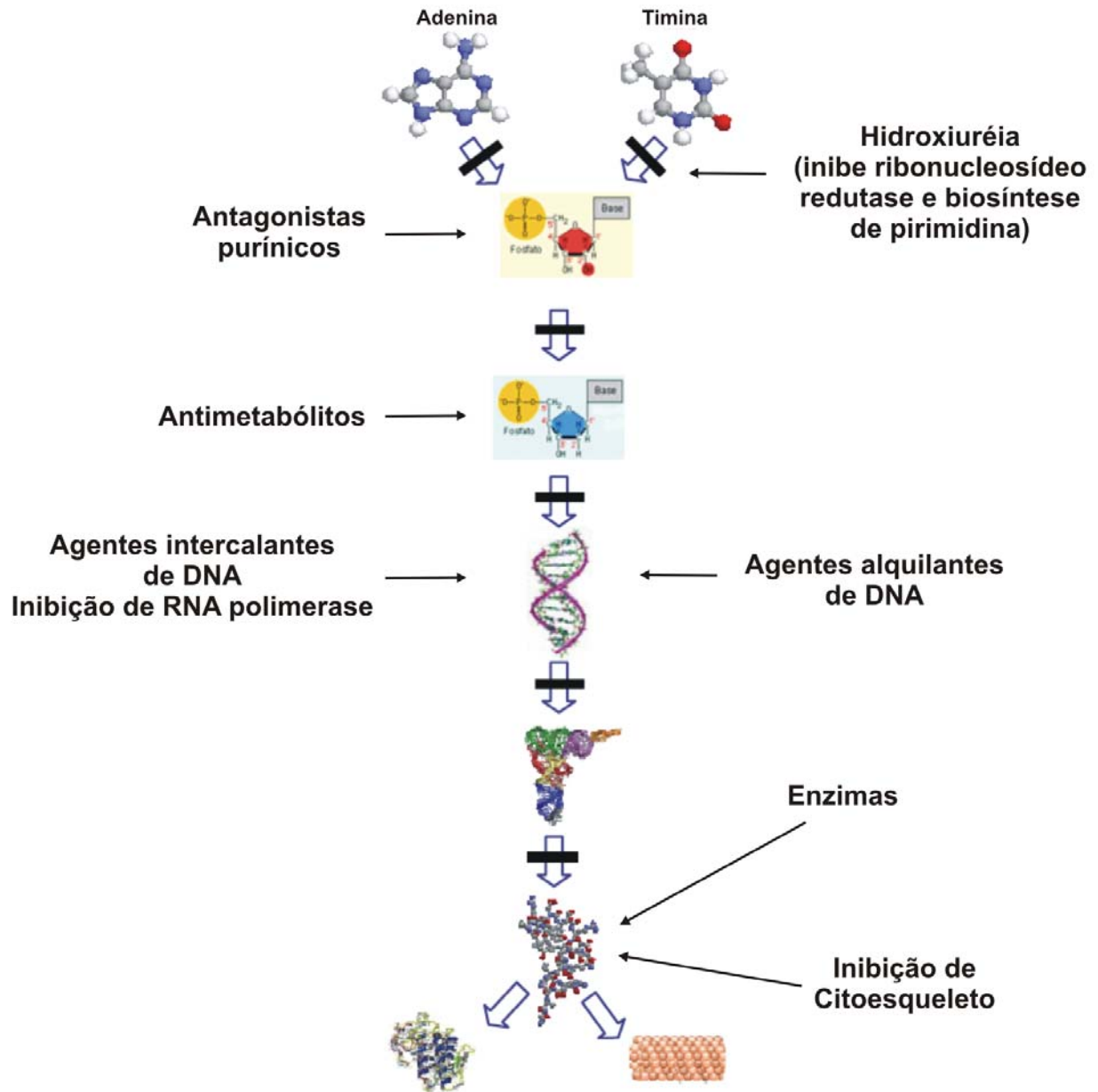


Figura 10: Classificação de antineoplásicos segundo Chabner (1995) *adaptado*.

As primeiras observações de regressão tumoral induzida por fármacos datam do período da Segunda Grande Guerra Mundial, mais especificamente no ano de 1942, quando foi descoberto que a mecloretamina (Figura 11), uma mostarda nitrogenada que apresentou o potencial de induzir remissão tumoral transitória em um paciente portador de linfoma. Este acontecimento marcou o início da era moderna de quimioterapia do câncer, permitindo o registro dos agentes alquilantes, como pioneiros no tratamento do câncer (Almeida *et al.*, 2005).

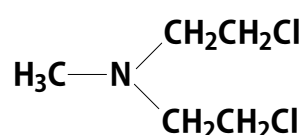


Figura 11: Estrutura química da mecloretamina, agente alquilante de DNA.

Com o passar do tempo, novos fármacos quimioterápicos foram adicionados ao arsenal da terapia antineoplásica (Figura 10). Apesar de maior atividade antitumoral e menor toxicidade, o fundamento racional da ação dessas novas moléculas estava baseado em conceitos relativamente antigos do ciclo celular. A ação se caracteriza por interromper ou conturbar etapas importantes de proliferação celular, levando as células, em fase de duplicação, à morte. (Almeida *et al.*, 2005)

Pelo fato da grande toxicidade e efeitos colaterais existentes, a investigação por novos fármacos e, principalmente, pela determinação do mecanismo de ação desses fármacos com atividade anticâncer tem sido objeto de muita atenção e é o principal objeto de estudo do presente trabalho.

I.3 – Quinonas: Atividades farmacológicas e mecanismos gerais

Quinonas são muito difundidas na natureza e desempenham uma variedade de funções bioquímicas e fisiológicas (Monks *et al.*, 2002; Asche *et al.*, 2006). Elas são componentes da cadeia biológica de transferência de elétrons, localizada nas membranas da mitocôndria, em bactérias e em cloroplastos, e

envolvidas nos processos de respiração celular e fotossíntese. Algumas quinonas são usadas como vitaminas e várias delas, como fármacos. Por exemplo, a coenzima Q (Figura 12a) funciona como transportadora de elétrons, enquanto a vitamina K (Figura 12b) é requerida em processos de coagulação sanguínea e participa na carboxilação de glutamato. No entanto, um certo número de xenobióticos forma quinonas tóxicas via metabolismo oxidativo, a partir, por exemplo, de catecolaminas e estrogênio, ou mesmo a partir de fármacos, como no caso do antipirético paracetamol (acetaminofeno) (Figura 12c-1), que, em doses maiores para indivíduos normais ou até mesmo em doses terapêuticas para indivíduos portadores de alguma disfunção hepática, pode ser altamente hepatotóxico. Essa toxicidade é atribuída à presença de um metabólito, uma *p*-benzoquinonaimina (Figura 12c-2), que sofre hidrólise, com geração de quinonas.

Do ponto de vista toxicológico, as quinonas apresentam duas propriedades químicas principais que lhe conferem reatividade em sistemas biológicos: o fato de serem oxidantes e eletrofílicas. Como a adição de nucleófilos a uma quinona representa uma redução formal de dois elétrons, suas propriedades oxidantes e eletrofílicas são correlacionadas.

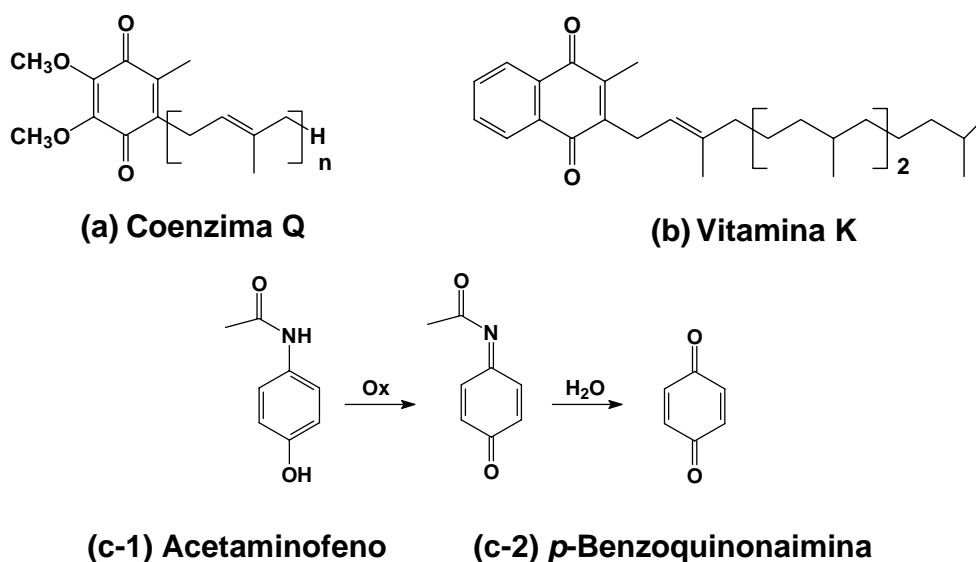


Figura 12: (a) Estrutura química da Coenzima Q; (b) Estrutura química da Vitamina K; (c-1 e c-2) Metabolismo oxidativo com geração de quinonas tóxicas a partir de acetaminofeno (c-1).

As funções bioquímicas das quinonas referem-se, em grande extensão, a sua habilidade em realizar conversões redox reversíveis (Petrova *et al.*, 1990). A facilidade de redução explica-se pela formação de sistemas aromáticos (Figura 13).

A completa redução de uma quinona à hidroquinona correspondente requer dois elétrons e dois prótons. Quinonas são espécies neutras e experimentam reações de protonação com dificuldade. No entanto, quando protonadas, são oxidantes mais fortes do que a forma não protonada. Semiquinonas (Q^{\bullet}) são geradas por redução envolvendo um elétron (Figura 13). A semiquinona não é suficientemente básica para ser protonada. Conseqüentemente, muitas semiquinonas existem como ânions radicais em pH fisiológico. Por causa da repulsão entre as cargas, um ânion radical semiquinônico é um oxidante muito mais fraco do que a quinona original. Assim, a química redox das quinonas, semiquinonas e hidroquinonas está intimamente relacionada à sua química ácido-base. Adicionalmente, semiquinonas desproporcionam (Eq. 4), formando as quinonas e hidroquinonas correspondentes, freqüentemente e com grande facilidade. Seu comportamento eletroquímico geral pode ser representado pela figura 14 (Jacq *et al.*, 1967; Jetic *et al.*, 1970).

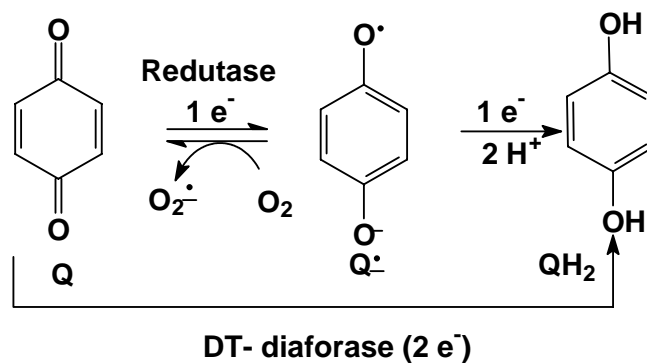


Figura 13: Redução de quinonas (Q) via 1 e 2 elétrons, gerando semiquinonas (Q^{\bullet}) e hidroquinonas (QH_2), respectivamente.



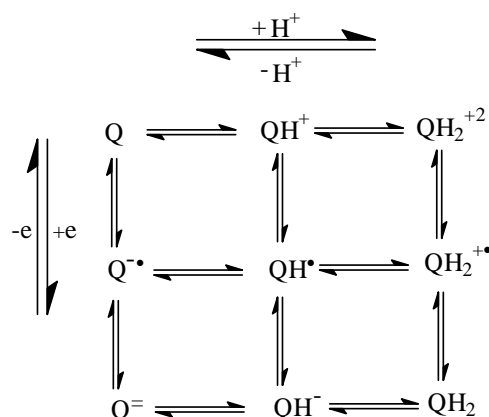


Figura 14: Esquema quadrado representativo da oxirredução de quinonas em vários meios. Adaptado de Jetic *et al.*, 1970.

No meio biológico, a redução pode ser monoeletrônica, catalisada por enzimas como NADPH:citocromo P450 redutase microssômica, NADPH:citocromo b_5 redutase microssômica e NADPH:ubiquinona oxidoreductase mitocondrial. O sistema enzimático propício à redução bieletrônica é o NAD(P)H:quinona oxidoreductase, também denominada DT-diaforase e a lipoamida desidrogenase (Figura 13) (Jacq *et al.*, 1967; Jetic *et al.*, 1970).

A estabilidade e a reatividade desses intermediários dependem basicamente das propriedades eletrônicas das quinonas, que podem ser molecularmente descritas pelas energias do LUMO. Essas propriedades podem ser afetadas pela adição de grupos eletroatraentes e eletrodoadores ao sistema quinônico. Quanto maior a energia do LUMO, mais difícil a captura de elétrons, mais negativo o potencial de redução e maior a força nucleofílica das espécies reduzidas (Wardman *et al.*, 1990; Zuman *et al.*, 1967).

Quinonas podem ser citotóxicas, com conseqüências benéficas ou deletérias, por inúmeros mecanismos, incluindo ciclagem redox, arilação, intercalação na dupla hélice do DNA, geração de sítios radiculares específicos e interferência na respiração mitocondrial e por inibição enzimática. (Monks *et al.*, 2002; Asche *et al.*, 2003; Monks *et al.*, 1992). Outros mecanismos potenciais das

quinonas, não baseados em transferência de elétron, incluem arilação sulfidrílica (Irons *et al.*, 1985) ou envolvimento de topoisomerase (Frydman *et al.*, 1997).

Os mecanismos mais aceitos para a atuação biológica das quinonas estão esquematizados a seguir (Figura 15). Sabe-se que dois ou mais mecanismos podem operar simultaneamente, nesses casos, não é possível avaliar o mais importante (Monks *et al.*, 2002; Monks *et al.*, 1992).

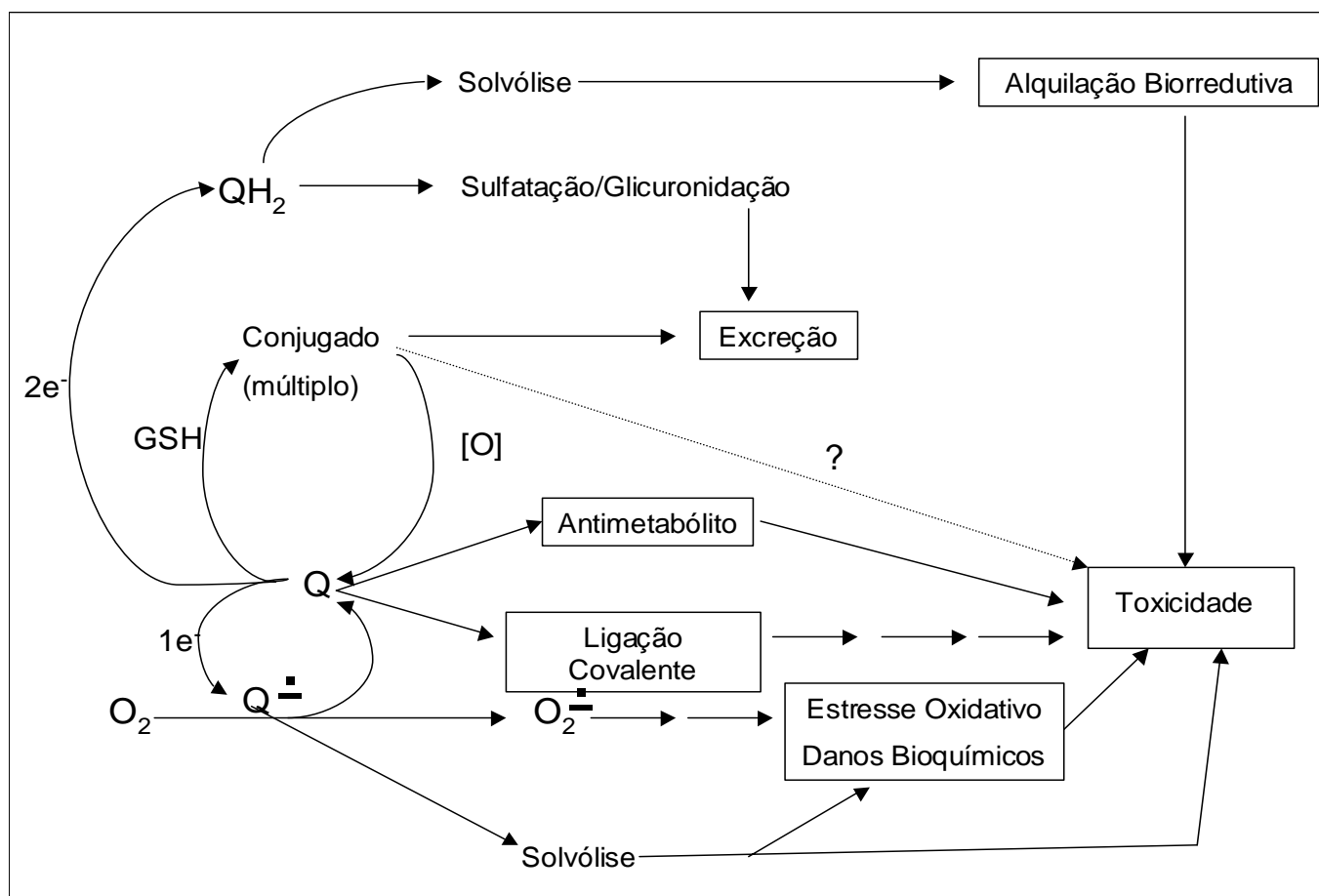


Figura 15: Mecanismos gerais de ação biológica de quinonas. Adaptado de Monks *et al.*, 1992.

A redução de um elétron pela ação de redutases resulta na formação da semiquinona, que pode reagir com o oxigênio molecular formando o ânion-radical superóxido (O₂^{•-}) (Figura 15), que subsequenteemente leva, tanto espontaneamente quanto após catálise enzimática, a um desproporcionamento para formar peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O ânion-radical superóxido também pode reduzir Fe³⁺ a

Fe^{2+} . O peróxido de hidrogênio reage, então, com o Fe^{2+} para gerar o radical hidroxila (HO^\bullet) (Reação de Fenton), que é, provavelmente, a espécie reativa responsável pelo dano oxidativo, pois ela não é capturada (destoxicada) por qualquer enzima presente no meio celular (Figura 16). 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), já mencionadas (Fry *et al.*, 2006; Schaffer *et al.*, 2001; Kovacic *et al.*, 2000; Valko *et al.*, 2007; Lown *et al.*, 1982).

A redução com transferência de dois elétrons, catalisada pela DT-diaforase, é geralmente considerada como um caminho desintoxicante, desde que a hidroquinona resultante pode ser conjugada e excretada (Figura 15). No entanto, a hidroquinona resultante pode se desproporcionar (Figura 16) 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 (Kovacic *et al.*, 2000; Valko *et al.*, 2007; Lown *et al.*, 1982).



Figura 16: Atuação de quinonas na geração de espécies oxigenadas reativas (ERO) e destoxificação, pelo emprego de catalase e superóxido-dismutase (SOD).

Em todos os casos demonstrados, o mecanismo de ação, *in vivo*, requer a biorredução das quinonas como primeira etapa de ativação (Figura 17).

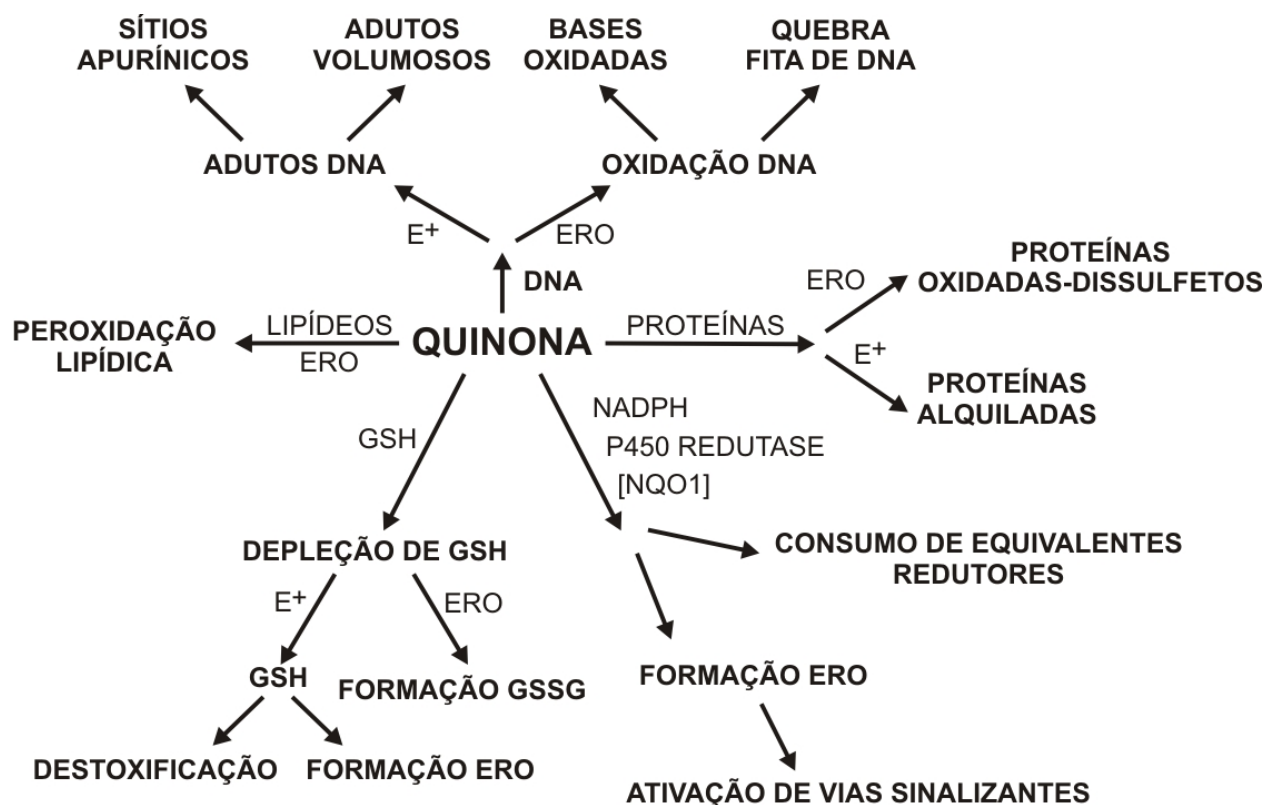


Figura 17: Sumário dos potenciais mecanismos moleculares citotóxicos para quinonas. Adaptado de Bolton *et al.*, 2000.

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 (Chambers *et al.*, 1988; Chambers *et al.*, 1974; Aguilar-Martinez *et al.*, 2004; Ashnagar *et al.*, 1984; Crawford *et al.*, 1996).

Quinonas também são consideradas venenos respiratórios, por competirem com a CoQ (coenzima Q) (Figura 18), localizada no complexo citocrômico bc₁, ou ainda, através de sua redução à hidroquinona correspondente com possibilidade de formar quinonametídeos que podem alquilar enzimas requeridas pela CoQ (agentes bioalquilantes) (Marin *et al.*, 1998; OTT *et al.*, 2007). Ambos os

procedimentos inibem o processo respiratório mitocondrial (S-Don *et al.*, 2004, Cheng *et al.*, 2007), pelo bloqueio do mecanismo de transferência de elétrons de NADH ou de FADH_2 para o oxigênio molecular. Esse processo de transferência de elétrons, responsável pela geração de grande parte da energia (ATP) nas células, ocorre através de três complexos de proteínas, que contêm muitos centros de oxidação-redução, tais como flavinas, quinonas, aglomerados ferro-enzofre, hemes e íons cobre.

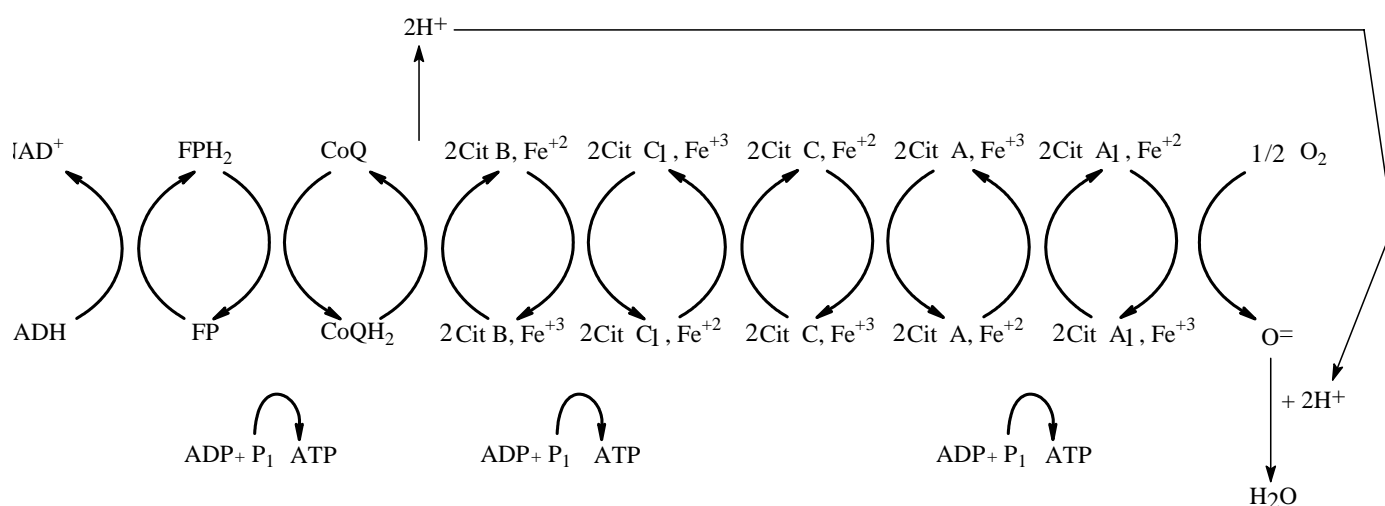
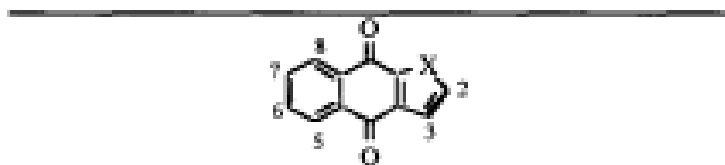
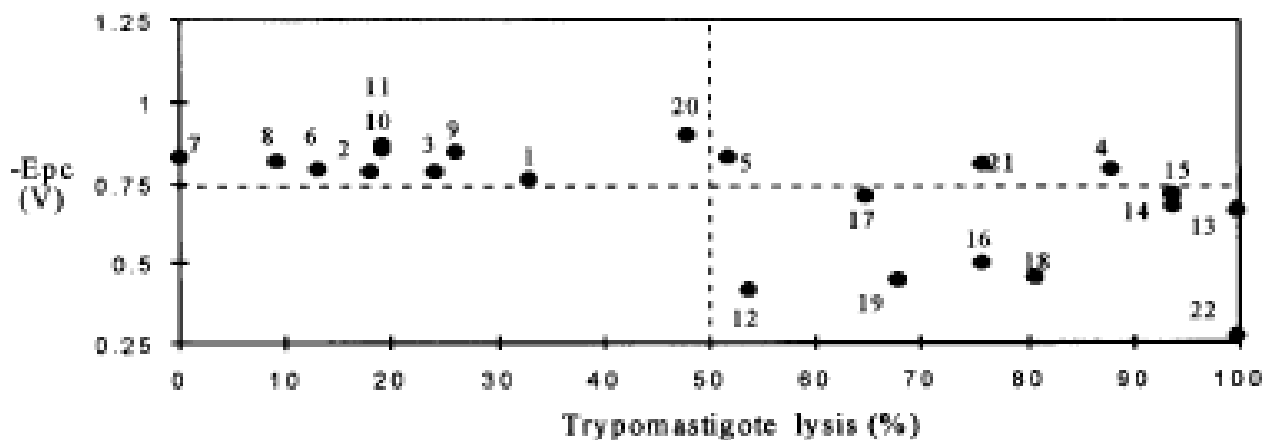


Figura 18: Interrupção da Cadeia Respiratória Mitocondrial. Fp: flavoproteína; Cit: citocromo. Adaptado de Stryer *et al.*, 1995.

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, estabelecer relações estrutura/atividade eletroquímica/atividade biológica, utilizando as informações obtidas no desenvolvimento de fármacos efetivos para a ação desejada. Seja em solventes apróticos, seja em meio prótico, e ainda com valores de E_{redox} , relacionados aos processos reversíveis, as

ferramentas eletroquímicas fornecem valiosos parâmetros em Química Medicinal (Hillard *et al.*, 2008).

No caso de quinonas, foram encontradas correlações positivas entre potenciais redox e efeitos inibitórios em vírus Epstein-Barr e em citotoxicidade (Koyama *et al.*, 2003; Koyama *et al.*, 2004; Koyama *et al.*, 2001). Existem outros exemplos, como, em Doença de Chagas (Goulart *et al.*, 1997). Apesar do reconhecimento da importância dos agentes geradores de estresse oxidativo, como potentes agentes tripanossomicidas, poucos artigos registram estudos eletroquímicos acoplados a atividades biológicas. Entre eles, várias naftoquinonas foram testadas contra formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e verificada a percentagem de lise das formas circulantes. Os potenciais E_{redox} foram medidos, em eletrodo de mercúrio, em meio aprótico (DMF/TBAP, 0,1 mol L⁻¹), usando como eletrodo de referência ECS. Embora sem evidência de correlação linear, os resultados sugeriram a maior atividade tripanossomicida para as quinonas mais facilmente redutíveis, com potencial de redução mais positivo que -0,72 V vs. ECS, especialmente as ortoquinonas, que sofrem redução mais facilmente que seus isômeros para-quinônicos (Figura 19).



Quinone	Substituents						
	X	C-2	C-3	C-5	C-6	C-7	C-8
1	O	H	H	H	H	H	H
2	O	Me	H	H	H	H	H
3	O	Et	H	H	H	H	H
4	O	CHMe ₂	H	H	H	H	H
5	O	H	H	OMe	H	H	H
6	S	H	H	H	H	H	H
7	S	H	H	OMe	H	H	H
8	S	H	H	H	OMe	H	H
9	S	H	H	H	H	H	OMe
10	S	H	H	H	H	OMe	OMe
11	S	H	H	OMe	H	OMe	H
12	S	NO ₂	H	H	H	H	H

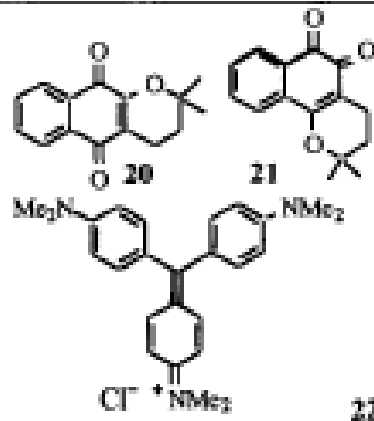
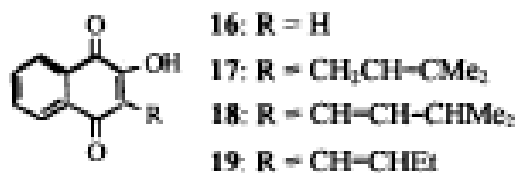
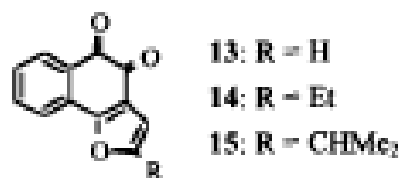


Figura 19. Quinonas, E_{redox} e atividade tripanocida (Goulart *et al.*, 1997).

I.4 – Biossensor Eletroquímico de DNA

A interação de fármacos com o DNA (Figura 20) é considerada um dos mais importantes aspectos em descoberta de fármacos e em processos de desenvolvimento farmacêutico. São três as possibilidades de interação. A primeira delas ocorre pelo controle dos fatores de transcrição e de polimerases, nos quais os fármacos interagem com proteínas que se ligam ao DNA. O segundo faz-se por meio da ligação com RNA, tanto com a dupla hélice do DNA, formando tripla hélice, ou com a fita simples, com a formação de híbridos, que podem interferir com a atividade de transcrição. No último caso, há interação de pequenas moléculas diretamente na estrutura do DNA (Figura 10, página 23). (Pindur *et al.*, 2005).

A modificação do DNA por agentes citotóxicos representa uma lesão bioquímica grave. Nesse caso, as interações podem ser eletrostáticas, geralmente inespecíficas, com o envolvimento do arcabouço negativo (açúcar-fosfato), via intercalação entre os pares de bases ou interação covalente (Rauf, 2005). Os processos de intercalação e de ligação nas fendas (maiores e menores) são os mecanismos mais comuns (Pindur *et al.*, 2005).

A intercalação, entalpicamente dirigida, resulta da inserção de sistemas anelares planos, entre os pares de bases do DNA, com conseqüente desnovelamento e alongamento das hélices de DNA (Chaires *et al.*, 2006). Em contraste, a ligação nas fendas, é, predominantemente entrópica e envolve interações covalentes e não covalentes (eletrostáticas) o que não perturba a estrutura em dupla fita em larga extensão (Waring *et al.*, 1981) e pode haver mecanismo misto de interação (Hillard *et al.*, 2008; De Abreu *et al.*, 2008).

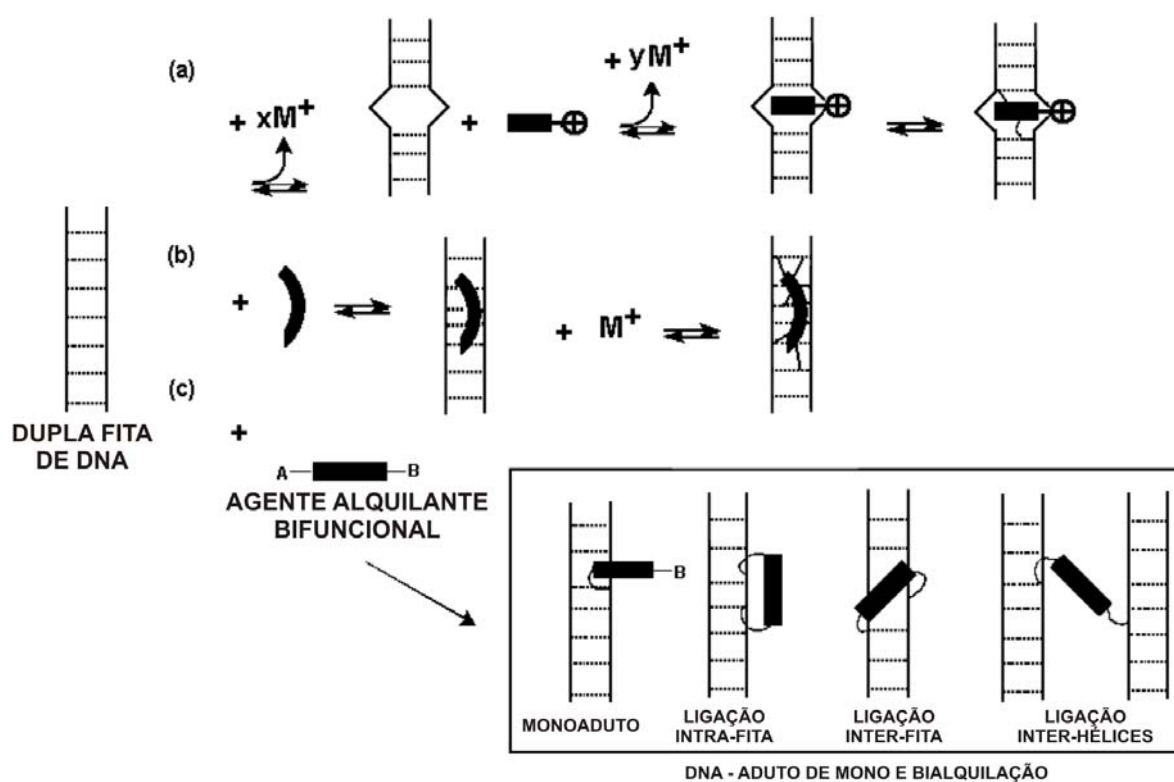


Figura 20. Mecanismos de funcionalização do DNA por ligação intra-fitas, inter-fitas e inter-hélices, como também por agentes alquilantes e intercalantes. A e B representam grupos eletrofílicos dos agentes de interesse. Adaptado Chaires *et al.*, 2006.

A habilidade em medir níveis de modificação covalente de DNA *in vivo* pode ser vista como uma forma eficiente de monitorar a eficiência terapêutica de fármacos. A estratégia eletroquímica pode auxiliar nesses aspectos (Rauf *et al.*, 2005).

Várias classes de substâncias são capazes de interagir diretamente com o DNA, como por exemplo, as acridinas e derivados dessa classe de substâncias (Figura 21), que por apresentarem uma estrutura planar, são passíveis de interagir diretamente com o DNA, atuando por intercalação entre os pares de bases da dupla hélice desta macromolécula. Tal propriedade confere a estas moléculas e

seus análogos estruturais uma importante atividade anticâncer, inibindo o processo de divisão celular. Agentes intercalantes de DNA tem uso clínico estabelecido e em geral atuam alterando as propriedades do pareamento das bases do DNA (Almeida *et al.*, 2005) e, por esse motivo, possivelmente podem ser estudados via biossensor de DNA, a partir do qual se espera uma contribuição para elucidação do mecanismo de ação de candidatos a fármacos.

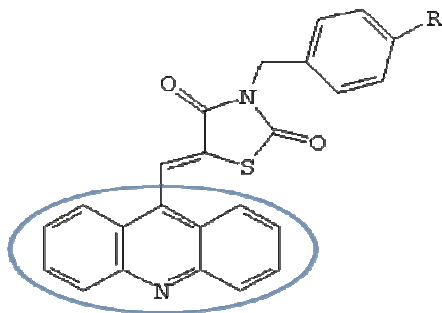


Figura 21: Estrutura de derivados de acridina (Pitta *et al.*, WO/2007/109871, 2007).

Estudos em biossensores de DNA (Rauf *et al.*, 2005; Brett *et al.*, 1996; Brett *et al.*, 1997; Brett *et al.*, 1997; Brett *et al.*, 1998; Brett *et al.*, 1999) são, portanto, úteis para elucidar o mecanismo biológico de ação de candidatos à fármacos (Figura 22).

Biossensores são definidos como dispositivos analíticos incorporados a um material biológico (tecidos, microrganismos, organelas, enzimas, ácidos nucleicos, etc), a um material derivado biologicamente ou material similar, intimamente associado ou integrado com um transdutor, que pode ser óptico, eletroquímico, termométrico, piezoelétrico ou magnético. Nos últimos anos, os eletrodos modificados com DNA foram aplicados com sucesso tanto como superfícies modificadas para determinação eletroanalítica de fármacos (Brett *et al.*, 1997), quanto para o estudo da interação dos mesmos com o ácido desoxirribonucléico (Rauf *et al.*, 2005; Brett *et al.*, 1998). Eles permitem avaliar e prever interações com prejuízos celulares, através de experimentos eletroquímicos (voltametria de pulso diferencial, em eletrodos de carbono vítreo modificados com DNA em fita dupla e simples) baseados na observação da ligação das moléculas-teste com ácidos nucleicos como está demonstrado na Figura 22.

Em eletrodos de carbono vítreo, os picos referentes à eletrooxidação do DNA, em meio ácido (pH 4,5), referem-se à oxidação das bases púricas (guanina, adenina), sendo as bases pirimídicas (timina, citosina) eletroinativas nessas condições (Brett *et al.*, 1999; De-los-Santos-Álvarez *et al.*, 2004). De modo geral, os valores de potencial de oxidação (E_{ox} vs. ESC), em pH = 7,2, para a poliguanina [poli(G)] e poliadenina [poli(A)], em eletrodo de grafite pirolítico, são + 0,89 V e + 1,17 V, respectivamente (De-los-Santos-Álvarez *et al.*, 2004). Para a 8-oxoguanina, E_{ox} é de +0,45 V (Brett *et al.*, 1999). O dsDNA (DNA nativo, “double-strand” ou fita dupla) sempre apresenta menores correntes de eletrooxidação quando comparado ao ssDNA (DNA desnaturado, “single-strand” ou fita única) conforme pode ser visto na Figura 23 para o dsDNA antes e após sua interação com substância intercalante. Isso ocorre, com o dsDNA, não só pelo fato de os sítios de oxidação estarem protegidos, devido ao fato de estarem envolvidos em ligações hidrogênio, como também por sua menor flexibilidade e maior dificuldade de adsorção.

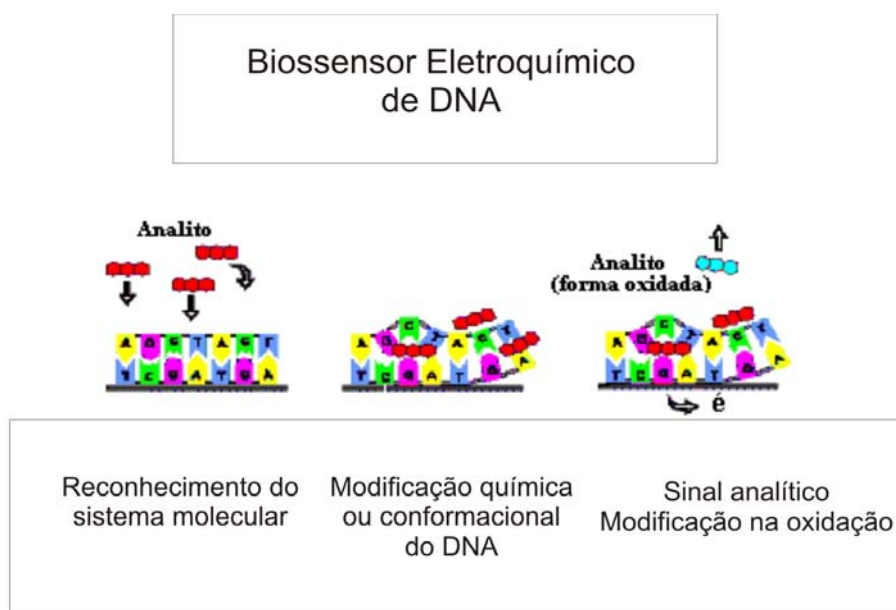


Figura 22: Representação do modo de operação do biossensor de DNA. O analito entra entre as fitas do dsDNA, modifica sua conformação, o que leva à exposição de suas bases, passíveis de oxidação anódica.

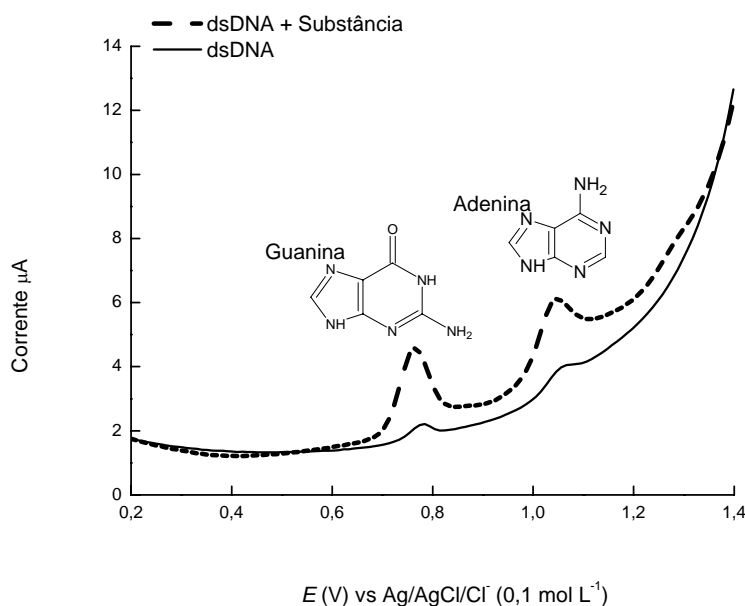
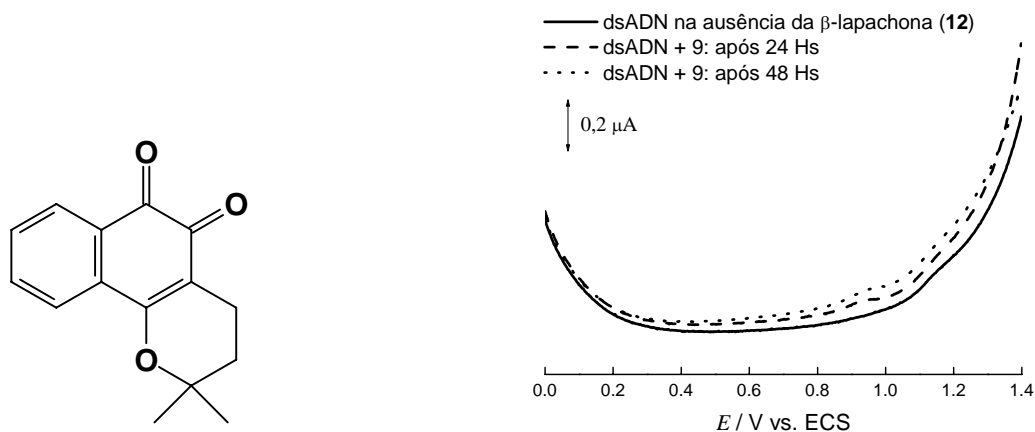


Figura 23: Voltamogramas de pulso diferencial (carbono vítreo) do biossensor de dsDNA (tampão acetato pH 4,5). $v = 5 \text{ mVs}^{-1}$, amplitude 50 mV. Antes e após interação de acridina (substância intercalante).

Há casos em que fica evidente a necessidade da redução preliminar das substâncias para a interação com o DNA. Essa redução pode ser realizada e acompanhada eletroquimicamente *in situ* ou *ex-situ*, com o DNA em solução ou na superfície eletródica, normalmente, em eletrodo de carbono vítreo ou pasta de carbono (Wang *et al.*, 1998; Marin *et al.*, 1998). Esses estudos mostram-se de alta relevância, uma vez que a interação de substâncias com o DNA em interfaces carregadas é muito próxima da situação *in vivo* e mostra que o biossensor de DNA é útil na compreensão das interações DNA/molécula/ion (Piedade *et al.*, 2002).

Em muitos exemplos, a interação com o DNA inexistente, evidenciando que esse não é o alvo para a ação biológica. Nesse caso, não há evidência dos picos de oxidação das bases constituintes do DNA, o que indica conservação da conformação original do DNA. Investigações eletroquímicas indicaram que a β -lapachona (Figura 24a) (De Abreu *et al.*, 2002), quinona de ocorrência natural que apresenta várias atividades biológicas, inclusive atividade anticancerígena, não

interage com o DNA (Figura 24b) (Brett *et al.*, 2002) o que corrobora experimentos bioquímicos anteriormente descritos. (Brett *et al.*, 2002).



(a)

(b)

Figura 24: Voltametria de pulso diferencial do biossensor de dsDNA com β -lapachona (a), $6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de (...dsDNA) e (___ após 24, 30 e 48 h.). Tampão acetato, pH 4,5, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Amplitude de pulso: 50 mV, tempo de pulso: 70 ms, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. (Brett *et al.*, 2002).

Diante do exposto em relação ao câncer, seu potencial de morbidade e mortalidade, seu grande impacto social e econômico em saúde pública e, em todos os setores produtivos, são sempre de grande relevância pesquisas voltadas para esta área, principalmente, quando relacionadas ao desenvolvimento de novos fármacos. As quinonas e acridinas constituem classes especiais de compostos anticâncer e as metodologias eletroquímicas, em conjunto com estudos farmacológicos, mostram-se relevantes no planejamento e análise de fármacos. O presente trabalho aborda todos esses aspectos.

Objetivos

II – Objetivos

II.1 – Objetivos Gerais

Avaliar o potencial antitumoral de nitroquinona, derivada da *nor*- β -Lapachona e utilizar métodos farmacológicos e farmacoeletróquímicos visando a elucidação de seu mecanismo de ação, além disso, investigar o comportamento eletroquímico de quinonas heterocíclicas com obtenção de parâmetros eletroquímicos e avaliar a possibilidade de correlação destes com a atividade citotóxica.

II.2 – Objetivos Específicos

Investigar o comportamento eletroquímico de duas séries (**1** e **2**) de compostos. Dentre estes, a nitroquinona e 8 quinonas heterocíclicas, derivadas da *nor*- β -Lapachona, com atividade antitumoral comprovada em várias linhagens de células tumorais;

Utilizar ESR (Ressonância de Spin do Elétron) na determinação do mecanismo eletródico de redução da nitroquinona;

Avaliar a atividade citotóxica em linhagens de células tumorais e uma linhagem normal das substâncias da série **2**;

Avaliar uma possível correlação entre os potenciais de redução das substâncias estudadas e suas atividades biológicas *in vitro*;

Estudar a atividade citotóxica *in vitro* da nitroquinona em uma linhagem de células tumorais leucêmicas humanas (HL-60);

Pesquisar a interação da nitroquinona com DNA utilizando biossensor eletroquímico;

Avaliar a atividade genotóxica, *in vitro*, da nitroquinona em linhagem de HL-60, por meio do teste do cometa;

Propor um possível mecanismo de ação antitumoral da nitroquinona;

Adaptar a metodologia do biossensor de DNA para avaliar a possível interação de substâncias intercalantes de DNA (derivados de Acridinas) com o mesmo.

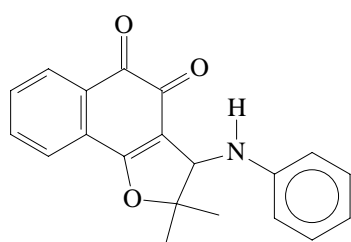
Material e Métodos

III – Material e Métodos

III.1 – Reagentes e Solventes

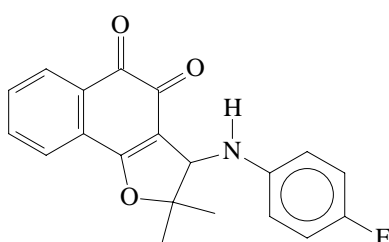
As quinonas heterocíclicas, derivadas da *nor*- β -Lapachona foram sintetizadas (Da Silva Júnior, 2008; Da Silva Júnior, 2007) e cedidas pelo Prof. Dr. Vítor Francisco Ferreira da Universidade Federal Fluminense e seu aluno Eufrânio Nunes da Silva Júnior (Figura 25). De acordo com as características estruturais, as substâncias foram divididas em duas séries.

Série 1



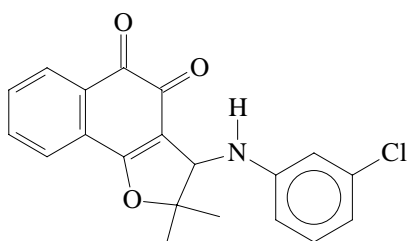
Composto 1

$C_{20}H_{17}NO_3$ ($M = 319,35 \text{ g mol}^{-1}$)
3-(fenilamino)-2,2-dimetil-2,3-
diidronaftol[1,2*b*]furan-4,5-diona



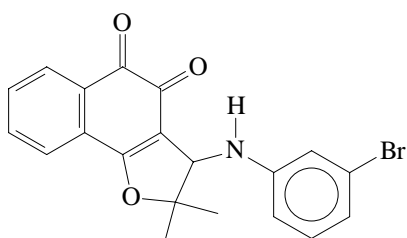
Composto 2

$C_{20}H_{16}FNO_3$ ($M = 337,34 \text{ g mol}^{-1}$)
3-(4-Fluorfenilamino)-2,2-dimetil-2,3-
diidronaftol[1,2*b*]furan-4,5-diona



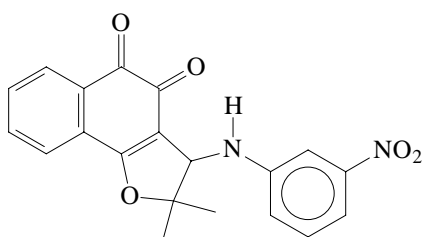
Composto 3

$C_{20}H_{16}ClNO_3$ ($M = 353,80 \text{ g mol}^{-1}$)
3-(3-Clorofenilamino)-2,2-dimetil-2,3-
diidronaftol[1,2*b*]furan-4,5-diona



Composto 4

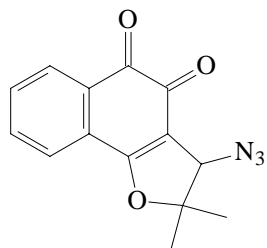
$C_{20}H_{16}BrNO_3$ ($M = 398,25 \text{ g mol}^{-1}$)
3-(3-Bromofenilamino)-2,2-dimetil-2,3-
diidronaftol[1,2*b*]furan-4,5-diona



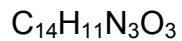
Composto 5

$C_{20}H_{16}N_2O_5$ ($M = 364,35 \text{ g mol}^{-1}$)
3-(3-Nitrofenilamino)-2,2-dimetil-2,3-
diidronaftol[1,2*b*]furan-4,5-diona

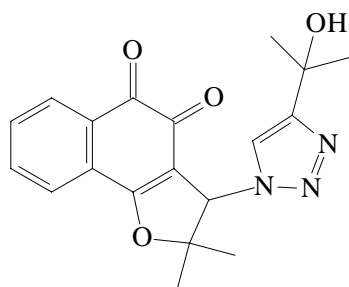
Série 2



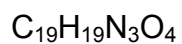
Composto **6**



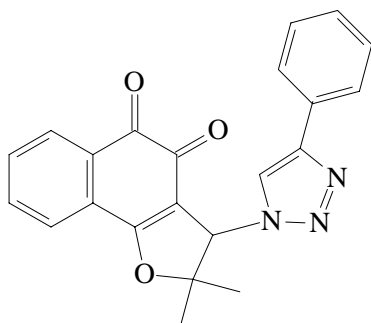
$M = 269,26 \text{ g mol}^{-1}$



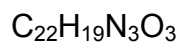
Composto **7**



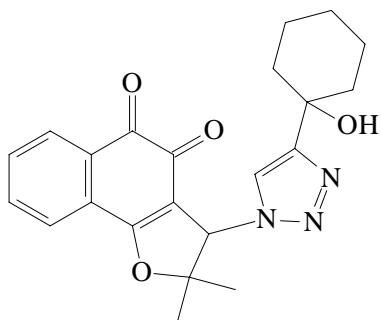
$M = 353,14 \text{ g mol}^{-1}$



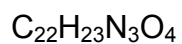
Composto **8**



$M = 373,14 \text{ g mol}^{-1}$



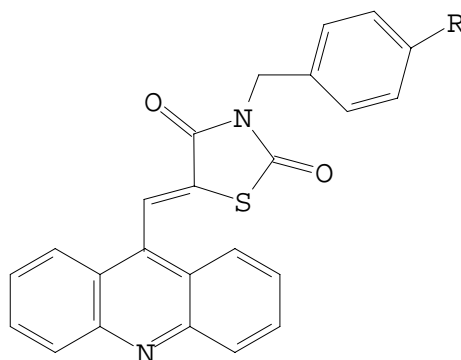
Composto **9**



$M = 393,17 \text{ g mol}^{-1}$

Figura 25: Substâncias derivadas da *nor*-β-Lapachona. Objeto de estudo.

Os derivados de acridina (Figura 26), possíveis agentes intercalantes de DNA foram cedidas pelo Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta e Profa. Dra. Suely Lins Galdino do Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Estas substâncias fazem parte do projeto IM-INOFAR – Instituto do Milênio: Inovação de Fármacos e foram patenteadas pelos referidos professores. (Pitta *et al*, WO/2007/109871, 2007).



Derivado **A** (AC4 R = CH₃) (5-Acridin-9-metileno-3-(4-metil-benzil)-thiazolidina-2,4-diona)

Derivado **B** (AC7 R= Br) (5-Acridin-9-metileno-3-(4-bromo-benzil)-thiazolidina-2,4-diona)

Derivado **C** (AC10 R= Cl) (5-Acridin-9-metileno-3-(4-cloro-benzil)-thiazolidina-2,4-diona)

Derivado **D** (AC23 R= F) (5-Acridin-9-metileno-3-(4-fluoro-benzil)-thiazolidina-2,4-diona)

Figura 26: Derivados de Acridina.

III.2 – Estudos Eletroquímicos

Todos os estudos eletroquímicos foram realizados utilizando-se um sistema de três eletrodos (eletrodos de trabalho, auxiliar e referência). De acordo com o procedimento experimental, um dos eletrodos de trabalho a seguir foram escolhidos: carbono vítreo (BAS, área 7.065 mm²), carbono vítreo (Methron) ou pasta de carbono. Como eletrodo de referência utilizou-se Ag/AgCl/Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹) (em um tubo com capilar de Luggin com vycor na extremidade) e como eletrodo auxiliar utilizou-se um fio de platina.

As medidas eletroquímicas foram realizadas através dos equipamentos AUTOLAB PGSTAT20 ou AUTOLAB PGSTAT30 interfaceado a um microcomputador.

Após os experimentos e aquisição dos dados utilizou-se o programa Oringin 7.0, para plotar os gráficos e tratá-los.

III.2.1 – Meio Aprótico

O Dimetilsufóxido (DMSO) é um solvente polar e largamente utilizado para compostos orgânicos, em eletroquímica é um dos solventes de escolha em se tratando de análises meio aprótico devido ao amplo domínio eletroquímico em que pode ser utilizado (Bard, 1990). Além disso, para os estudos biológicos *in vitro* é o solvente empregado para solubilizar os compostos orgânicos a serem analisados (concentração máxima de 1% após diluição em meio de cultura).

O DMSO pode decompor-se na destilação sob pressão atmosférica (a altas temperaturas), por esse motivo o caminho mais conveniente para a sua purificação é a secagem sob CaH_2 (hidreto de cálcio) anidro e destilação à pressão reduzida.

O Perclorato de tetrabutylamônio (TBAP), utilizado como eletrólito suporte nos estudos em meio aprótico, foi sintetizado (III.2.1.1) e sua secagem procedida sob pressão reduzida.

III.2.1.1 – Síntese e purificação de TBAP

A síntese do TBAP foi realizada da seguinte forma: 103,69 g de Brometo de tetrabutylamônio (TBA) foram dissolvidos lentamente em 200 mL de água destilada, posteriormente 30 mL de ácido perclórico foi adicionado à solução aquosa de TBA formando uma suspensão pastosa branca. O referido produto formado foi filtrado a vácuo, dando origem a cristais brancos pequenos; a água mãe desse processo de filtração apresentava pH ~ 3 e por esse motivo que foi procedida lavagem dos cristais até que o filtrado estivesse em pH ~ 7. Para a recristalização (purificação) os cristais filtrados foram dissolvidos em acetato de

etila a quente onde a mistura foi colocada num funil de separação para que a água residual fosse retirada. A fase de acetato foi colocada sob um banho de gelo para a cristalização e posteriormente os cristais foram secos sob pressão reduzida.

III.2.2 – Meio Prótico

Para as análises em meio prótico foi utilizado como eletrólito de suporte um meio aquoso (tampão acetato) de pH 4,5. Para isto foram preparadas soluções estoque:

AcONa 1 molL ⁻¹	(7,2 mL)	(Nuclear [®])	}	Avolumou-se para 100 mL com água deionizada = Tampão Acetato pH 4,5 C= 0,075 mol L ⁻¹ ; I = 0,2.
AcOH 1 molL ⁻¹	(12,5 mL)	(Vetec [®])		

Em alguns casos, de acordo com a solubilidade dos compostos no meio ácido, foi necessário utilizar uma certa quantidade de etanol P.A. (Vetec[®]) (1:1 v:v) para poder se proceder o estudo eletroquímico. Isso será relatado para cada série.

III.3 – Estudos em Biossensor de DNA

Fundamento do Método: Em eletrodos de carbono vítreo, a eletrooxidação do DNA, em meio ácido (pH 4.5), relaciona-se à oxidação das bases púricas (guanina, adenina) (Brett *et al*, 1999; De-los-Santos-Álvarez *et al*, 2004), o dsDNA (DNA nativo, “double-strand” ou fita dupla) sempre apresenta menores correntes de eletrooxidação quando comparado ao ssDNA (DNA desnaturado, “single-strand” ou fita única), desnaturado termicamente. Já quando ocorre interação de substâncias com o dsDNA ocorre exposição das bases à superfície do eletrodo e, com isso, estas tornam-se passíveis de oxidação.

O ssDNA apresenta geralmente correntes de oxidação maiores que o DNA nativo, com isso, a análise de interação entre substâncias e ssDNA é observada pela diminuição das intensidades de corrente.

Em geral, para o experimento eletroquímico com o biossensor de DNA, foi utilizado como eletrólito de suporte um meio aquoso (tampão acetato) de pH 4,5, devido ao fato deste ser, de acordo com a literatura, o meio mais adequado para os estudos em biossensor de DNA (de Abreu *et al*, 2002; Brett *et al*, 2002).

O tampão acetato para uso nos experimentos com DNA foi feito da mesma forma que descrito no item III.2.2, entretanto usou-se água deionizada fervida para preparação do tampão e, em adição, toda a vidraria envolvida nos procedimentos foi lavada com a referida água fervida e levada ao ultra-som por um minuto (esse procedimento foi realizado para todo material utilizado nas análises com DNA).

III.3 – 1 – Preparação do gel de dsDNA:

O DNA utilizado foi do tipo I, altamente polimerizado de *calf thymus* (timo de bezerro), contendo 6,2% de Na e 13% de H₂O, dessecado e armazenado à 8°C. Usou-se pinça para sua fragmentação e pesagem. Para preparação do gel de dsDNA, 18 mg de dsDNA foram colocados em um *ependorf* juntamente com 1,0 mL de tampão acetato (pH 4,5). O gel foi armazenado sob refrigeração por 24 horas, para completa dissolução do DNA e formação do gel (o dsDNA não pode ser submetido ao ultra-som para não comprometer a integridade da dupla hélice).

III.3 – 2 – Condicionamento do Eletrodo:

Antes da preparação do biossensor deve ser feito um polimento e condicionamento do eletrodo de carbono vítreo.

Após polimento com pasta de diamante (1 micrômetro) e alumina (3 micrômetro), o eletrodo foi condicionado em técnica de VPD ($E_{aplic.} = 0$ a 1,4 V) a uma velocidade de 5 mV s⁻¹ em vários ciclos até a completa estabilização da superfície do eletrodo (organização da dupla camada).

III.3 – 3 – Estudo da interação das substâncias-teste com o dsDNA:

Imediatamente após secagem do gel de DNA, sobre a superfície do eletrodo modificado, em atmosfera de nitrogênio, foram adicionados 20 μL da solução ($10^{-4} - 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) da substância solubilizada em etanol, prosseguiu-se o mesmo procedimento de secagem e então analisou-se o biossensor na região de $E = 0$ a 1,4 V usando a técnica de pulso diferencial. Foi realizado um branco (controle), em triplicata, adicionando apenas etanol (20 μL) ao gel, para verificar se o etanol poderia interagir com o DNA (verificar possibilidade de interferência do veículo nos resultados).

III.3 – 4 – Adaptação da Metodologia do Biossensor de DNA (Wang, 2006) para avaliação de substâncias insolúveis. Pasta de Carbono modificada com as substâncias teste (ACRIDINAS):

Em geral as análises da interação entre substâncias-teste e ssDNA são feitas em solução. Devido à insolubilidade das acridinas foi necessário adaptar uma metodologia diferenciada para analisá-las, a qual foi feita a incorporação das acridinas em pasta de carbono.

Pesou-se 45 mg de grafite ativado e a este foi adicionado 1 mL da solução etanólica da acridina a ser testada ($10^{-4} \text{ molL}^{-1}$), que foi misturada por aproximadamente 20 minutos até completa evaporação do solvente. Para assegurar a completa evaporação, a mistura foi submetida à atmosfera de nitrogênio, em seguida adicionou-se 20 μL de óleo mineral comercial (Nujol[®]).

Neste caso também foi realizado um branco (controle) com a adição apenas de etanol (sem substância) ao grafite e posterior incorporação com óleo mineral.

III.3 – 5 – Preparação da solução de ssDNA:

Para preparar a solução de ssDNA pesaram-se 3 mg de dsDNA e este foi desnaturado mediante adição de 1 mL de ácido clorídrico (1 mol L^{-1}) e aquecimento a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 hora, até dissolução, em seguida, 1 mL de solução de NaOH (1 mol L^{-1}) foi adicionado para neutralização e, por fim, completou-se o volume total de 10 mL com o tampão acetato.

III.3 – 6 – Estudo da interação das substâncias teste (imobilizadas na pasta de carbono - ACRIDINAS) com a solução de ssDNA:

A medida eletroquímica foi realizada utilizando um eletrodo apropriado para acondicionar a pasta de carbono (Metrohm) modificada. Desta forma, este eletrodo de trabalho foi imerso na solução de ssDNA juntamente com um contra eletrodo e um eletrodo de referência (mesmo sistema de três eletrodos citado no item III.1.1). Então fez-se uma varredura na região de $E= 0$ a $1,4 \text{ V}$ usando a técnica de pulso diferencial.

III.4 – Técnicas Eletroanalíticas

Existem várias técnicas para análises eletroquímicas, dentre as quais, a voltametria cíclica, uma das mais utilizadas que permite obter uma quantidade extraordinária de informações sobre reações de transferência de elétrons, inclusive biológicas. Os métodos eletroanalíticos fornecem relações entre quantidades físico-químicas básicas: o potencial eletroquímico E , a corrente I e o tempo t , com obtenção de informações úteis na correlação entre estruturas e propriedades dinâmicas das moléculas investigadas. Este é a etapa mais importante de uma investigação eletroanalítica (Bard, 1990). Os parâmetros normalmente empregados são E^0 ou E_{redox} ($E_{\text{p}_c} + E_{\text{p}_a}$)/2 (para sistemas reversíveis) ou $E_{\text{p}} - E_{\text{p}/2}$ (para sistemas irreversíveis ou sem onda anódica definida), a função corrente ($I_{\text{p}}/(v^{1/2}$ vs C) e $I_{\text{p}_a}/I_{\text{p}_c}$.

De acordo com a aquisição dos parâmetros eletródicos, técnicas de análises voltamétricas, conhecidas pela denominação abrangente de técnicas eletroanalíticas, são utilizadas em áreas distintas do conhecimento como medicina, bioquímica, biologia molecular, química ambiental e físico-química. Estudos de processos de oxidação e redução em vários meios e de mecanismo de transferência de elétrons, inclusive com a utilização de eletrodos modificados, exemplificam algumas das numerosas aplicações atuais das chamadas técnicas eletroanalíticas (Souza *et al*, 2003).

Algumas técnicas voltamétricas que foram utilizadas no desenvolvimento deste trabalho encontram-se descritas abaixo.

III.4 – 1 – Voltametria Cíclica (VC)

Fundamento do Método: A voltametria cíclica (VC) é uma técnica de varredura reversa de potencial, onde o potencial aplicado ao eletrodo é variado numa velocidade conhecida, e ao atingir o potencial final desejado, a varredura é revertida ao valor inicial, na mesma velocidade. Obtém-se, como resposta a essa perturbação, no caso de uma transferência eletrônica reversível, um par de picos, catódico e anódico (Figura 27).

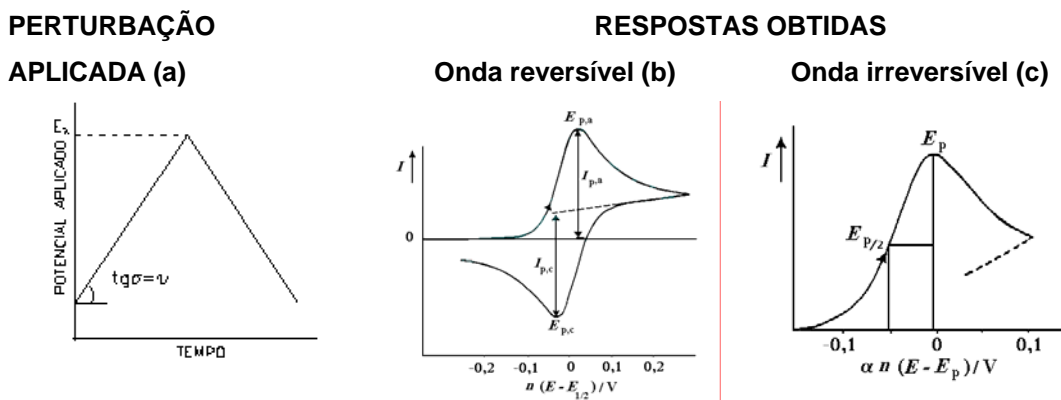


Figura 27: Técnica da VC. a) Perturbação aplicada e b) resposta obtida.

De posse dos parâmetros eletroquímicos mais importantes, ou seja, os potenciais de pico catódico e anódico ($E_{p,c}$ e $E_{p,a}$), as correntes de pico catódico e anódico ($I_{p,c}$ e $I_{p,a}$) e os potenciais de meia onda ($E_{1/2}$) ou de pico à meia-altura de onda ($E_{p/2}$), pode-se analisar o processo eletródico ocorrido. A dependência do potencial e da corrente com a variação da velocidade de

varredura, baseados em testes diagnósticos, permite obter informações importantes como reversibilidade e irreversibilidade do processo de transferência eletrônica, a ocorrência de reações químicas acopladas, adsorção e fenômenos catalíticos, além de se caracterizar o fenômeno que controla a corrente de pico (Greef *et al*, 1985).

Os testes diagnósticos para a caracterização de um processo reversível estão descritos na tabela 2.

Tabela 2: Testes diagnósticos em VC para processos reversíveis, irreversíveis e quase-reversíveis. (Southampton Electrochemistry Group).

Reversíveis	Irreversíveis	Quase-reversíveis
1. $\Delta E_p (E_{p_a} - E_{p_c}) = 59/n$ (mV) 2. $ E_p - E_{p/2} = 59/n$ mV 3. $ i_{p_a}/i_{p_c} = 1$ 4. E_p é independente de ν 5. $i_p \propto \nu^{1/2}$	1. Ausência de pico reverso 2. $ E_p - E_{p/2} = 48/\alpha n$ mV 3. E_{p_c} desloca $-30/\alpha n$ mV por década de aumento de ν 4. $i_{p_c} \propto \nu^{1/2}$	1. i_p aumenta com o aumento de ν 2. $ i_{p_a}/i_{p_c} = 1$ se $\alpha = 0,5$ 3. $\Delta E_p = 58/n$ mV e aumenta c/ ν 4. E_{p_c} desloca negativamente c/ o aumento de ν

Os experimentos de Voltametria Cíclica realizados foram realizados nos meios aprótico e prótico, já citados nos itens III.2.1 e III.2.2.

III.4 – 2 – Voltametria de Pulso Diferencial (VPD)

Fundamento do Método: Em voltametria de pulso normal (VPN), escolhe-se um valor base de potencial, E_{base} , normalmente onde não há reação faradáica, e aplica-se ao eletrodo. A partir desse valor aplicam-se pequenos pulsos de amplitude crescente, sendo o aumento de amplitude sempre igual. A corrente é medida no fim de cada pulso, cuja duração varia normalmente entre 5 e 100 ms; o intervalo entre os pulsos é de 2 - 4 s. A voltametria de pulso diferencial (VPD) é semelhante à VPN, mas com algumas diferenças importantes (Greef *et al*, 1985):

O potencial-base é aumentado entre os pulsos, sendo esses aumentos de igual intensidade. A corrente é medida imediatamente antes da aplicação do pulso e no fim do pulso: registra-se a diferença entre as duas correntes. (Isso

diminui a percepção da corrente capacitiva). A duração de cada pulso varia normalmente entre 5 e 50 ms. O intervalo entre os pulsos é de 0,5 - 4 s.

A curva corrente-potencial está representada na figura 28.

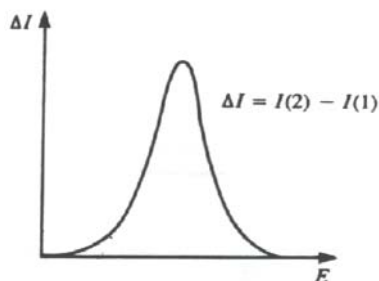


Figura 28: Voltametria de Pulso Diferencial. Perfil corrente-potencial esquemático.

Os experimentos de Voltametria de Pulso Diferencial foram realizadas em meios prótico e aprótico já citados nos itens III.2.1 e III.2.2. Inclusive todas as análises de substâncias em biossensor de DNA foram performadas em VPD.

III.4 – 3 – Voltametria de Onda Quadrada (VOQ)

Fundamento do Método: Uma das técnicas voltamétricas de pulso mais rápidas e sensíveis. Os limites de detecção podem ser comparados aos das técnicas cromatográficas e espectroscópicas, além disso, uma das principais vantagens é a compensação da corrente capacitiva residual. A VOQ parte de uma variação de potencial na forma de onda, aliada a uma rampa de potencial em forma de escada, gerando assim um pico simétrico que pode ser utilizado com sucesso para determinações analíticas. A figura 29 apresenta o esquema básico para a VOQ, onde:

- 1) representa a aplicação de potencial na forma de onda quadrada;
- 2) a variação do potencial na forma de uma escada;
- 3) onda quadrada aliada à variação na forma de escada;
- 4) corrente total derivada.

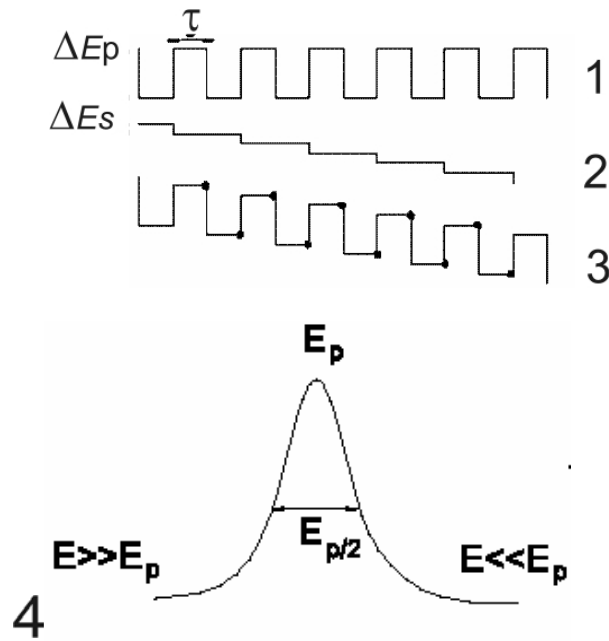


Figura 29: Voltametria de Onda Quadrada. 1, 2 e 3 – Esquema de aplicação de potenciais; 4 – Perfil corrente-potencial esquemático.

Seguem abaixo modelos de voltamogramas de onda quadrada representando um processo redox de um sistema reversível e irreversível, respectivamente (Figura 30).

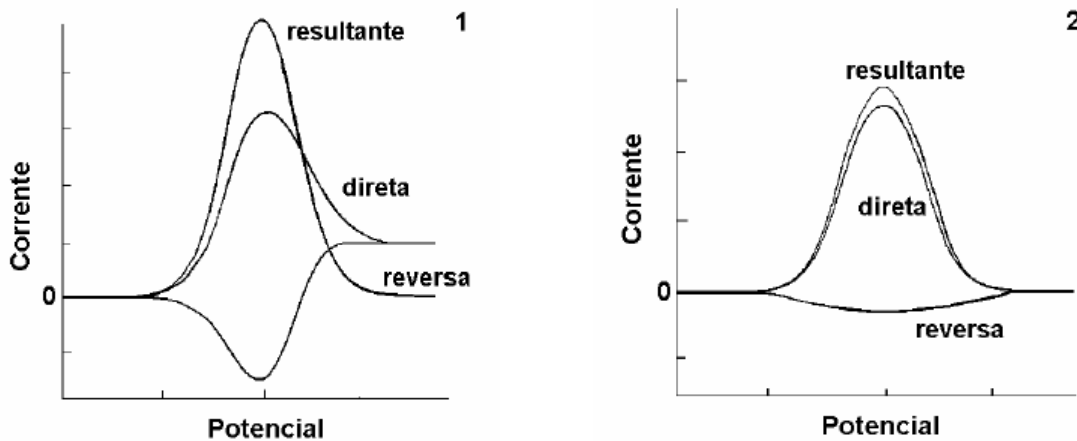


Figura 30: Voltametria de Onda Quadrada. Representações de: (1) processo reversível; (2) processo irreversível.

Procedimento experimental: Os experimentos de Voltametria de Pulso Diferencial foram realizadas em meios prótico e aprótico já citados nos itens III.2.1 e III.2.2.

III.4 – 4 – ESR (Ressonância de Spin do Elétron) - Acoplada a Voltametria Cíclica – Espectroeletróquímica.

Todos os experimentos de espectroeletróquímica foram resultado de uma colaboração com o professor Carlos Frontana, do Departamento de Química da Universidade do México e foram realizados por ele e seu grupo.

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 (Carey, 2007). Pode comprovar a estrutura estática de sistemas sólidos e líquidos e é também muito utilizada no estudo de processos dinâmicos (Weil *et al*, 1994). Sendo de grande aplicabilidade e de extrema importância para definições mecanísticas em eletroquímica.

Procedimento experimental: O espectro de ESR foi realizado em banda de raio X (9,85 GHz), usando um instrumento ELEXSYS 500 com uma cavidade retangular TE₁₀₂, e uma cela para espectroeletróquímica comercial (Wilma[®]). A medida espectroeletróquímica foi realizada com auxílio de um potenciostato/galvanostato (PGSTAT 30) para geração dos radicais a serem caracterizados, para isto utilizou-se platina como eletrodo de trabalho ($\approx 0,2 \text{ cm}^2$) e também como contra eletrodo ($2,5 \text{ cm}^2$). Ag/AgNO₃ + 0,1 mol L⁻¹ foi utilizado como referência.

III.5 – Estudos Farmacológicos

III.5 – 1 – Materiais utilizados e equipamentos

Agitador de placa, M L W, modelo Thys 2.

Agitador de tubo (Vortex) – AD 8850.

Balança Analítica GEHAKA AG 200.

Banho-Maria – MOD. DELLTA, 105 DI.

Centrífuga Centimicro FANEM Modelo 212.

Centrífuga de lâminas Shandon Shoutern Cytospin.

Centrífuga de placas Eppendorf Modelo Centrifuge 5403.

Citômetro de fluxo, Guava EasyCyte Mini System.

Contador Manual – Blood Cell Counter Export – DB – Division of Bexton, Dickinsonand Company.

Cuba de Eletroforese – Bio Rad (DNA sub cell gel). Fonte Modelo 250 – Life Technologies.

Deonizador de água Mili-Q – Millipore.

Espectrofotômetro de placas – DTX 880 multimode detector, Beckman Coulter.

Fluxo Laminar VECO.

Forno de Microondas – Panasonic

Freezer – Prosdócimo

Frascos para cultura de células Corning

Geladeira – Prosdócimo

Incubadora de células (CO2 Water-Jacket Incubator) NUAIRES TS Autoflow

Máquina Fotográfica Digital, Olympus C-7070.

Microscópio de Fluorescência, Olympus BX41.

Microscópio óptico de inversão, Nikon Diaphot.

Microscópio óptico Metripex Hungray PZO-Labimex Modelo Studar lab

Termomixer eppendorf

pHmetro, Micronal B474

Pipetas automáticas, Gilson.

III.5 – 2 – Soluções utilizadas**Tabela 3:** Soluções utilizadas nos ensaios farmacológicos.

NOMES	CONCENTRAÇÕES	MARCA
Acridina laranja	100 µg/mL	Fluka
Anticorpo anti-BrdU	1 µL de anticorpo anti - BrdU	Sigma
Anticorpo Anti - BrdU	BSA 5% q.s.p. 500 µL de solução	Dako
BrdU	10mM	Sigma
Azul de tripan	10%	Sigma
Brometo de etídio	100 µg/mL	Sigma
Diaminobenzidina (DAB)	1 mL de Tris-Hcl (Tris 0,05M) pH=7,6 2 µL de H ₂ O ₂	Imunotech Proquímios
DMSO	10%	Vetec
Brometo de etídio	100 µg/mL	Sigma
Eosina	0,5%	Vetec
Estreptavidina - peroxidase	1 µL em BSA 5% q.s.p.100µL de solução	Dako Dako
Etanol	70%	Vetec
Gentamicina	5mg/mL	Sigma
Hematoxilina	0,1%	Doles
Iodeto de propídeo (PI)	50 µg/mL	Sigma
Iodeto de propídeo (PI) triton X-100 e citrato de sódio.	50 µg/mL + 0,2% + 0,1%	Sigma

KCl	0,5M	Labsynth
Meio de cultura de células RPMI 1640	Diluído em água deionizada, filtrado e complementado com 10% SBF, 1% glutamina, 1% de antibióticos, 1% de bicarbonato de sódio (0,75%) e 25mM de HEPES	Cultilab
MTT	5 mg/mL	Sigma
Penicilina – estreptomicina	Penicilina 10.000 U.I./mL Streptomicina 10mg/mL	Cultilab
Rodamina 123	1 mg/mL	Sigma
Solução desnaturante (para análise de incorporação de BrdU)	Formamida 70% 2x SSC (pH=6,5-7,5 a 70°C)	Vetec
Solução salina + CaCl ₂	0,85% + 10mM	Vetec
Solução salina	0,9%	Vetec
Soro fetal bovino (SFB)	-	Cultilab
Tampão fosfato (PBS)	8,766 g de Cloreto de sódio 2,14 g de NaHPO ₄ .7H ₂ O 0,276 g de NaHPO ₄ .H ₂ O H ₂ O q.s.p. 1 L de solução (pH = 7,2)	Labsynth
Tampão Tris (TBS) 10X	Cloreto de sódio 1,5 M Tris 0,5 M (pH= 7,6) H ₂ O.	
Triton X -100	1%	Isofar

III.5 – 3 – Reagentes

Ácido Acético	Merck
Agarose baixo ponto de fusão	Gibco
Agarose ponto de fusão normal	Gibco
Bicarbonato de Sódio	Dinâmica
Brometo de Etídio	Sigma
Cloreto de sódio	Vetec
DMSO	Vetec
Etanol	Vetec
Formamida	Vetec
Laranja de Acridina	Sigma
Parafina	-
Peróxido de Hidrogênio	Merck
Doxorrubicina	Sigma

III.5 – 4 – Experimental

III.5 – 4.1 – Estudo da citotoxicidade *in vitro*

Tabela 4: Linhagens celulares tumorais utilizadas nos ensaios de citotoxicidade *in vitro*.

Linhagem Celular	Tipo Histológico do Câncer de Origem*	Concentração de Plaqueamento (Células/mL)**
HL-60	Leucemia promielocítica humana	$0,3 \times 10^6$
MDA MB-435	Melanoma Humano	$0,1 \times 10^6$
SF-295	Glioblastoma Humano	$0,1 \times 10^6$
HCT-8	Carcinoma de Cólon Humano	$0,7 \times 10^6$
PC-3	Carcinoma de Próstata Humano	$0,1 \times 10^5$

*Procedência das Células – Nacional Cancer Institute – USA.

** Meio utilizado = RPMI.

III.5 – 4.2 – Manutenção das células.

As células foram cultivada em garrafas para cultura de células (75 cm³, volume de 250 mL), o meio utilizado foi RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5 % de CO₂ a 37° C. Diariamente acompanhava-se o crescimento celular com a utilização de microscópio de inversão. O meio era trocado sempre que o crescimento celular atingia confluência necessária para renovação de nutrientes. Para a manutenção de células aderidas utilizou-se tripsina (0,25%) para que as células despregassem-se das paredes das garrafas.

III.5 – 4.3 – Teste de citotoxicidade *in vitro* – Ensaio do MTT

Fundamento do Método: O ensaio consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H brometo de tetrazolium (MTT) para formazan, pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria de células viáveis (Mosmann *et al*,1983), permitindo dessa forma quantificar a porcentagem de células vivas.

Procedimento Experimental: As células em suspensão (HL-60) foram distribuídas em multiplacas de 96 cavidades numa densidade de $0,3 \times 10^6$ células/mL. A substância teste foi incubada (em diferentes concentrações) durante 72 horas juntamente com a suspensão de células. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15min), e o sobrenadante foi descartado. Cada cavidade recebeu 200 μ L da solução de MTT (10% de meio RPMI 1640) e foi reincubada por 3 horas, em estufa a 37°C e a 5% de CO₂. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (3000 rpm/10 min), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuspensionado em 150 μ L de DMSO. Para a quantificação do sal reduzido (MTT) nas células vivas, as substâncias foram lidas com o auxílio de um espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 550 nm. (Mosmann *et al*,1983).

Análise dos dados: A substância foi testada em diluição seriada, em triplicata. Foi registrado o gráfico absorbância X concentração e determinados suas CI₅₀ (concentração inibitória mínima capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) realizado a partir da regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 4.0 (GraphPad Software).

III.5 – 4.4 – Teste de citotoxicidade *in vitro* – Viabilidade celular por Exclusão por azul de tripan.

Fundamento do Método: O teste de exclusão por azul de tripan permite quantificar separadamente as células viáveis das células mortas pela substância testada. O corante penetra em todas as células, porém somente as células viáveis conseguem bombear o tripan para fora, sendo possível dessa maneira, observar uma coloração azulada nas células metabolicamente inativas (Peres *et al*, 2005).

Procedimento Experimental: A uma alíquota de 90µL da suspensão de células foi adicionado 10µL do azul de tripan. As células viáveis e as não viáveis foram diferenciadas e contadas em câmara de Neubauer, contando-se as células de dois quadrantes diagonalmente opostos. A Doxorrubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo (como descrito por Veras *et al*, 2004).

Análise dos dados: Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de 3 experimentos. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

III.5 – 4.5 – Análise morfológica – Coloração diferencial por Hematoxilina/Eosina.

Fundamento do Método: A coloração por hematoxilina/eosina permite a análise da integridade nuclear, bem como alterações existentes no citoplasma. A hematoxilina é um corante alcalino que tem afinidade por ácidos e pelas proteínas nucleares, conferindo ao núcleo uma coloração azul e a eosina por sua vez, é um corante acidofílico e liga-se ao citoplasma conferindo-lhe uma coloração rósea.

Procedimento experimental: Para observar a morfologia celular, foi utilizada uma alíquota de 100 µL da suspensão celular, a qual foi adicionada a uma centrífuga de lâminas (cytospin). Após a adesão das células nas lâminas elas foram fixadas em etanol absoluto por 1 min., sendo seu excesso retirado em água corrente antes de efetuar a coloração com hematoxilina e eosina.

Análise dos dados: As lâminas foram analisadas em microscópio óptico, para avaliação de suas características morfológicas e comparadas ao controle (não-tratadas). O registro das alterações celulares foi feita por fotografia.

III.5 – 4.6 – Análise morfológica - Coloração por May-Grunwald-Giemsa

Fundamento do método: A coloração utilizada nesse experimento se baseia em interações eletrostáticas entre os corantes e moléculas-alvo. Essa coloração possui azul de metileno (corante básico), eosina (corante ácido), entre outros componentes básicos que permite distinguir o citoplasma e o núcleo, sendo possível analisar a célula quanto a sua integridade nuclear, bem como alterações no citoplasma. Essa técnica é bastante indicada para estudo do padrão de morte celular (apoptose/necrose).

Procedimento Experimental: Células da linhagem HL-60, plaqueadas na concentração de $0,3 \times 10^6$ céls/mL, foram incubadas por 24h com as drogas e examinadas ao microscópio de inversão. A concentração utilizada foi estimada a partir do valor da CI_{50} encontrada no método do MTT para esta mesma linhagem celular. Para observar a morfologia, 50µL da suspensão de células foram adicionadas à centrífuga de lâmina (cytospin). Após a adesão das células na lâmina, a fixação foi feita com metanol por 1 minuto e a coloração por May-Grunwald, por 1minuto e meio, seguida pelo por Giemsa por 10 a 20 minutos.

Análise dos dados: As lâminas contendo as células coradas foram levadas ao microscópio para avaliação das suas características morfológicas e comparadas ao controle (não-tratadas). O registro das alterações celulares foi feito por fotografia.

III.5 – 4.7 – Análise morfológica – Coloração diferencial por Laranja de Acridina / Brometo de Etídio.

Fundamento do Método: O método de contagem diferencial laranja de acridina /brometo de etídio permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose através da contagem diferencial por fluorescência com base em alterações morfológicas nucleares e citoplasmáticas (McGahon *et al*, 1995). Este método baseia-se na revelação das células (controle e tratadas) com a coloração por brometo de etídio (BE) e laranja de acridina (LA) no núcleo. A LA intercala-se ao DNA, conferindo aparência verde ao núcleo celular, sendo capaz de atravessar membranas intactas. O brometo de etídio é incorporado majoritariamente por células não viáveis (com instabilidade de membrana), intercalando-se ao DNA corando-o de laranja; ligando-se fracamente ao RNA, que se mostrará com uma coloração vermelha. As células viáveis com membrana intacta apresentam núcleo uniformemente corado de verde pela LA. O BE marca muito fracamente e às vezes não marca, pois não atravessa a membrana íntegra. As células em apoptose inicial (membrana ainda intacta) apresentam manchas verdes brilhantes no núcleo (condensação da cromatina) e não são marcadas por BE. Podem ser observadas as alterações da membrana em decorrência da formação de corpúsculos apoptóticos. As células em necrose (lesão na membrana) apresentaram um padrão de coloração uniforme, laranja-avermelhada e não há formação de corpos apoptóticos. (Kummar *et al*, 2004).

Procedimento experimental: A suspensão de células controle ou tratadas com J16 foi transferida para um tubo eppendorf e centrifugada por 3 min em baixa rotação. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 20 µL de solução de PBS. Em seguida, 1 µL da solução de BE:LA foi adicionado a cada tubo e uma alíquota dessas células foi transferida para uma lâmina e montado com lamínula para, em seguida, ser contada considerando cada evento celular de interesse. (como descrito em Geng *et al*., 2003).

Análise dos dados: Foram contadas 300 (trezentas) células, em duplicata, cada amostra para quantificação percentual de cada evento celular (viáveis, necróticas e apoptóticas). As lâminas foram montadas e fotografadas para registro visual dos efeitos. Para verificação de ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Dunnett ($p < 0,05$).

III.5 – 4.8 – Síntese de DNA por incorporação de BrDU.

Fundamento do Método: A bromodeoxiuridina (BrDU) é uma base nitrogenada análoga da Timina. Quando as células estão sintetizando DNA o BrDU é incorporado no lugar da timina. A detecção de BrDU incorporado nas células é feita por técnicas de imunohistoquímica.

Procedimento experimental: O BrDU é adicionado 3h antes do término do período de incubação com a substância (21h), para que seja incorporado ao DNA das células em mitose. Após o período 3 horas as lâminas foram preparadas e colocadas para secar por 2h. Após isso foram fixadas em metanol:ácido acético (7:3). As células foram lavadas com tampão Tris (TBS) e incubadas em solução desnaturante por 90 minutos a 60°C e pH 7,4. Após uma segunda lavagem com TBS, as células foram circuladas com caneta hidrofóbica e incubadas com anticorpo primário durante a noite em câmara úmida. As células foram incubadas com anticorpo biotinado / 20 minutos e, em seguida, com a solução de estreptavidina-fluoresceína por mais 20 minutos. Foi adicionado o cromógeno diaminobenzidina (DAB) por 1-5 min e em seguida, removido com água destilada. A contracoloração é feita com HE a 0,1% (como descrito por Veras *et al*, 2004).

Análise dos resultados: Foram contadas as 200 (duzentas) primeiras células observadas em microscópio óptico. Consideraram-se positivas para proliferação as células de núcleo corado com DAB (coloração marrom) as que incorporaram o BrDU e, negativas as células de núcleo corado com hematoxilina (coloração azul). Os dados (proporção de células marcadas em

marrom e não-marcadas) foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Dunnet ($p < 0,05$).

III.5 – 4.9 – Avaliação farmacológica *in vitro* do potencial genotóxico da nitroquinona – Ensaio do Cometa.

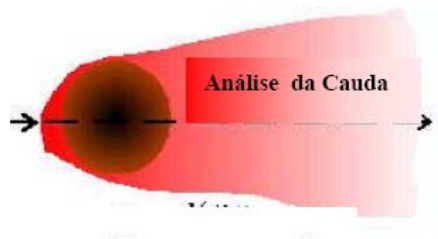
Fundamento do Método: A análise do cometa alcalino (Collins, 2004), avalia a extensão da quebra ao DNA após exposição de linfócitos a substâncias suspeitas de potencial genotóxico. O desenho experimental do estudo do cometa é determinado pela proposta da análise levando em consideração a investigação do dano.

Procedimento Experimental: Foram usadas as concentrações de composto **5** de acordo com sua CI_{50} . Como controle positivo foi utilizada doxorrubicina 0,3 μ g/mL. Como controle negativo foram utilizadas as células (HL-60) sem a exposição de nenhuma substância. Das amostras dos tratadas com **5** e as dos controles positivo e negativo, foi retirada uma alíquota de 10 μ L de linfócitos, a qual foi adicionada a 110 μ L de agarose 1,5%. As lâminas foram previamente cobertas com 110 μ L de agarose (NMP) a 60° C, sendo mantida a temperatura ambiente por 24h até a solidificação da agarose. As amostras estudadas foram colocadas sobre a lâmina, sendo, em seguida, cobertas com lamínulas para uniformizar a distribuição do material e mantidas a 4°C para solidificação da agarose. As lâminas foram mergulhadas na solução de lise (no escuro) e em seguida foram removidas da solução de lise, e neutralizadas por 15min na solução de neutralização. Em seguida foram dispostas na cuba de eletroforese e preenchida com tampão de corrida por 40min para permitir o desempacotamento do DNA. A eletroforese foi conduzida em baixa luminosidade por 20 min, usando 25V (volts) e a corrente de 300mA. Após eletroforese as lâminas, foram retiradas e mergulhadas na solução de neutralização durante 5 min, para neutralizar a alcalinidade.

Análise dos dados: As lâminas foram fixadas em etanol 100%. Posteriormente, aplicou-se 30µL da solução de Brometo de Etídio (20µg/mL) e foram cobertas com lamínula, sendo analisadas em microscópio de fluorescência. A análise foi realizada de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa (Figura 29). Foram, contados 50 cometas/lâmina e classificados, de acordo com a percentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de quebra do DNA, de acordo com a Figura 29. Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de experimentos. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) no programa GraphPad Prisma versão 4.0.

0 = sem danos (<5%)

- 1 = baixo nível de danos (5 – 20%)
- 2 = médio nível de danos (20 – 40%)
- 3 = alto nível de danos (40 – 95%)
- 4 = dano total (95%)



O índice de dano (ID) foi obtido em pela seguinte fórmula: $ID = 400 - \sum \text{Scores}$

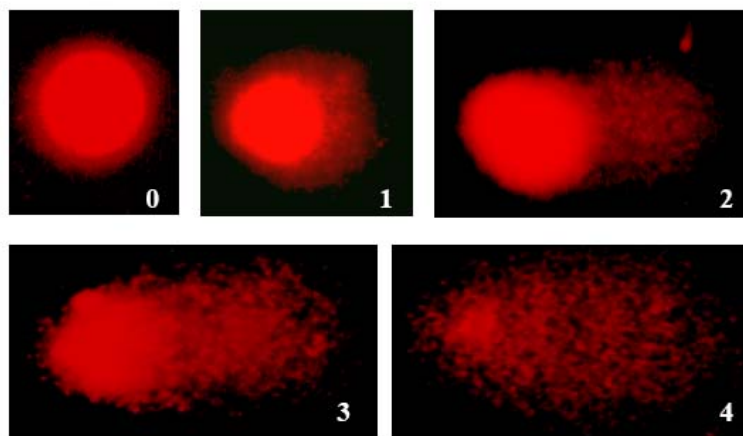


Figura 31: Tipos de cometas: Representação dos cometas corados com brometo de etídio e visualizados no microscópio de fluorescência, sendo indicado o escore atribuído para cada cometa de acordo com o dano. Adaptado de Collins *et al*, 2004.

III.5 – 4.10 – Análises por citometria de fluxo.

A Citometria de Fluxo é uma técnica utilizada para se determinar diferentes características das partículas biológicas. O citômetro de fluxo analisa as células (ou partículas) em meio líquido que passam por um capilar e são irradiadas por uma fonte de luz. O princípio da citometria de fluxo se baseia no fato de que, quando a luz da fonte de excitação incide nas partículas em movimento, a luz é desviada e ocorre emissão de fluorescência que é detectada por filtros de detecção adequados para determinados comprimentos de onda. O desvio da luz está relacionado diretamente com a estrutura e morfologia das células. A capacidade do citômetro em processar milhares de eventos individuais em questão de segundos torna a citometria de fluxo uma ferramenta das mais importantes em estudos farmacológicos (Peres *et al*, 2005; Shapiro *et al*, 1995; Givan *et al*, 2000).

Os estudos utilizando citometria de fluxo foram realizados em células HL-60, na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL, não tratadas (controle negativo) ou tratadas por 24h com a nitroquinona (0,5, 1,0 e 2,0 $\mu\text{g/mL}$) e doxorubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) (como controle positivo).

As concentrações da nitroquinona utilizadas foram estimadas a partir do valor da CI_{50} encontrada no método do MTT para esta mesma linhagem celular após incubação por 72 horas.

Três tipos de análises foram realizadas com o intuito de contribuir para o esclarecimento do mecanismo de ação citotóxica da nitroquinona.

1º) Determinação da integridade da membrana celular por Citometria de Fluxo - Viabilidade Celular.

Fundamento do Método: As células em apoptose mantêm suas membranas íntegras durante quase todo o processo até a sua morte, diferentemente daquelas necróticas. Este ensaio se baseia na capacidade de o iodeto de propídeo (PI), hidrofílico, penetrar apenas nas células cujas membranas estejam rompidas e emitir alta fluorescência vermelha somente quando excitado pelo laser de argônio (488 nm) e estiver ligado ao DNA. As células

cujas membranas permanecem íntegras emitem menor fluorescência. Deste modo, este método permite avaliar a viabilidade celular através da verificação da integridade da membrana plasmática. (Shapiro *et al*, 1995).

Procedimento Experimental: Uma alíquota de 100 μ L de suspensão de células tratadas e não tratadas foi incubada com 100 μ L de uma solução de PI a 50 μ g/mL (diluído em PBS). Após 5 minutos, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo. Foram obtidas informações sobre morfologia celular (espalhamento frontal, tamanho relativo entre as células, e lateral, granulosidade relativa entre as células) e integridade de membrana utilizando-se o filtro para o espectro do vermelho.

Análise dos dados: Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de n=3 experimentos. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) no programa GraphPad Prisma versão 4.0.

2º) Análise do Ciclo Celular e Fragmentação de DNA.

Fundamento do Método: Esse ensaio igualmente se baseia na capacidade de o iodeto de propídio (PI) se ligar ao DNA. Inicialmente a membrana plasmática foi lisada (Triton X-100) para que o PI pudesse se ligar a todo o DNA das células. A intensidade de fluorescência emitida é diretamente proporcional a quantidade de DNA existente na célula, permitindo assim diferenciar DNA celular (e suas diferentes nas fases do ciclo - G1, S e G2) de DNA fragmentado. (Shapiro *et al*, 1995).

Procedimento experimental: A uma alíquota de 100 μ L de suspensão de células tratadas e não tratadas foi adicionado 100 μ L de uma solução de PI a 50 μ g/mL (diluído em PBS) contendo triton X-100 a 0,2% e citrato de sódio a 0,1%.

Após 30 minutos de incubação na ausência de luz, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo utilizando o filtro vermelho.

Análise dos dados: Os histogramas de ciclo celular plotados como intensidade de fluorescência vermelha (eixo x) *versus* número de células (eixo y) foram analisados no programa ModFit LT 3.1 com a ferramenta *synchronization wizard*.

3º) Determinação do Potencial Transmembrânico da Mitocôndria.

Fundamento do Método: A mitocôndria é responsável pela iniciação da via intrínseca da apoptose. Quando bcl-2/xl é liberado da membrana externa da mitocôndria, forma-se um poro permitindo a saída de H⁺, causando despolarização mitocondrial, e também de fatores como citocromo c, Smac/Diablo dentre outros. O bcl-2 e os fatores liberados no citoplasma são sinais para ativação da via intrínseca (Hengartner *et al*, 2000). A rodamina 123, um corante fluorescente nucleofílico, é seqüestrado pra dentro da mitocôndria quando esta apresenta seu potencial transmembrânico inalterado. Assim, as células viáveis emitirão alta fluorescência verde devido à maior quantidade de rodamina 123 ligada às cargas positivas internas, enquanto que as mitocôndrias despolarizadas terão menor afinidade pelo corante, gerando eventos que emitirão menor fluorescência (Givan *et al*, 2000). Deste modo, este ensaio foi utilizado para a investigação da ativação da via apoptótica intrínseca por parte da nitroquinona através da observação da alteração do potencial transmembrânico mitocondrial.

Procedimento experimental: A uma alíquota de 100µL de suspensão de células tratadas e não tratadas foi adicionado 200µL de uma solução de rodamina 123 diluída na concentração de 1 µg/mL (diluído em PBS). Após 15 minutos de incubação na ausência de luz a 37°C, as amostras foram lavadas com PBS, reincubadas por 30 minutos e então analisadas por citometria de fluxo utilizando o filtro verde

Análise dos dados: Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de $n = 3$ experimentos. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) no programa GraphPad Prisma versão 4.0.

Resultados e Discussões

IV – Resultados e Discussões

Os resultados descritos, a seguir, referem-se aos estudos eletroquímicos e farmacológicos *in vitro* de quinonas heterocíclicas, como também, relatam os resultados referentes à adaptação da metodologia do biossensor de DNA (Wang *et al.*, 2006), para o estudo bioeletroquímico da interação de derivados de acridinas insolúveis com o DNA.

As quinonas heterocíclicas foram estudadas quanto a sua atividade citotóxica. Já, o composto **5** (Nitroquinona, página 42) foi o escolhido para os estudos farmacológicos mais aprofundados, visando propor o mecanismo de ação farmacológica. Esse composto foi também estudado quanto à determinação de seu mecanismo de redução eletroquímica por meio de métodos espectroeletroquímicos, experimentais e teóricos (ESR acoplado à voltametria cíclica). Tanto os estudos teóricos, quanto os estudos de ESR foram realizados em colaboração, com o grupo do professor Carlos Frontana do Departamento de Química, Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508. San Pedro Zacatenco, C. P. 07360. México.

A escolha do composto **5** teve como fundamento a presença de dois grupos químicos na molécula, especificamente pelos fatos dos quais serem farmacóforos e eletroativos, além disso, devido ao comportamento eletroquímico do derivado, e do seu valor de CI_{50} obtido no teste do MTT, o qual foi próximo ao valor de CI_{50} do controle positivo (doxorubicina), no tempo de 24 horas.

IV.1 – Estudos Eletroquímicos

IV.1 – 1 – Meio Aprótico

SÉRIE 1

As quinonas heterocíclicas da série 1, de maneira geral, apresentaram comportamento eletroquímico típico de quinonas em meio aprótico, consistindo de duas ondas de redução, sendo a primeira delas de caráter quase-reversível, provavelmente relacionado à formação da semiquinona, pois semiquinonas (Q^{\bullet}) são geradas por redução envolvendo um elétron, em meio aprótico. A primeira etapa de redução tem características de reversibilidade (Jeftic *et al.*, 1970). A semiquinona não é suficientemente básica para ser protonada, entretanto, o diânion radical formado no segundo passo de redução tem caráter mais básico e, conseqüentemente é mais reativo que a semiquinona e, portanto, passível de sofrer reações de desproporcionamento (Chambers *et al.*, 1988) ou reações ácido-base. O comportamento eletroquímico evidenciado para os compostos da série 1, principalmente em relação à segunda etapa de redução é compatível com esses fatos.

Os estudos voltamétricos (VC) dos compostos da série 1 (Figura 32), em meio aprótico (DMSO/TBAP 0,1 mol L⁻¹), apresentaram duas ondas de redução (I_c e II_c , respectivamente), com características de processos quase-reversível observados pela presença de ondas anódicas correspondentes à primeira etapa de redução (I_a), sendo a onda II_a , para a maioria dos compostos, pouco definida. Os valores de intensidade de corrente obtidos a partir do estudo voltamétrico em função da velocidade de varredura ($I_{p,c} f(\nu)$) demonstraram que o transporte de massas através da solução, o qual rege a chegada da substância à superfície eletródica, é de natureza difusional. A análise do potencial de redução de primeira onda em função do log da velocidade de varredura ($E_{p,c} f(\log \nu)$), juntamente com a presença do pico reverso indica que a primeira etapa de redução é de natureza quase-reversível, conforme testes diagnósticos bem definidos (Gordillo *et al.*, 2000) (Southampton Electrochemistry Group).

A figura 32 mostra os voltamogramas (meio aprótico, DMSO/TBAP 0,1 mol L⁻¹, eletrodo de carbono vítreo vs Ag/AgCl/Cl⁻) referentes aos compostos da série 1 e permite sua comparação. Os estudos foram realizados em função da velocidade de varredura (variação de ν), entretanto para fins demonstrativos, como também para fins de comparação com a atividade biológica (Epc), os voltamogramas estão apresentados na velocidade de varredura (μ) de 100 mV s⁻¹.

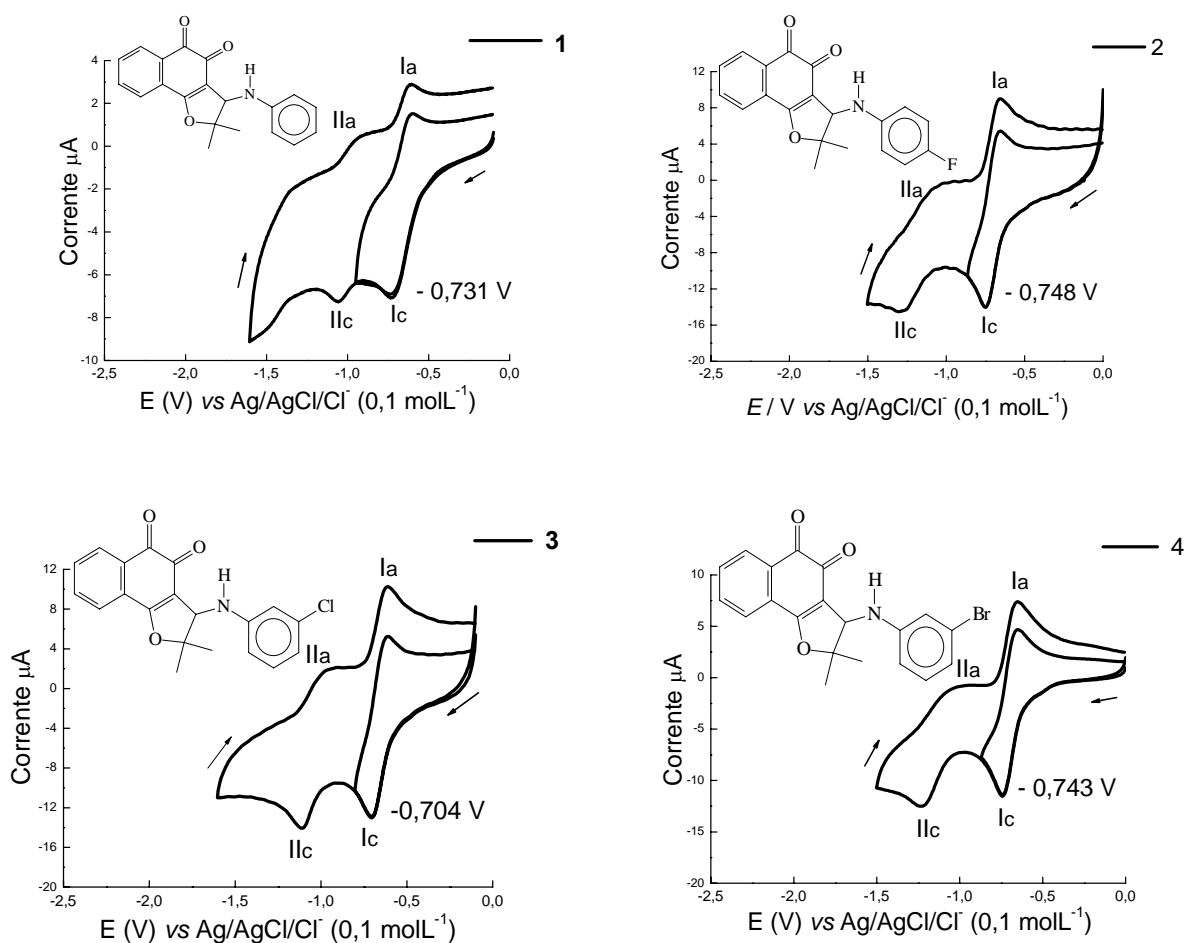


Figura 32. Voltamogramas cíclicos dos compostos da série 1 (exceto composto 5, 3 mmol L⁻¹) em DMSO/TBAP (0,1 mol L⁻¹). Eletrodo de CV. $\nu = 100$ mVs⁻¹. E / V vs Ag/AgCl/Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹).

Em seguida encontram-se os gráficos: valores de intensidade de corrente em função da velocidade de varredura ($I_{pIc} f(\nu)$) (Figuras 33-36a) e da análise do potencial de redução de primeira onda (Ic) em função do log da velocidade de

varredura [$E_{p_{lc}} f(\log \nu)$] (Figura 33-36b) para cada composto, como também, as tabelas onde estão apresentados os resultados correspondentes aos parâmetros eletroquímicos obtidos do estudo em função da velocidade de varredura (ν) para cada composto, individualmente.

IV.1 – 1.1 – Composto 1

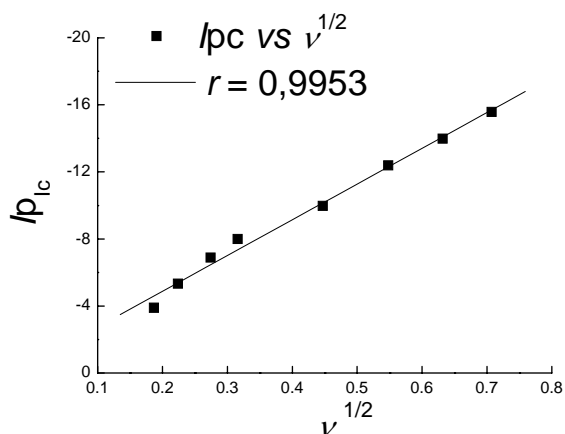


Figura 33a. Análise do transporte de massa da VC $f(\nu)$ do composto **1**, l_{pc} vs $\nu^{1/2}$. Eletrodo de CV. E / V vs $Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

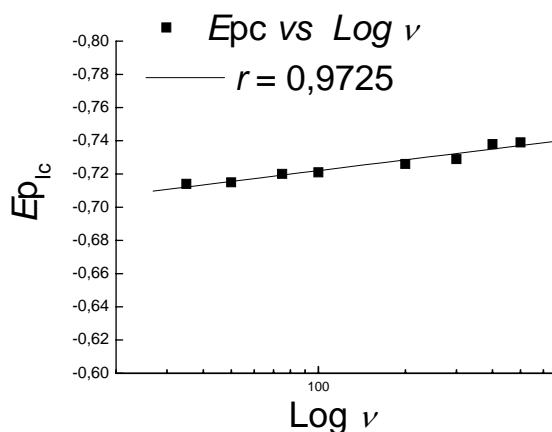


Figura 33b: Gráfico de $E_{p_{lc}}$ vs $\log \nu$ ($0,035$ a $0,5 \text{ Vs}^{-1}$) do composto **1** ($\text{DMSO/TBAP } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$), em eletrodo de CV; $c = 3 \text{ mmol L}^{-1}$. E / V vs $Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

Tabela 5: Parâmetros eletroquímicos obtidos para o composto **1**. Estudo em função da velocidade de varredura. E_{pc} vs $Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

$\nu (\text{mV s}^{-1})$	$E_{pc} (\text{V})$	l_{pc}	$E_{pc} - E_{pc}^{1/2}$	$E_{pc}^{1/2}$	$E_{pl} (\text{V})$
35	-0,714	-3,89	- 0,111	-0,603	-0,606
50	-0,715	-5,33	- 0,111	-0,604	-0,605
75	-0,720	-6,89	- 0,117	-0,603	-0,608
100	-0,721	-7,99	- 0,117	-0,604	-0,608
200	-0,726	-9,97	- 0,120	-0,606	-0,611
300	-0,729	-12,39	- 0,121	-0,608	-0,611
400	-0,738	-13,98	- 0,129	-0,609	-0,612
500	-0,739	-15,58	- 0,131	-0,608	-0,614

IV.1 – 1.2 – Composto 2

Os gráficos da relação entre os valores de intensidade de corrente em função da velocidade de varredura [$i_{p_{lc}} f(\nu)$] para a primeira onda do composto **2** (Figuras 34a e b) e da análise do potencial de redução de primeira onda em função do log da velocidade de varredura ($E_{p_{lc}} f(\log \nu)$), em seguida, a tabela 6 contém os resultados correspondentes aos parâmetros eletroquímicos obtidos para este composto.

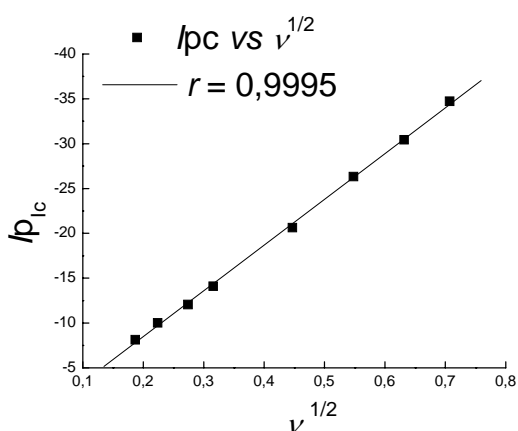


Figura 34a. Análise do transporte de massa, em VC $f(\nu)$ do composto **2**, $i_{p_{lc}} vs \nu^{1/2}$. Eletrodo de CV. $E / V vs Ag/AgCl/Cl^- (0,1 mol L^{-1})$.

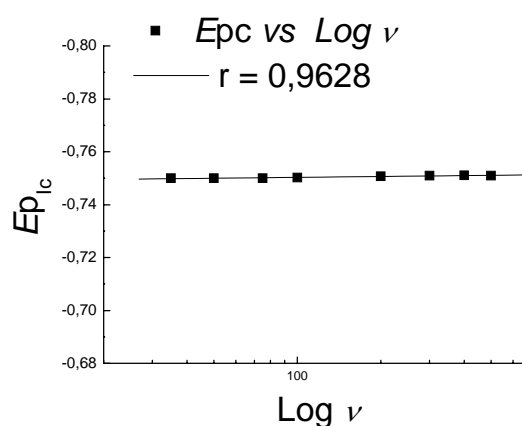


Figura 34b: Gráfico de $E_{p_{lc}} vs \log \nu$ (0,035 a 0,5 Vs^{-1}) do composto **2** (DMSO/TBAP 0,1 $mol L^{-1}$), em eletrodo de CV; $c = 3 mmol L^{-1}$. $E / V vs Ag/AgCl/Cl^- (0,1 mol L^{-1})$.

Tabela 6: Parâmetros eletroquímicos encontrados para o composto **2**. Estudo em função da velocidade de varredura. $E_{p_{lc}} vs Ag/AgCl/Cl^- (0,1 mol L^{-1})$.

ν ($mV s^{-1}$)	$E_{p_{lc}}$ (V)	$i_{p_{lc}}$	$E_{p_{lc}} - E_{p_{lc}}^{1/2}$	$E_{p_{lc}}^{1/2}$	$E_{p_{la}}$ (V)
35	-0,750	-8,14	-0,089	-0,661	-0,655
50	-0,750	-10,02	-0,088	-0,662	-0,654
75	-0,749	-12,05	-0,089	-0,660	-0,653
100	-0,748	-14,09	-0,089	-0,659	-0,654
200	-0,751	-20,63	-0,092	-0,659	-0,652
300	-0,751	-26,34	-0,092	-0,659	-0,652
400	-0,751	-30,43	-0,092	-0,659	-0,651
500	-0,751	-34,73	-0,092	-0,659	-0,651

IV.1 – 1.3 – Composto 3

Gráficos da relação entre os valores de intensidade de corrente em função da velocidade de varredura ($I_{pc} f(\nu)$) para a primeira onda do composto **3** (Figura 35a) e da análise do potencial de redução de primeira onda em função do log da velocidade de varredura ($E_{pc} f(\log \nu)$) (Figura 35b) e a tabela 7 contém os resultados correspondentes aos parâmetros eletroquímicos obtidos para este composto.

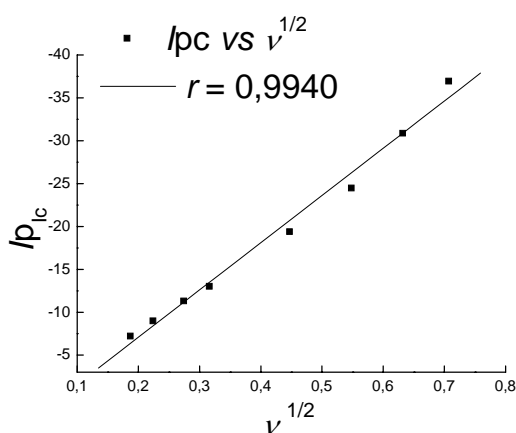


Figura 35a. Análise do transporte de massa da VC $f(\nu)$ do composto **3**, I_{pc} vs $\nu^{1/2}$. Eletrodo de CV. E / V vs $Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

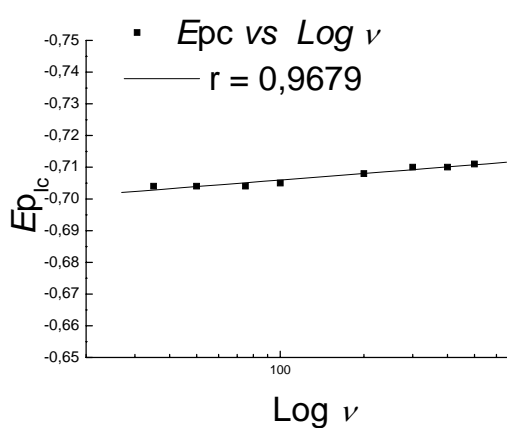


Figura 35b: Gráfico de E_{pc} vs $\log \nu$ ($0,035$ a $0,5 \text{ Vs}^{-1}$) do composto **3** (DMSO/TBAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), em eletrodo de CV; $c = 3 \text{ mmol L}^{-1}$. E / V vs $Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

Tabela 7: Parâmetros eletroquímicos encontrados para o composto **3**. Estudo em função da velocidade de varredura. E_{pc} vs $Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

$\nu (\text{mV s}^{-1})$	$E_{pc} (\text{V})$	I_{pc}	$E_{pc} - E_{pc}^{1/2}$	$E_{pc}^{1/2}$	$E_{pla} (\text{V})$
35	-0,704	-7,22	-0,081	-0,623	-0,599
50	-0,704	-8,98	-0,081	-0,623	-0,599
75	-0,704	-11,31	-0,079	-0,625	-0,601
100	-0,705	-13,03	-0,079	-0,626	-0,611
200	-0,708	-19,40	-0,085	-0,623	-0,601
300	-0,710	-24,48	-0,089	-0,621	-0,599
400	-0,710	-30,88	-0,096	-0,614	-0,595
500	-0,711	-36,94	-0,101	-0,610	-0,593

IV.1 – 1.4 – Composto 4

Gráficos da relação entre os valores de intensidade de corrente em função da velocidade de varredura ($l_{p_{lc}} f(\nu)$) para a primeira onda do composto **4** (Figura 36a) e da análise do potencial de redução de primeira onda em função do log da velocidade de varredura ($E_{p_{lc}} f(\log \nu)$) (Figura 36b) e a tabela 8 contém os resultados correspondentes aos parâmetros eletroquímicos obtidos para este composto.

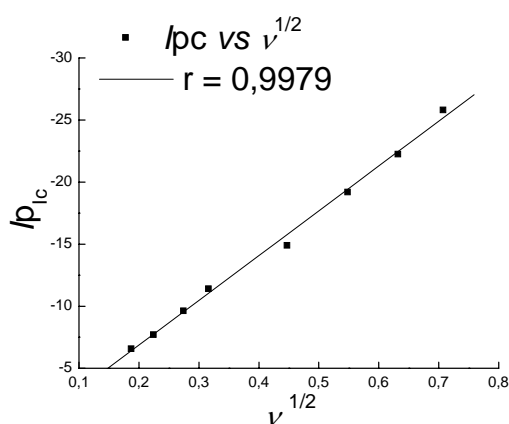


Figura 36a. Análise do transporte de massa da VC $f(\nu)$ do composto **4**, $l_{p_{lc}} vs \nu^{1/2}$. Eletrodo de CV. $E / V vs Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

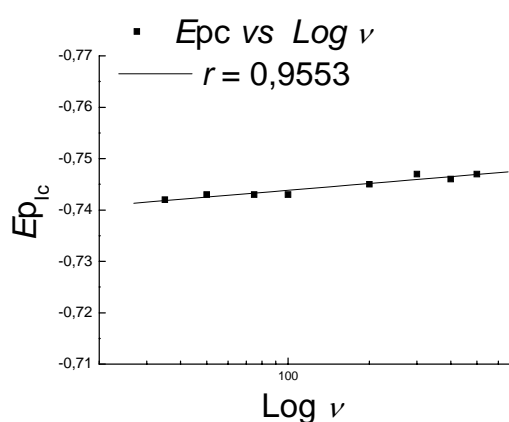


Figura 36b: Gráfico de $E_{p_{lc}} vs \log \nu$ ($0,035$ a $0,5 \text{ Vs}^{-1}$) do composto **4** (DMSO/TBAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), em eletrodo de CV; $c = 3 \text{ mmol L}^{-1}$. $E / V vs Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

Tabela 8: Parâmetros eletroquímicos encontrados para o composto **4**. Estudo em função da velocidade de varredura. $E_{p_{lc}} vs Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

$\nu (\text{mV s}^{-1})$	$E_{p_{lc}} (\text{V})$	$l_{p_{lc}}$	$E_{p_{lc}} - E_{p_{lc}}^{1/2}$	$E_{p_{lc}}^{1/2}$	$E_{p_{la}} (\text{V})$
35	-0,739	-6,58	-0,064	-0,675	-0,656
50	-0,743	-7,72	-0,064	-0,679	-0,655
75	-0,743	-9,64	-0,061	-0,682	-0,653
100	-0,743	-11,41	-0,075	-0,668	-0,650
200	-0,748	-14,91	-0,079	-0,669	-0,650
300	-0,749	-19,20	-0,082	-0,671	-0,650
400	-0,746	-22,26	-0,079	-0,667	-0,642
500	-0,747	-25,81	-0,078	-0,669	-0,641

V.1 – 1.5 – Composto 5

Os estudos voltamétricos evidenciaram para o composto **5**, em meio aprótico (DMSO/TBAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), três ondas de redução. Conforme apresentado na figura 37 (Ic, IIc e IIIc, respectivamente), as duas primeiras apresentam características de reversibilidade observada pela presença de suas correspondentes anódicas (Ia e IIa) e a terceira com características de irreversibilidade. Entre as ondas Ia e IIa, quando o potencial de inversão da varredura é maior que IIIc, pode-se observar uma terceira onda anódica (IIIa').

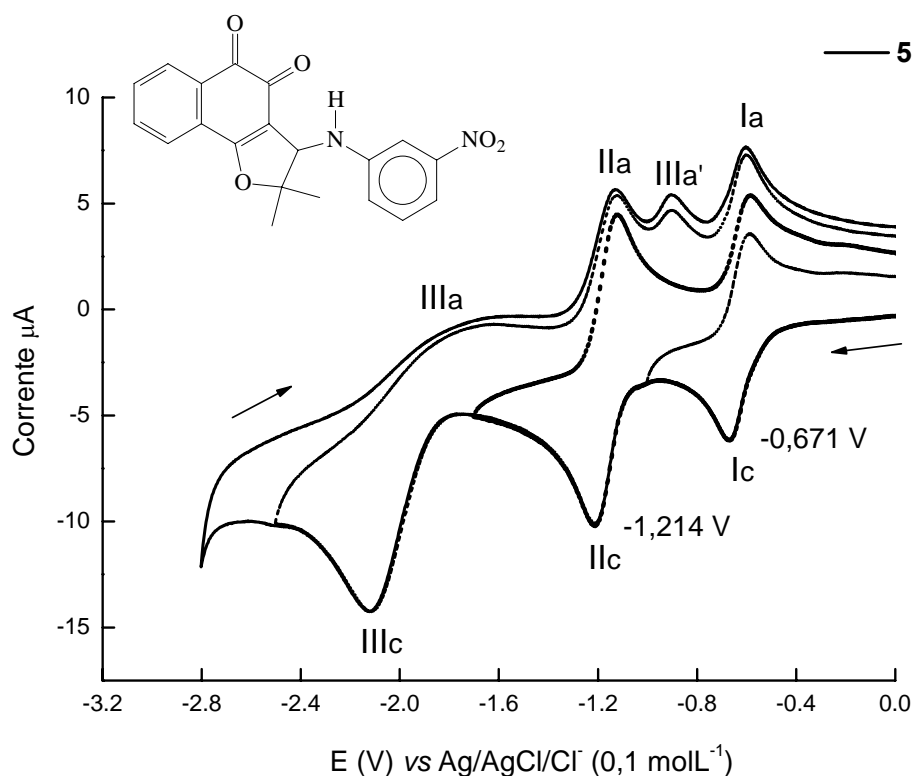


Figura 37. Voltamograma cíclico do composto **5** (3 mmol L^{-1}) em DMSO/TBAP ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de CV. $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$. $E / \text{V vs Ag/AgCl/Cl}^{-}$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

Os valores de intensidade de corrente, para a primeira onda, obtidos a partir do estudo voltamétrico, em função da velocidade de varredura ($i_{p1c} f(\nu)$), (Figura 38a), demonstrou que o transporte de massas pela solução é de natureza difusional. A análise do potencial de redução de primeira onda em função do log da velocidade de varredura ($E_{p1c} f(\log \nu)$) (Figura 38b),

juntamente com a presença do pico reverso dá indícios de que o primeiro processo de redução é de natureza quase-reversível. Todos os parâmetros são listados na tabela 9.

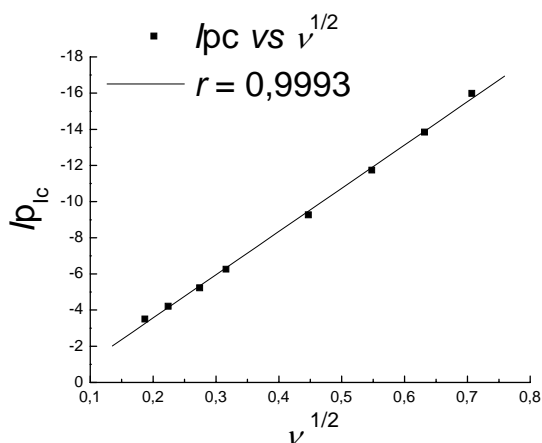


Figura 38a. Análise do transporte de massa da VC $f(v)$ do composto **5**, l_{pc} vs $v^{1/2}$. Eletrodo de CV. E / V vs $Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

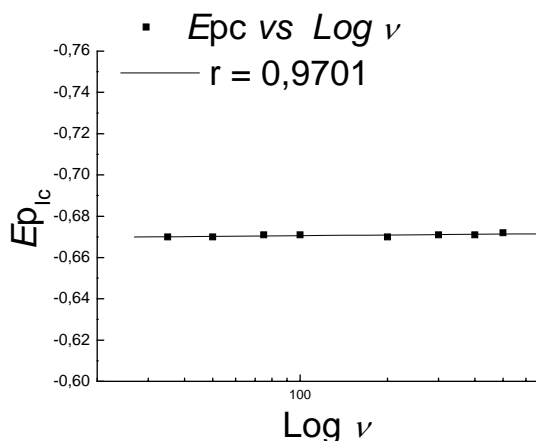


Figura 38b: Gráfico de E_{pc} vs $\log v$ ($0,035$ a $0,5 \text{ Vs}^{-1}$) do composto **5** (DMSO/TBAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), em eletrodo de CV; $c = 3 \text{ mmol L}^{-1}$. E / V vs $Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

Tabela 9: Parâmetros eletroquímicos encontrados para o composto **5**. Estudo em função da velocidade de varredura. E_{pc} vs $Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

v (mV s^{-1})	E_{pc} (V)	l_{pc}	$E_{pc} - E_{pc}^{1/2}$	$E_{pc}^{1/2}$ (V)	E_{pla} (V)	E_{pll} (V)	E_{plla} (V)	E_{plll} (V)	E_{pllla} (V)
35	-0,671	-3,50	-0,067	-0,604	-0,604	-1,214	-1,125	-2,086	-0,909
50	-0,670	-4,21	-0,065	-0,605	-0,605	-1,212	-1,123	-2,089	-0,904
75	-0,672	-5,23	-0,068	-0,604	-0,605	-1,212	-1,133	-2,099	-0,903
100	-0,671	-6,26	-0,071	-0,602	-0,602	-1,214	-1,122	-2,102	-0,895
200	-0,670	-9,27	-0,070	-0,603	-0,603	-1,213	-1,123	-2,100	-0,901
300	-0,671	-11,74	-0,071	-0,604	-0,605	-1,214	-1,125	-2,099	-0,901
400	-0,671	-13,84	-0,071	-0,603	-0,604	-1,213	-1,127	-2,108	-0,903
500	-0,672	-15,98	-0,072	-0,604	-0,605	-1,214	-1,128	-2,109	-0,904

Quando, em voltametria cíclica, foram realizados dois ciclos sucessivos, conforme representado na figura 39, foi possível observar uma quarta onda de redução (IIIc'), intermediária entre Ic e IIc.

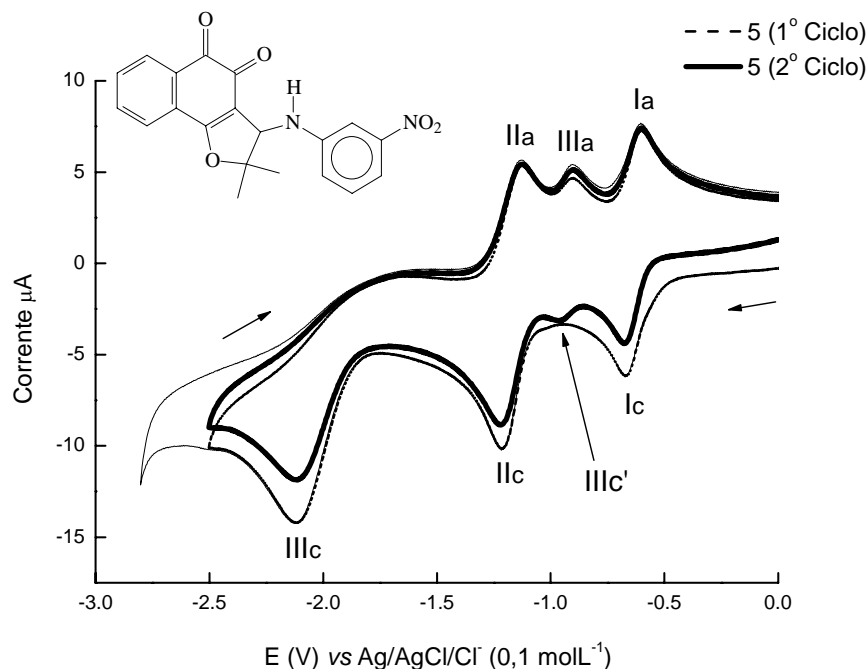


Figura 39. Voltamograma Cíclico do composto **5** (em 2 ciclos) (3 mmol L^{-1}) em DMSO/TBAP ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de CV. $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$. $E / \text{V vs Ag/AgCl/Cl}^- (0,1 \text{ mol L}^{-1})$.

Para facilitar a discussão, o composto **5** será representado como Q-ArNO₂. Conforme já citado, Q e ArNO₂ são eletroativos, sem interação conjugativa entre eles, o mecanismo de redução encontra-se descrito na figura 40.

Após observação das figuras 37 e 39, nota-se que há evidências de comportamento eletroquímico característico de redução de grupos quinona e nitro em meio aprótico, de acordo com a literatura (Cavalcanti *et al.*, 2004^A; Cavalcanti *et al.*, 2004^B; Squela *et al.*, 2005; Tocher *et al.*, 1995; Lund, 2001; Goulart *et al.*, 2007).

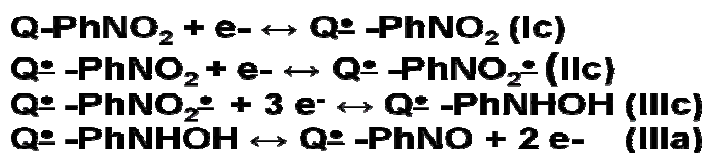


Figura 40: Mecanismo de redução do composto 5. Redução da Quinona e do Nitro em meio aprótico.

No voltamograma apresentado na figura 37, observam-se duas etapas reversíveis de redução (Ic e IIc) anteriores à formação da hidroxilamina na etapa IIIc, o que sugere que uma das ondas Ic ou IIc seria de geração do ânion-radical nitro. As quinonas, em meio aprótico, também são reduzidas em duas etapas, sendo cada uma de um elétron (De Abreu *et al.*, 2005). Dessa forma, faz-se necessário caracterizar a natureza das duas etapas reversíveis de redução (Ic ou IIc), presentes nos voltamogramas (Figura 37 e 39). Estaria a primeira delas relacionada à primeira etapa de redução da quinona, originando $[Q^{\bullet-}]$ -ArNO₂? Ou à redução do nitro, formando $[Q]$ -ArNO₂^{•-}? Outra dúvida seria se haveria formação do diânion da quinona $[Q^{2-}]$ -ArNO₂, na segunda onda.

Para este fim, foram realizados estudos em espectroeletrólise, com o emprego da Ressonância de Spin do Elétron, acoplada à voltametria cíclica, técnicas adequadas para verificar a natureza de radicais eletrogerados.

Para realizar os estudos de espectroeletrólise (México) foi realizado, previamente, um experimento de voltametria cíclica em Acetonitrila/TBAPF₄ (1 mol L⁻¹), conforme representado na Figura 41.

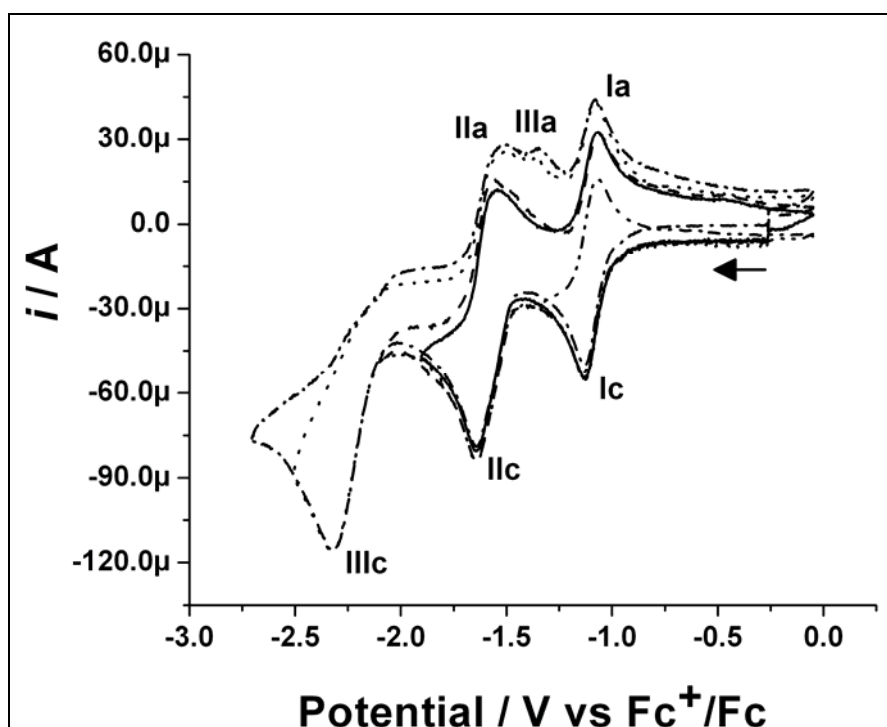


Figura 41. Voltamogramas cíclicos de **5**, $c = 1,2 \text{ mmol L}^{-1}$, em CV ($0,07 \text{ cm}^2$), em $\text{CH}_3\text{CN}/n\text{-Bu}_4\text{NPF}_6$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Voltamogramas obtidos em vários E_λ (potenciais de inversão), v : 100 mV s^{-1} .

A partir do voltamograma obtido em acetonitrila (Figura 41), similar aos obtidos em DMSO/TBAP (Figuras 37 e 39), foram observadas três ondas de redução principais: Ic ($E_{p_{Ic}} = -1.15 \text{ V vs Fc}^+/\text{Fc}$, Ilc ($E_{p_{IIc}} = -1.66 \text{ V vs Fc}^+/\text{Fc}$) and IIIc ($E_{p_{IIIc}} = -2.33 \text{ V vs Fc}^+/\text{Fc}$. Em acetonitrila (Figura 41), nessa velocidade de varredura, a primeira onda (Ic) está associada a Ia, em um processo quase-reversível ($E_{p_{Ia}} - E_{p_{Ic}} = 71 \text{ mV}$); o segundo processo também tem natureza quase-reversível, consistindo dos sinais Ilc e IIa ($E_{p_{IIa}} - E_{p_{IIc}} = 81 \text{ mV}$). Entretanto o pico IIIc mostra comportamento irreversível, caracterizado pela presença de outro pico anódico, em valor de potencial entre os picos IIa and Ia. A intensidade de corrente de IIIa aumenta quando se aumenta o potencial de inversão para valores mais negativos do que IIIc, demonstrando que essa onda (IIIa) está relacionada a oxidação do produto gerado após a última etapa de redução (IIIc). Assim como em DMSO, sabe-se que a onda IIIa está relacionada à oxidação da hidroxilamina, gerada após última etapa de redução (IIIc) do grupo nitro que, em meio aprótico, é reduzido em duas etapas, sendo a primeira, a formação do ânion radical nitro (etapa de 1 elétron) e a segunda etapa e formação da hidroxilamina (etapa onde ocorre a transferência de 3 elétrons, Figura 41).

Diante da forte evidência de que a terceira etapa de redução (IIIc), presente nos voltamogramas, relaciona-se à formação da hidroxilamina, permanece a dúvida em relação à natureza de Ic e Ilc), daí a realização de estudos espectroeletróquímicos.

Após redução do composto **5** ($c = 1,2 \text{ mM}$), em potencial constante entre os picos Ic e Ilc ($E_{ap.} = -1,25 \text{ V vs Fc}^+/\text{Fc}$), um espectro ESR *in-situ* foi detectado (Figura 42). Esse espectro consiste em seis diferentes valores de HFCC (Constante de Acoplamento Hiperfina), os quais estão descritos na Tabela 10. São todos relacionados à interação entre o spin nuclear dos átomos de H com o elétron desemparelhado do ânion radical eletrogerado. Considerando o número dessas interações, a estrutura radicalar observada é típica de um radical semiquinônico, relacionado, portanto à função o-quinona em posição C-4 e C-5 da molécula, observe estrutura molecular numerada na figura 43.

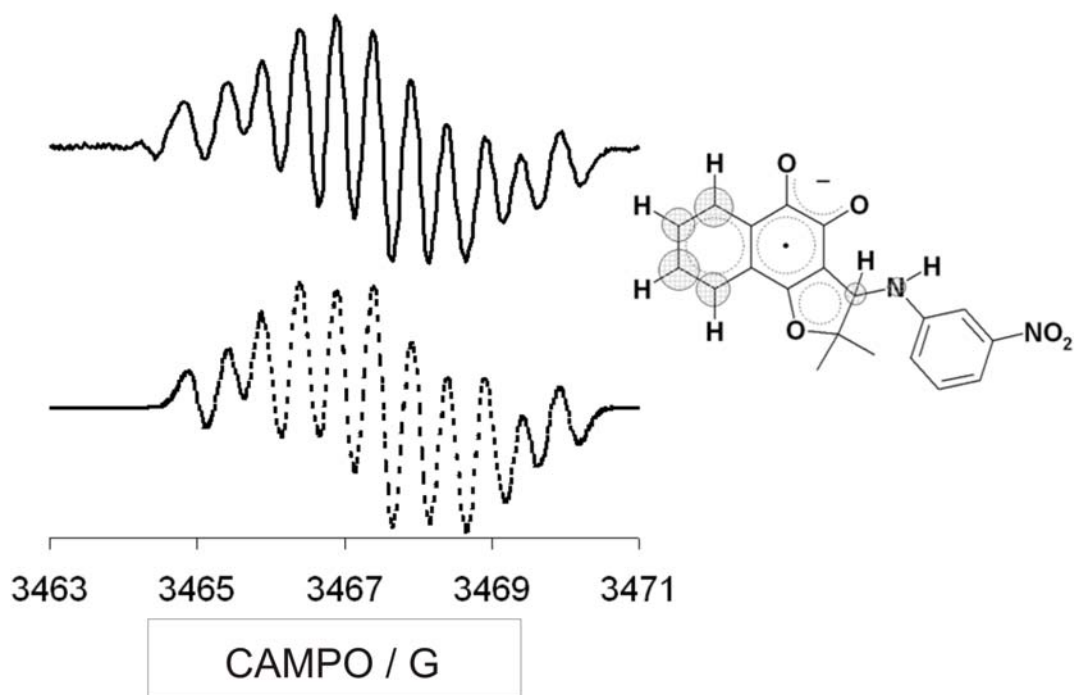


Figura 42: Espectro de ESR do Composto **5** em banda de raio X (9.85 GHz), utilizando um instrumento Bruker ELEXSYS 500 com uma cavidade retangular TE₁₀₂, obtido após eletrólise em potencial constante ($E_{ap} = -1,25$ V vs Fc⁺/Fc).

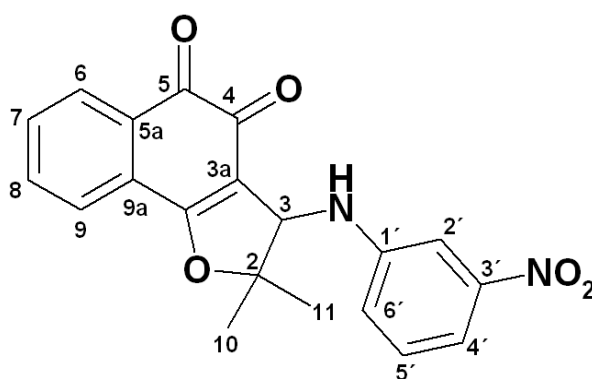


Figura 43: Estrutura numerada do Composto **5**.

Entretanto, a natureza do segundo passo de redução não é facilmente discernível, pois, como já falado anteriormente, na molécula há dois grupos eletroativos, capazes de reduzir, cada um em duas etapas, em geral, com

características de reversibilidade: a quinona com formação da semiquinona (Chambers *et al.*, 1974) e a seguir, com a formação do diânion e o grupo nitroaromático em posição C-3' (Figura 43) com formação do ânion radical do nitro. Uma vez confirmado que o primeiro processo de redução está relacionado à formação da semiquinona, a proposta seguinte prevê o segundo processo de transferência de elétrons no grupo nitroaromático, condizente com os valores de potencial próximos ao valor da onda IIc do voltamograma em acetonitrila (Figura 41) (Peover *et al.*, 1962). Além da referida constatação, baseada na literatura, para realmente discriminar a natureza de ambas as etapas de redução independentes, foi obtido novo espectro de ressonância de spin do elétron, acoplada à voltametria cíclica (espectroeletróquímica), após eletrólise em potencial aplicado, próximo ao segundo pico de redução (IIc) ($E_{ap.} = -1,80 \text{ V vs Fc}^+/\text{Fc}$).

O espectro observado indica a presença de uma segunda estrutura de radical (Figura 44-B) que apresenta um valor de constante de acoplamento hiperfina mais largo, associado à interação de um elétron desemparelhado com o átomo de nitrogênio da função nitroaromática.

A partir disso outra série de valores de HFCC foi também obtido resultante da interação de um elétron desemparelhado com o átomo de hidrogênio presente no anel aromático ligado ao grupo nitro (C-2', C-4', C-5' e C-6') e seus valores estão dispostos na tabela 10.

Tabela 10. Constantes de acoplamento hiperfinas e larguras de banda para o ânion radical obtido (formado pela redução *in situ*) e para a estrutura biânion radical para o composto **5**.

Estrutura do Radical	a_1 / G	a_2 / G	a_3 / G	a_4 / G	a_5 / G	a_6 / G	Γ / G	g
Primeiro ânion radical [‡]	0,59 (H-3)	0,9 (H-6)	1,1 (H-7)	0,89 (H-8)	1,04 (H-9)	0,48 (NH)	0,32	2,002 9
Segundo ânion radical [†]	3,46 (H-2')	3,02 (H-4')	1,03 (H-5')	3,43 (H-6')	10,93 (N-3')	NA	0,16	2,003 2

* Valor de cada Constante Hiperfina Acoplada com o átomo de hidrogênio correspondente está indicado para cada sinal. [‡] Radical obtido *in situ* após

redução a $E = -1,25$ V vs Fc^+/Fc . Radical obtido *in situ* após redução a $E = -1,80$ V vs Fc^+/Fc .

Portanto, o segundo processo de redução observado experimentalmente está relacionado à redução da função nitro, formando o ânion radical nitro e, juntamente com este ânion radical, há também a presença do ânion radical da quinona, conforme visto na simulação da mistura de radicais na Figura 44A-C.

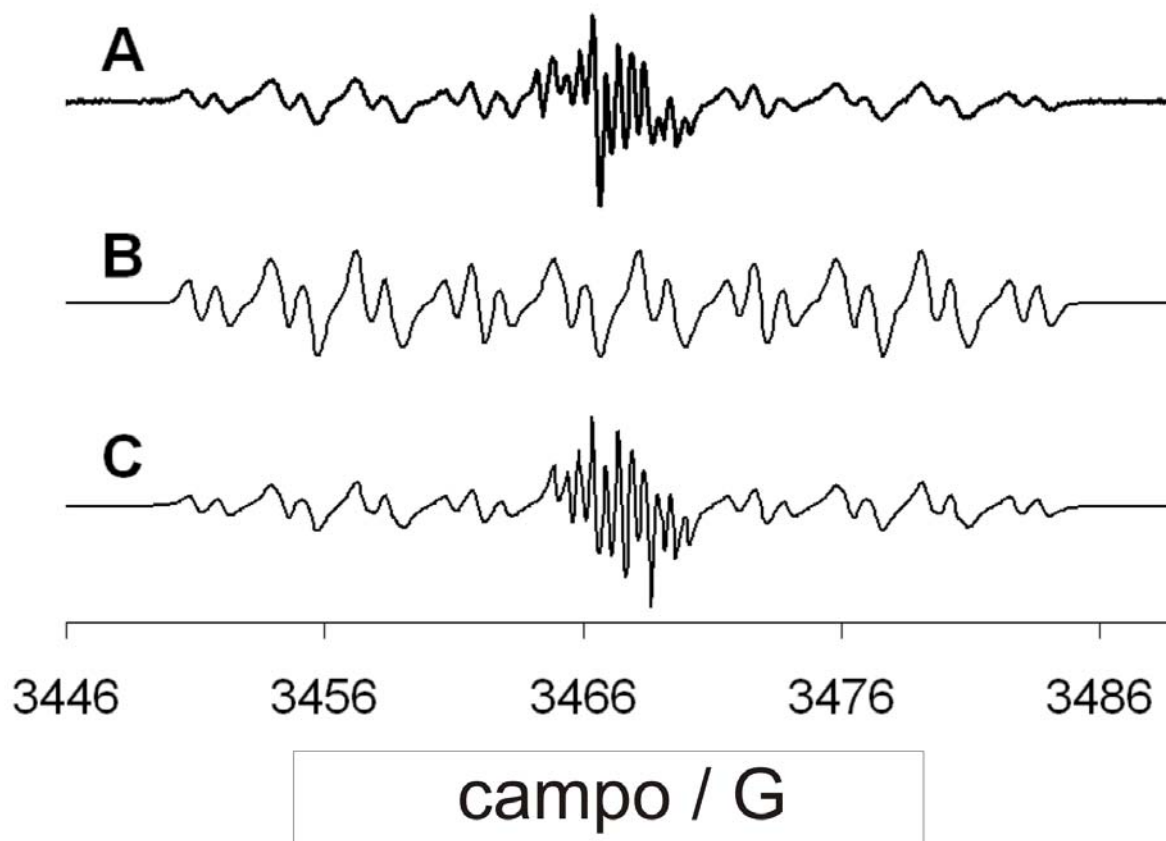


Figura 44: Espectro de ESR para as espécies radiculares eletrogeradas no segundo processo de redução ($E_{ap.} = -1,80$ V vs Fc^+/Fc). (A) Espectro experimental obtido; (B) Espectro teórico obtido por deconvolução do espectro A e (C) Simulação da mistura radicalar obtida dos espectros A e B.

Dessa forma, fica nítida a presença, na segunda etapa de redução, dos dois ânions radicais possíveis: a semiquinona e o ânion radical do nitro, como pode ser observado, na figura 45.

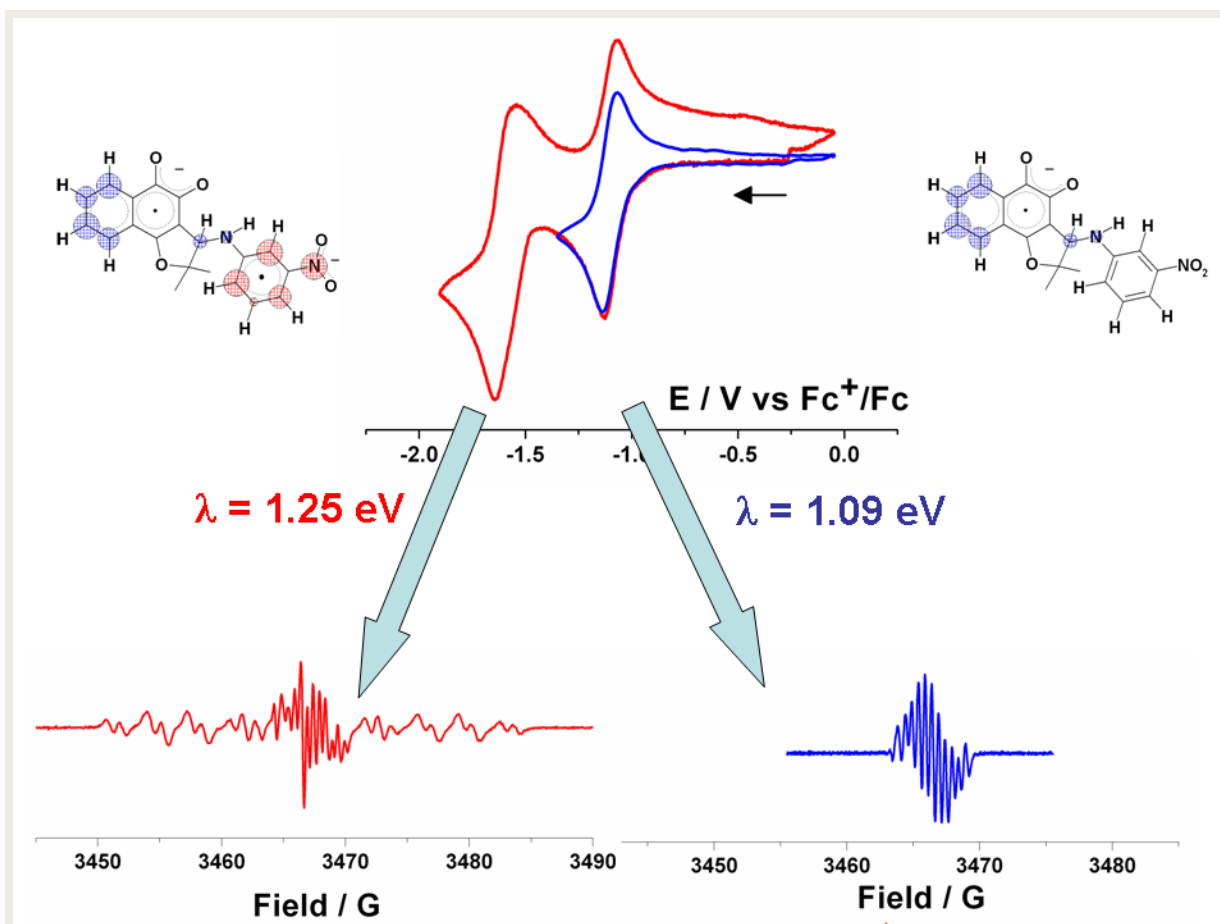


Figura 45: Estruturas radiculares caracterizadas para as duas etapas de redução do composto **5**, com formação da semiquinona e do ânion radical nitro, independentes.

Não há decréscimo da intensidade do primeiro radical eletrogerado, ou seja da semiquinona, o que demonstra que não há redução do ânion radical ao diânion, em valores de potencial próximos a I_{IIc} . Isto sugere que a estabilidade do diânion-diradical (Figura 45) desloca o valor do potencial de redução da semiquinona/diânion quinônico para potenciais mais negativos. No entanto, após redução *in-situ* da espécie $[Q^{\bullet-}]-ArNO_2^{\bullet-}$, em potenciais próximos ao pico I_{IIIc} ($E_{p_{IIIc}} = -2,5 \text{ V vs Fc}^+/Fc$), nota-se que a segunda estrutura biradicalar começa a desaparecer, levando ao registro do ânion radical semiquinônico isolado. Isto indica que, após redução em potencial próximo a I_{IIIc} , a unidade anion radical nitro transforma-se na estrutura triânion-monoradical $[Q^{\bullet-}]-PhNO_2^{2-}$, que sofre um processo químico rápido, compatível com a natureza

irreversível da terceira onda. Esse processo leva à geração da hidroxilamina, cuja oxidação é observada em IIIa, conforme pode ser observado na figura 41 (pág. 81).

SÉRIE 2

Os compostos da série 2, incluindo a azidaquinona precursora (composto **6**. Figura 25, página 43) e seus derivados, moléculas com anéis triazólicos (compostos **7**, **8** e **9**. Figura 25, página 43), de maneira geral, apresentaram comportamento eletroquímico típico de quinonas em meio aprótico. Nesse meio, foi possível observar duas ondas de redução. A primeira delas mostra caráter quase-reversível e está relacionada à formação da semiquinona, (Q^{\bullet}) conforme já foi comentado para os compostos da série 1; a segunda onda é de intensidade de corrente menos acentuada ($|p_{IIc}| < |p_{Ic}|$), mais larga, com diferença significativa entre E_{pIIc} e E_{pIIa} .

Os experimentos realizados por meio de Voltametria Cíclica (VC), em meio aprótico (DMSO/TBAP 0,1 mol L⁻¹), dos compostos da série **2** (Figura 46) são similares aos experimentos de Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) (Figura 47), no mesmo meio, onde são observadas duas ondas de redução (I_c e I_{IIc} , respectivamente), com características de processo quase-reversível observada pela presença das ondas anódicas correspondentes na primeira etapa de redução (I_a), sendo a onda IIa, para a maioria dos compostos, menos definida.

A Figura 46 mostra os voltamogramas cíclicos dos compostos da série **2** (meio aprótico), obtidos em eletrodo de carbono vítreo (vs Ag/AgCl/Cl⁻). Os estudos foram realizados em função da velocidade de varredura (variação de ν), entretanto para fins demonstrativos, como também para fins de comparação com a atividade biológica (E_{pc}), os voltamogramas estão apresentados na velocidade de 100 mV s⁻¹.

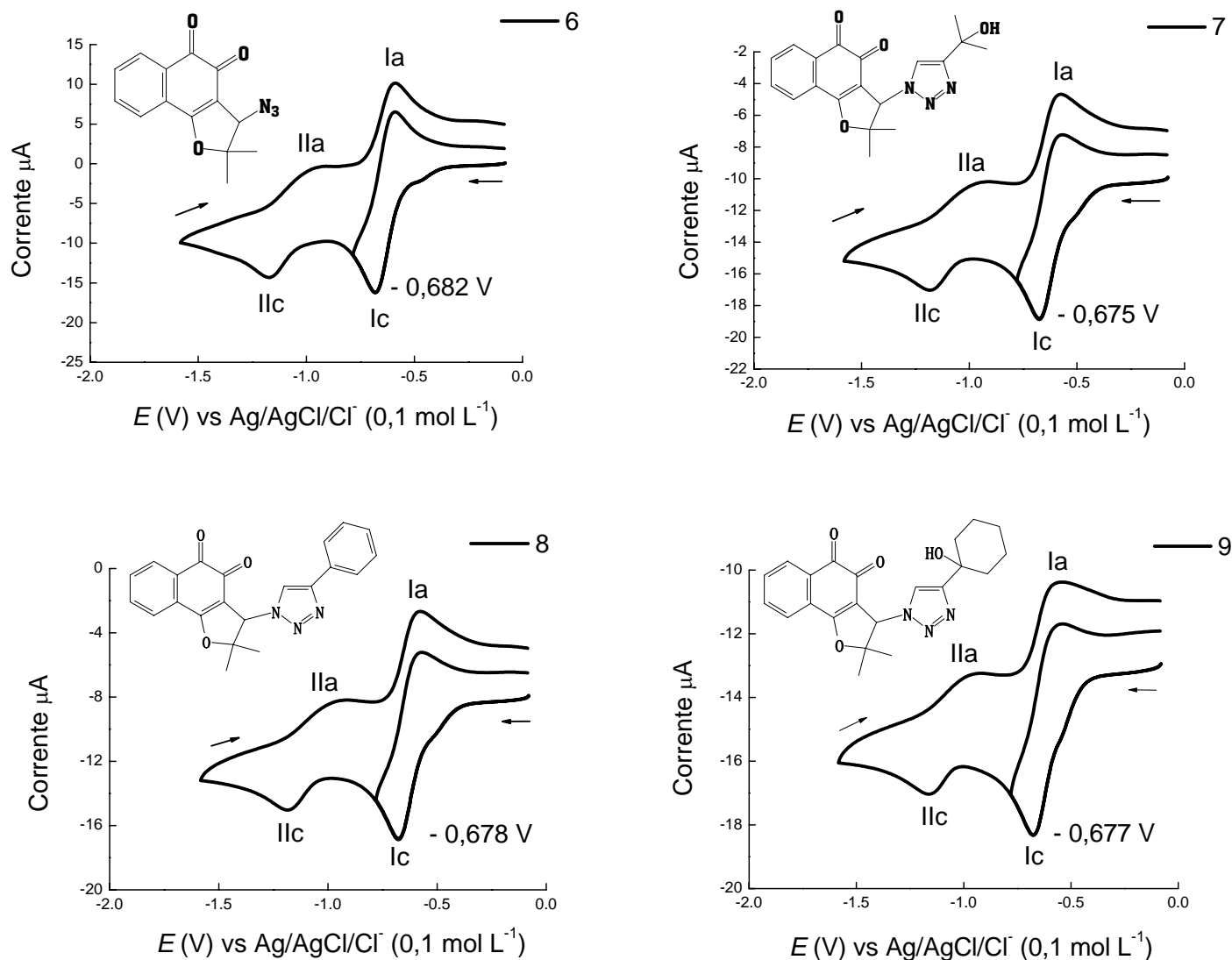


Figura 46. Voltamogramas Cíclicos dos compostos da série 2 (3 mmol L⁻¹) em DMF/TBAP (0,1 mol L⁻¹). Eletrodo de CV. $\nu = 100$ mV s⁻¹. E / V vs Ag/AgCl/Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹).

Na figura 47, são dispostos os voltamogramas de Onda Quadrada dos compostos da série 2, apresentando duas ondas de redução, conforme descrição anterior (página 87).

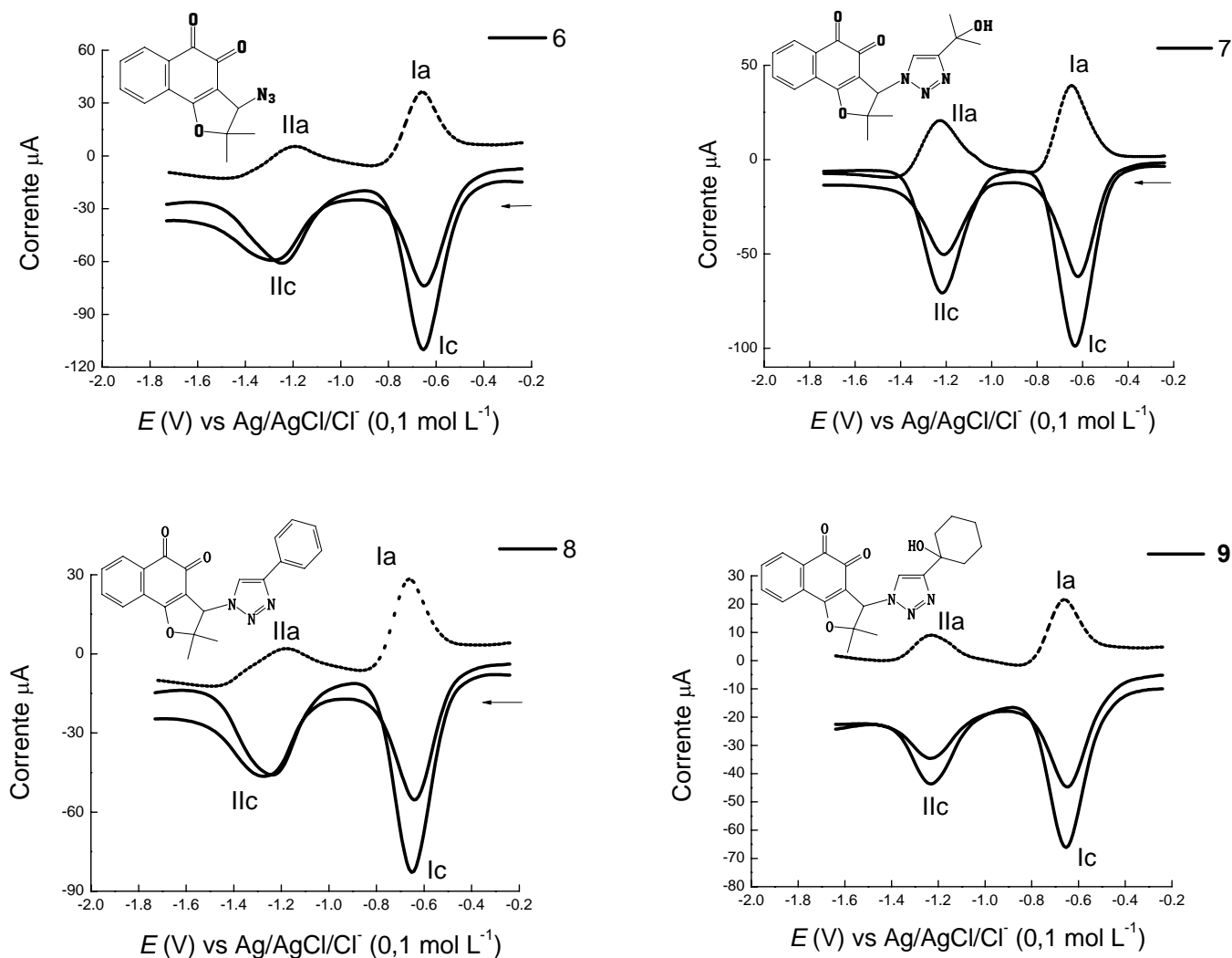


Figura 47. Voltamogramas de Onda Quadrada (VOQ) dos compostos da série **2** (3 mmol L⁻¹) em DMF/TBAP (0,1 mol L⁻¹). Eletrodo de CV. $f = 25$ Hz. E / V vs Ag/AgCl/Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹).

Em seguida encontram-se os gráficos da relação entre os valores de intensidade de corrente em função da velocidade de varredura ($i_{p_{Ic}} f(\nu)$) e da análise do potencial de redução de primeira onda em função do log da velocidade de varredura ($E_{p_{Ic}} f(\log \nu)$), para cada composto, como também, as tabelas onde estão apresentados os resultados correspondentes aos parâmetros eletroquímicos obtidos do estudo em função da velocidade de varredura (ν) para cada composto, individualmente.

V.1 – 1.6 – Composto 6

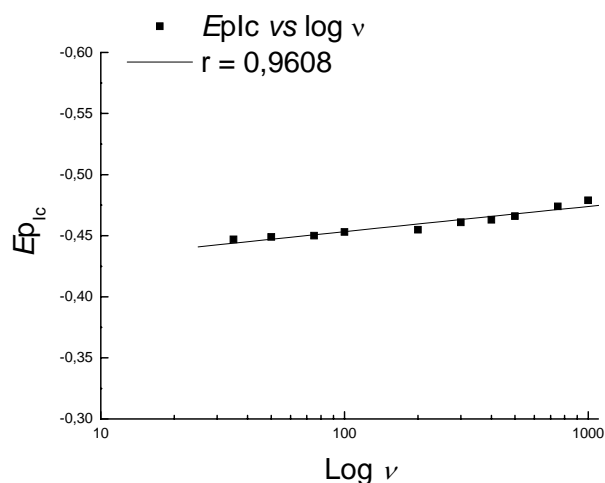
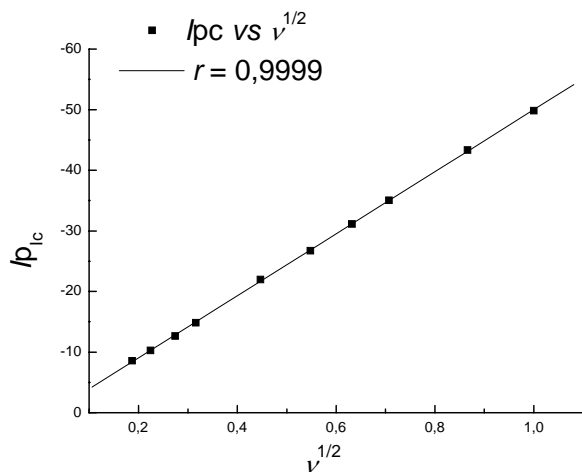


Figura 48a. Análise do transporte de massa da VC $f(v)$ do composto **6**, l_{pc} vs $v^{1/2}$. Eletrodo de Carbono Vítreo. E / V vs $Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

Figura 48b: Gráfico de E_{plc} vs $\log v$ ($0,035$ a $0,5 \text{ V s}^{-1}$) do composto **6** (DMF/TBAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), em eletrodo de CV; $c = 3 \text{ mmol L}^{-1}$. E / V vs $Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

Tabela 11: Parâmetros eletroquímicos encontrados para o composto **6**. Estudo em função da velocidade de varredura. E_{pc} vs $Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

v (mV s^{-1})	E_{plc} (V)	l_{pc}	$E_{plc} - E_{plc}^{1/2}$	$E_{plc}^{1/2}$	E_{pla} (V)
35	-0,679	-9,08	-0,071	-0,608	-0,591
50	-0,681	-11,32	-0,073	-0,608	-0,588
75	-0,680	-13,64	-0,071	-0,609	-0,589
100	-0,682	-16,13	-0,076	-0,606	-0,594
200	-0,684	-22,85	-0,079	-0,605	-0,579
300	-0,688	-29,41	-0,093	-0,595	-0,571
400	-0,693	-36,23	-0,097	-0,596	-0,563
500	-0,699	-42,31	-0,101	-0,598	-0,557

IV.1 – 1.7 – Composto 7

Gráficos da relação entre os valores de intensidade de corrente em função da velocidade de varredura ($i_{pc} f(\nu)$) para a primeira onda do composto 7 (Figuras 49a e b) e da análise do potencial de redução de primeira onda em função do log da velocidade de varredura ($E_{plc} f(\log \nu)$), em seguida, a tabela 12 contém os resultados correspondentes aos parâmetros eletroquímicos obtidos para este composto.

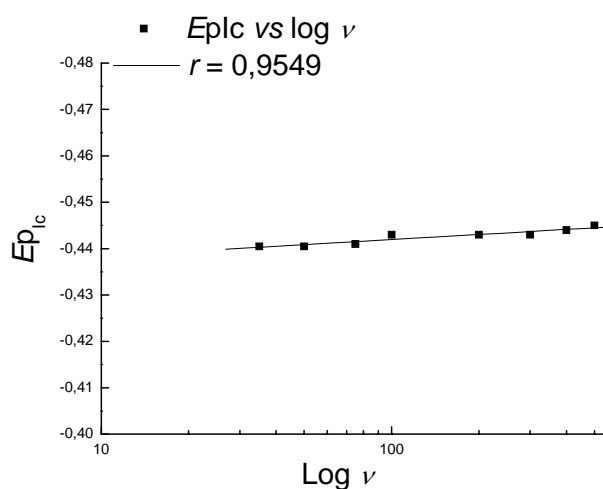
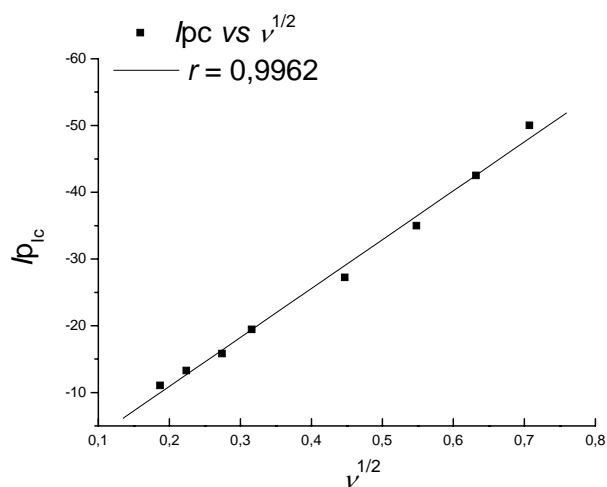


Figura 49a. Análise do transporte de massa da VC $f(\nu)$ do composto 7, i_{pc} vs $\nu^{1/2}$. Eletrodo de Carbono Vítreo. E / V vs $Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

Figura 49b: Gráfico de E_{plc} vs $\log \nu$ ($0,035$ a $0,5 \text{ V s}^{-1}$) do composto 7 (DMF/TBAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), em eletrodo de CV; $c = 3 \text{ mmol L}^{-1}$. E / V vs $Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

Tabela 12: Parâmetros eletroquímicos encontrados para o composto 7. Estudo em função da velocidade de varredura. E_{pc} vs $Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

ν (mV s^{-1})	E_{plc} (V)	i_{plc}	$E_{plc} - E_{plc}^{1/2}$	$E_{plc}^{1/2}$	E_{pla} (V)
35	-0,671	-10,78	-0,091	-0,580	-0,582
50	-0,673	-13,28	-0,090	-0,583	-0,587
75	-0,671	-14,82	-0,089	-0,582	-0,584
100	-0,675	-18,84	-0,095	-0,580	-0,582
200	-0,679	-26,93	-0,097	-0,582	-0,589
300	-0,685	-34,98	-0,099	-0,586	-0,588
400	-0,689	-41,99	-0,098	-0,591	-0,589
500	-0,690	-50,79	-0,103	-0,587	-0,595

IV.1 – 1.8 – Composto 8

Gráficos da relação entre os valores de intensidade de corrente em função da velocidade de varredura ($l_{pc} f(\nu)$) para a primeira onda do composto **8** (Figuras 49a e b) e da análise do potencial de redução de primeira onda em função do log da velocidade de varredura ($E_{plc} f(\log \nu)$); em seguida, a tabela 13 lista os resultados correspondentes aos parâmetros eletroquímicos obtidos para este composto.

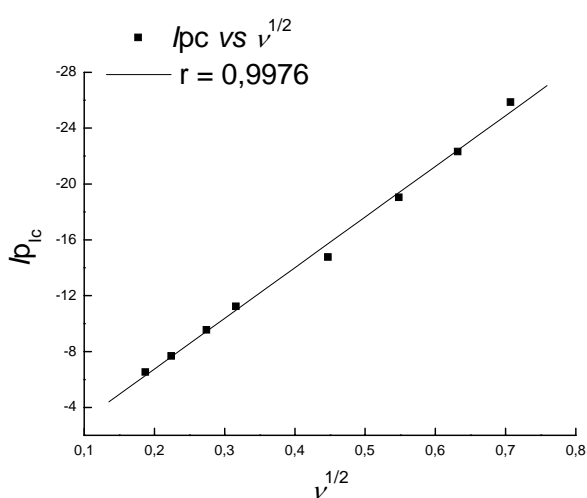


Figura 50a. Análise do transporte de massa da VC $f(\nu)$ do composto **8**, l_{pc} vs $\nu^{1/2}$. Eletrodo de Carbono Vítreo. E/V vs $Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

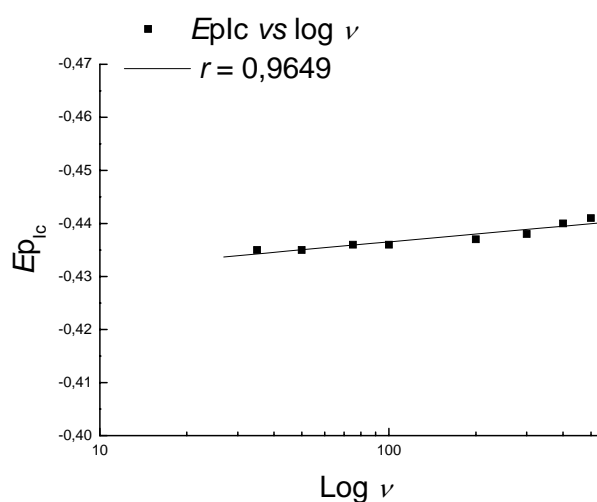


Figura 50b: Gráfico de E_{plc} vs $\log \nu$ ($0,035$ a $0,5 \text{ V s}^{-1}$) do composto **8** (DMF/TBAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), em eletrodo de CV; $c = 3 \text{ mmol L}^{-1}$. E/V vs $Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

Tabela 13: Parâmetros eletroquímicos encontrados para o composto **8**. Estudo em função da velocidade de varredura. E_{pc} vs $Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

$\nu (\text{mV s}^{-1})$	$E_{plc} (\text{V})$	l_{pc}	$E_{plc} - E_{plc}^{1/2}$	$E_{plc}^{1/2}$	$E_{pl_a} (\text{V})$
35	-0,671	-10,78	-0,091	-0,580	-0,582
50	-0,673	-13,28	-0,090	-0,583	-0,587
75	-0,671	-14,82	-0,089	-0,582	-0,584
100	-0,675	-18,84	-0,095	-0,580	-0,582
200	-0,679	-26,93	-0,097	-0,582	-0,589
300	-0,685	-34,98	-0,099	-0,586	-0,588
400	-0,689	-41,99	-0,098	-0,591	-0,589
500	-0,690	-50,79	-0,103	-0,587	-0,595

IV.1 – 1.9 – Composto 9

Gráficos da relação entre os valores de intensidade de corrente em função da velocidade de varredura ($i_{pc} f(\nu)$) para a primeira onda do composto 9 (Figuras 49a e b) e da análise do potencial de redução de primeira onda em função do log da velocidade de varredura ($E_{plc} f(\log \nu)$), em seguida, a tabela 14 contém os resultados correspondentes aos parâmetros eletroquímicos obtidos para este composto.

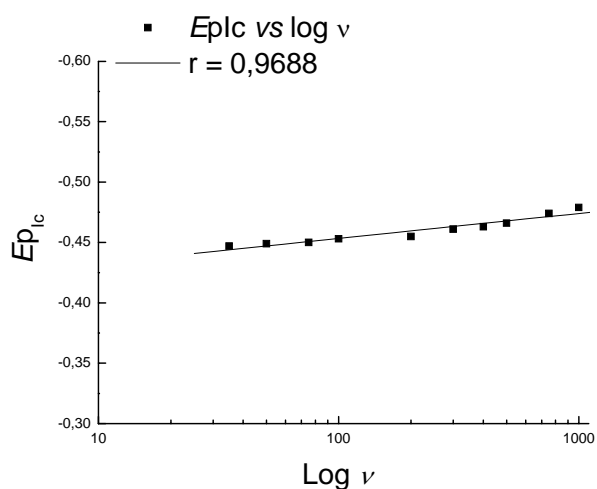
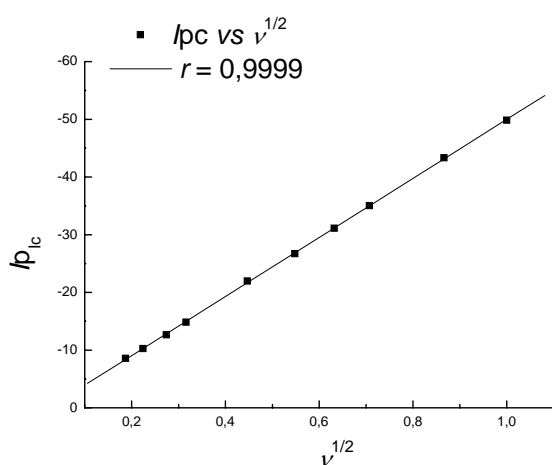


Figura 51a. Análise do transporte de massa da VC $f(\nu)$ do composto **9**, i_{pc} vs $\nu^{1/2}$. Eletrodo de Carbono Vítreo. E / V vs $Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

Figura 51b: Gráfico de E_{plc} vs $\log \nu$ ($0,035$ a $0,5 \text{ V s}^{-1}$) do composto **9** (DMF/TBAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), em eletrodo de CV; $c = 3 \text{ mmol L}^{-1}$. E / V vs $Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

Tabela 14: Parâmetros eletroquímicos encontrados para o composto **9**. Estudo em função da velocidade de varredura. E_{pc} vs $Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

$\nu (\text{mV s}^{-1})$	$E_{plc} (\text{V})$	i_{pc}	$E_{plc} - E_{plc}^{1/2}$	$E_{plc}^{1/2}$	$E_{pla} (\text{V})$
35	-0,674	-9,89	-0,091	-0,583	-0,538
50	-0,679	-11,99	-0,092	-0,587	-0,538
75	-0,680	-14,77	-0,098	-0,582	-0,542
100	-0,677	-18,35	-0,096	-0,581	-0,540
200	-0,687	-23,85	-0,097	-0,590	-0,547
300	-0,691	-29,45	-0,095	-0,596	-0,550
400	-0,698	-36,87	-0,099	-0,599	-0,552
500	-0,701	-42,99	-0,105	-0,596	-0,559

IV.1 – 2 – Racionalização dos resultados em meio aprótico

Todas as quinonas estudadas, das séries **1** e **2** (exceto o composto **5**), em meio aprótico, apresentaram comportamento similar, com duas ondas de redução correspondentes, no primeiro processo eletródico, à formação da semiquinona e, em seguida, no segundo processo, à formação do diânion. Esses resultados estão de acordo com a literatura (Chambers *et al.*, 1974; De Abreu *et al.*, 2005).

A natureza quase-reversível dos dois processos de redução, verificada entre outras características pelo ΔE_p ($E_{p1c} - E_{p1a}$), pelo pequeno deslocamento negativo dos valores de E_{p1c} , pela diminuição proporcional de intensidade das correntes anódicas, na varredura de volta (VC) ($I_{p1a}/I_{p1c} < 1$) ou varredura reversa (VOQ), são explicadas pelas possíveis reações químicas acopladas que, no caso de quinonas estão, na maioria das vezes, relacionadas às reações de desproporcionamento (Chambers *et al.*, 1974) ou à possibilidade de protonação ou formação de ligação de hidrogênio do diânion da quinona (espécie básica), com água residual ou outras fontes de prótons.

O parâmetro de interesse direto visando à análise de uma possível correlação entre parâmetros eletroquímicos e a atividade biológica desses compostos é o E_{p1c} (potencial de pico catódico (redução) de primeira onda). Com base em literatura especializada, os potenciais de redução ou de oxidação de algumas substâncias fornecem informações sobre a viabilidade dos processos de transferência de elétrons (TE) *in vivo* ou *in vitro*. Correlações já 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 para colaborar com uma possível elucidação do mecanismo de ação de fármacos e no planejamento de compostos biologicamente ativos.

A tabela 15 lista os valores de E_{p1c} dos compostos estudados. Esses valores serão novamente mencionados quando da análise dos resultados farmacológicos.

A ordem de facilidade de redução em meio aprótico, com base nos valores de E_{plc} , para as séries **1** e **2** é :

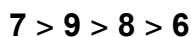
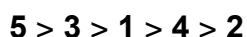


Tabela 15: Valores de E_{plc} das quinonas heterocíclicas.

Classificação	Composto	E_{plc} (V)
Série 1	1 (H)	-0,721
	2 (F)	-0,748
	3 (Cl)	-0,705
	4 (Br)	-0,743
	5 (NO ₂)	-0,671
Série 2	6 (N ₃)	-0,682
	7 (Isopropil-OH)	-0,675
	8 (Aril)	-0,678
	9 (Cicloexanol)	-0,677

De acordo com Zuman e colaboradores (1967), o efeito de grupos substituintes numa série de substâncias derivadas de um mesmo núcleo, pode ser, na maioria das vezes, relacionado com parâmetros eletroquímicos.

Nota-se que entre as substâncias da série **2** há apenas uma pequena variação entre os potenciais de pico catódicos de primeira onda (E_{plc}). Deve-se ressaltar que não há interação conjugativa entre a quinona e o anel anilínico substituído, daí, as pequenas variações, exceto no caso o nitro derivado.

Ao compararmos os potenciais de pico (E_{plc}) da série **2** com os E_{plc} da série **1**, é possível observar que entre as duas séries há um deslocamento positivo menor que 100 mV, dos compostos da série **2**, em relação aos compostos da série **1**.

Para a série **1**, no caso do composto **2** (que tem F (flúor) como substituinte no anel aromático em posição *para*, o efeito mesomérico predomina sobre o efeito indutivo, entretanto quando o substituinte está na posição *meta* (Cl e Br), nos compostos **3** e **4**, respectivamente, só existe o efeito indutivo.

IV.1 – 3 – Meio Prótico

Os principais compostos estudados, em meio prótico, foram os da **série 2**. Estes apresentaram atividades biológicas significativas e, além disso, inéditas.

Os estudos em meio prótico foram realizados utilizando tampão acetato pH 4,5, conforme metodologia já descrita. A escolha do tampão e do valor de pH está relacionada à necessidade desse meio para análises dessas substâncias em biossensor de DNA. Em relação à **série 1**, somente o composto **5** foi estudado em meio prótico, devido a sua análise em biossensor de DNA.

Série 1

IV.1 – 3.1 – Composto 5

Em meio prótico, o estudo voltamétrico do composto **5** apresentou duas ondas de redução no domínio catódico e uma onda de oxidação no domínio anódico, conforme pode ser observado na figura 52. De acordo com a literatura (Grimshaw, 2001; Goulart *et al.*, 2007) nesse meio, a redução de nitrocompostos aromáticos ocorre em uma única etapa de 4 elétrons/4 H⁺ de caráter irreversível (Cavalcanti *et al.*, 2004, Goulart *et al.*, 2007) enquanto que a redução de quinonas ocorre também em etapa única só que de 2 elétrons/2 H⁺ e com características de reversibilidade (De Abreu *et al.*, 2005). Esta informação é útil para explicar os resultados obtidos, para os compostos da série **2** (Figura 54, página 99).

Devido à maior facilidade de redução das quinonas, sugere-se que o primeiro pico de redução observado (I_c), para o composto **5**, na figura 52-A, esteja relacionado à redução da quinona, enquanto a segunda etapa de redução (II_c – irreversível) esteja relacionada à redução do grupo nitro.

Observa-se também, principalmente na voltametria cíclica apresentada na figura 52-A, que a intensidade de corrente da primeira onda é aproximadamente metade da intensidade de corrente da segunda etapa de redução, isto corrobora a sugestão da seqüência de redução dos dois grupos eletroativos.

A onda de oxidação observada no ramo anódico, tanto na VC quanto na VPD, está relacionada, provavelmente, à oxidação do grupo amino na molécula.

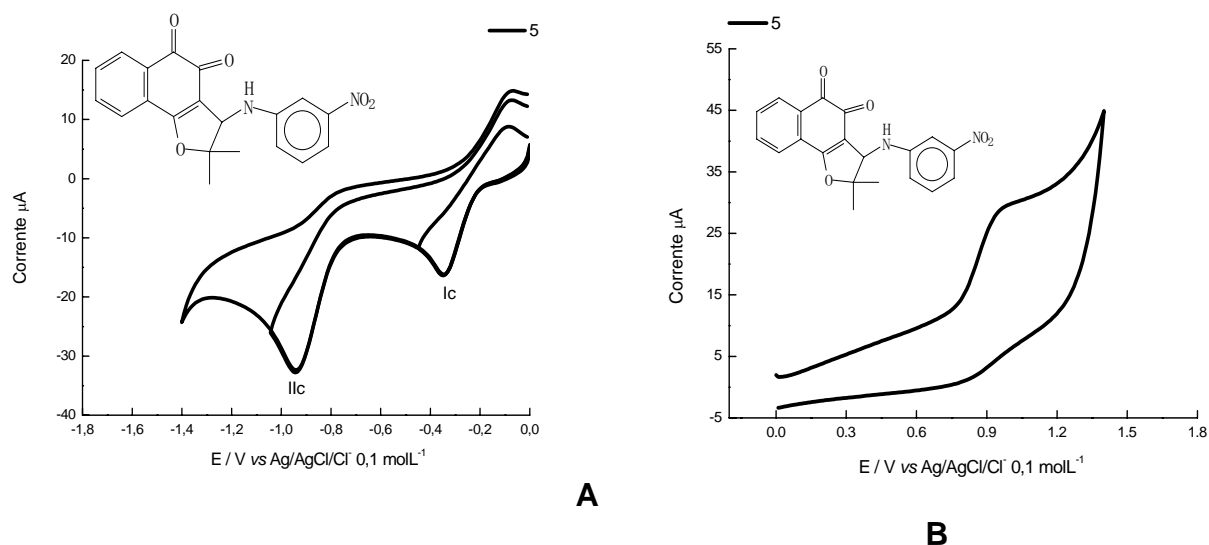


Figura 52. (A) VC do composto **5**, no domínio catódico. (B) VC do composto **5** (Série 1), no domínio anódico. Composto **5**, $c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$, em meio prótico (tampão acetato, pH 4,5). Eletrodo de CV. $\nu = 100 \text{ mVs}^{-1}$. $E / V \text{ vs Ag/AgCl/Cl}^{-1} (0,1 \text{ molL}^{-1})$.

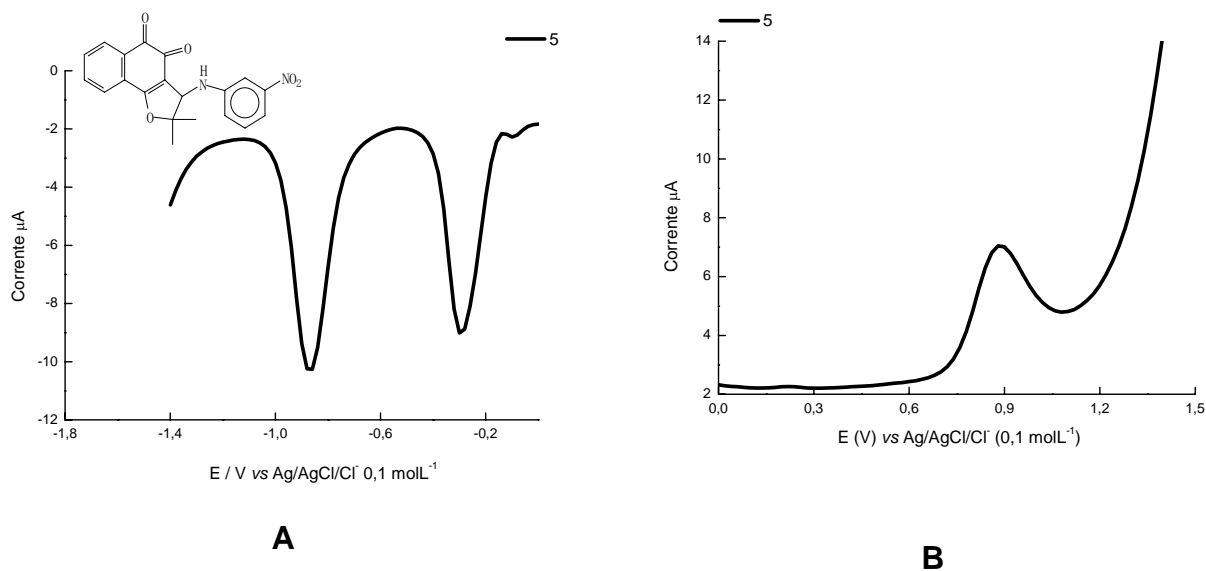


Figura 53. (A) Voltametria de Pulso Diferencial do composto **5**, no domínio catódico. (B) Voltametria de Pulso Diferencial do composto **5**, no domínio anódico. Composto **5** em $C = 1 \text{ mmol L}^{-1}$, em meio prótico (Tampão Acetato pH 4,5). Eletrodo de Carbono Vítreo. $\nu = 5 \text{ Mv s}^{-1}$. $E / V \text{ vs Ag/AgCl/Cl}^{-1} (0,1 \text{ mol L}^{-1})$.

Serie 2

Os voltamogramas cíclicos dos compostos da série 2 (Figura 54), em meio aquoso tamponado (prótico, tampão acetato, pH 4,5), apresentaram, para cada um dos compostos, uma única onda catódica, com características de quase-reversibilidade observada pela presença de correspondente anódica [$\Delta(E_{p_{Ic}} - E_{p_{Ia}})_{\text{experimental}} = 50$ a 70 mV, $\Delta(E_{p_{Ic}} - E_{p_{Ia}})_{\text{teórico}} \sim 30$ mV] e pela pequena variação dos potenciais de pico catódico ($\Delta E_{p_{Ic}}$), com o aumento da velocidade de varredura. Esses resultados são condizentes com os dados da literatura onde a redução de quinonas em meio prótico ocorre em uma etapa de redução, reversível, sendo esta redução bieletrônica, com participação de dois prótons, havendo, dessa forma e formação da hidroquinona, em uma etapa eletroquímica única. (Chambers *et al.*, 1974; De Abreu *et al.*, 2005; De Abreu *et al.*, 2007).

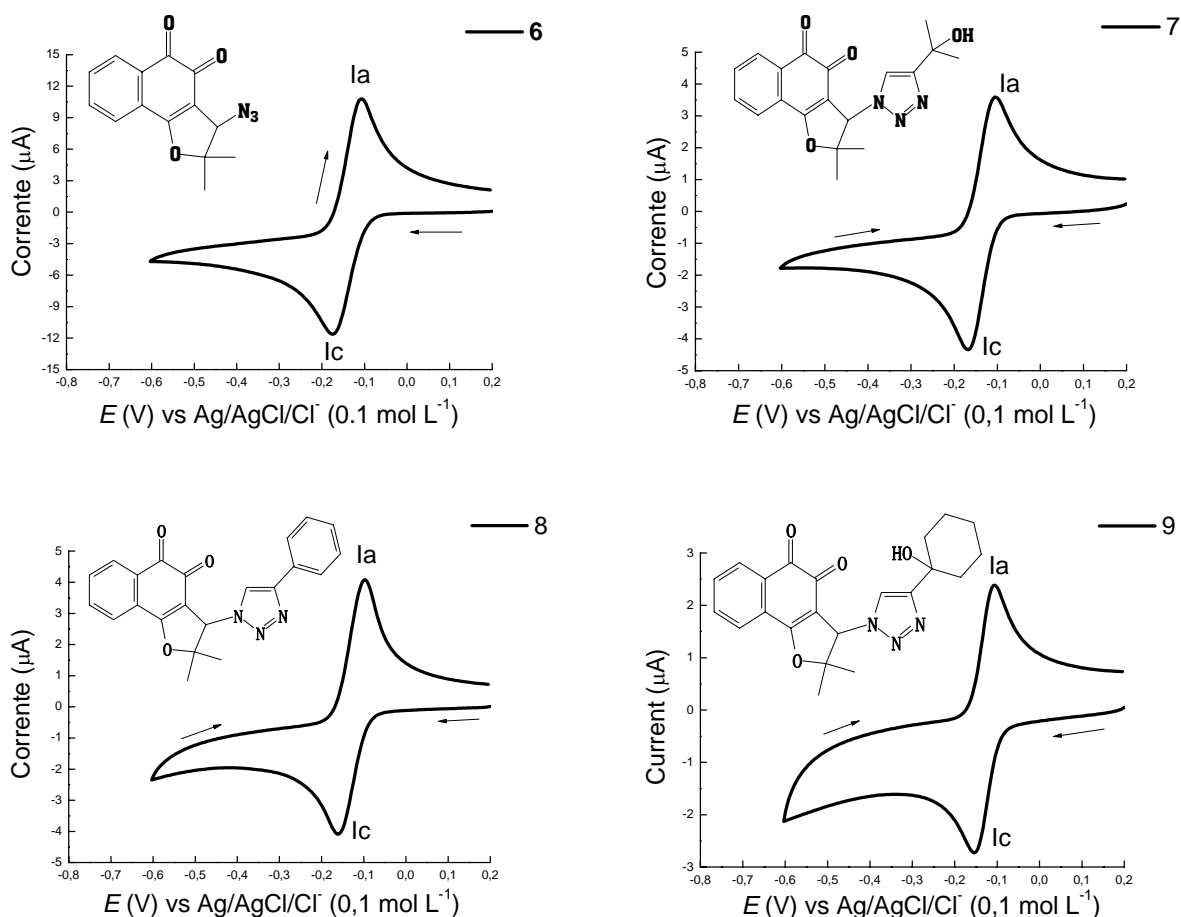


Figura 54. Voltmetrias Cíclicas dos compostos da série 2 (1 mmol L^{-1}) em meio aquoso tamponado (prótico, pH 4,5). Eletrodo de Carbono Vítreo. $\nu = 35 \text{ mV s}^{-1}$. $E / \text{V vs Ag/AgCl/Cl}^{-1}$.

De posse dos valores de intensidade de corrente, para a primeira onda, obtidos a partir do estudo voltamétrico em função da velocidade de varredura ($i_{p_{lc}} f(\nu)$), foi possível analisar o transporte de massas através do sistema. Este foi caracterizado como difusional, os gráficos correspondentes ($i_{p_{lc}}$ vs $\log \nu$) estão representados, em seguida, na figura 55. Todos os valores de parâmetros eletroquímicos encontram-se em tabelas dispostas na seqüência.

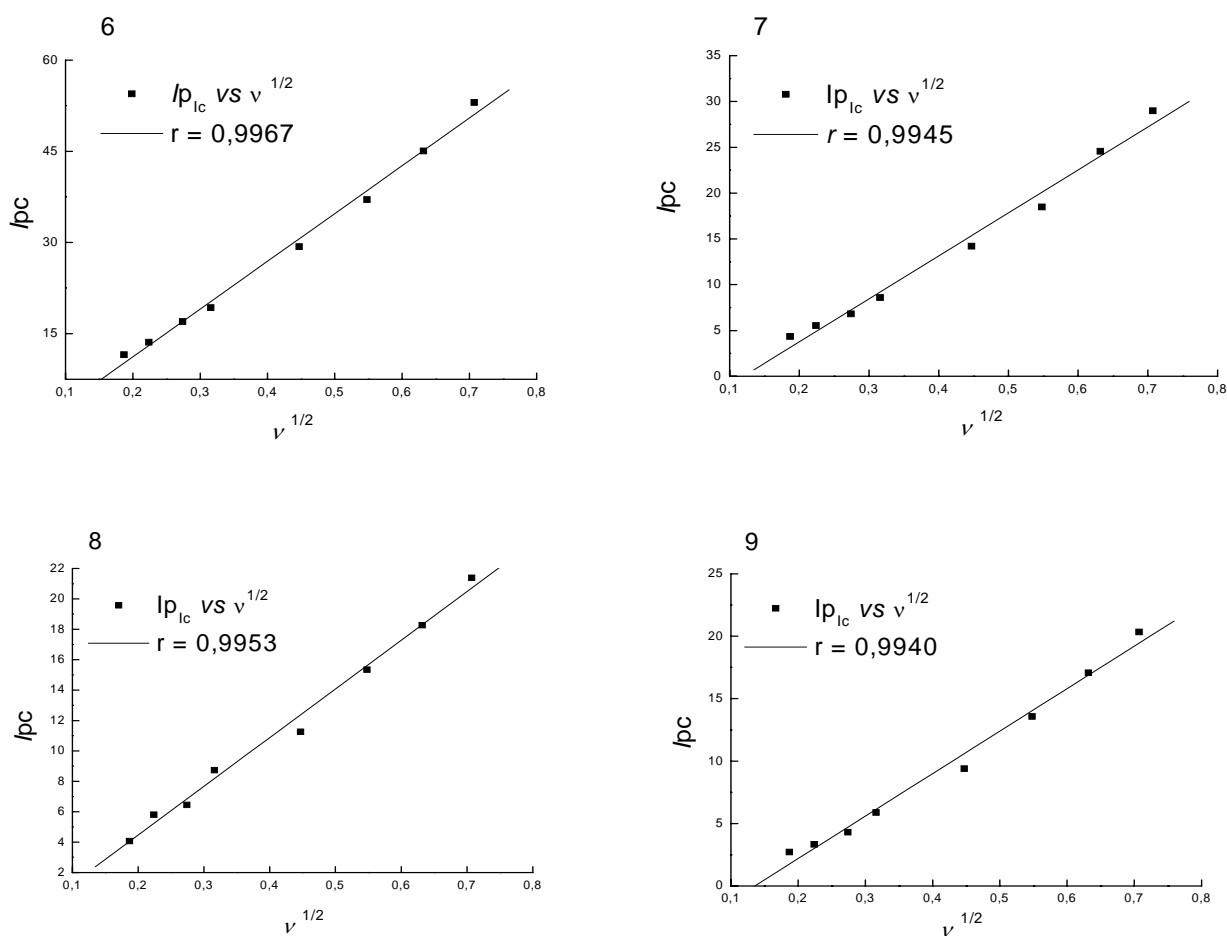


Figura 55. Análise do transporte de massa da Voltametria Cíclica $f(\nu)$ dos compostos da série 2, $i_{p_{lc}}$ vs $\nu^{1/2}$. Eletrodo de Carbono Vítreo. E / V vs $Ag/AgCl/Cl^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

Em seguida encontram-se listadas as tabelas com todos os valores de parâmetros eletroquímicos.

IV.1 – 3.2 – Composto 6

Tabela 16: Parâmetros eletroquímicos encontrados para o composto 6. Estudo em função da velocidade de varredura. E_{pc} vs Ag/AgCl/Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹).

ν (mV s ⁻¹)	E_{pIc} (V)	I_{pIc} (μA)	$E_{pIc} - E_{pIa}$	$E_{pIc} - E_{p1/2}$	E_{pIa} (V)
35	-0,175	11,53	0,069	0,045	-0,106
50	-0,176	13,60	0,071	0,046	-0,105
75	-0,176	16,99	0,072	0,045	-0,104
100	-0,176	19,26	0,075	0,044	-0,101
200	-0,181	29,30	0,085	0,044	-0,096
300	-0,189	37,03	0,103	0,045	-0,086
400	-0,189	45,05	0,102	0,047	-0,087
500	-0,204	53,02	0,132	0,047	-0,072

IV.1 – 3.3 – Composto 7

Tabela 17: Parâmetros eletroquímicos encontrados para o composto 7. Estudo em função da velocidade de varredura. E_{pc} vs Ag/AgCl/Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹).

ν (mV s ⁻¹)	E_{pIc} (V)	I_{pIc} (μA)	$E_{pIc} - E_{pIa}$	$E_{pIc} - E_{p1/2}$	E_{pIa} (V)
35	-0,167	4,35	0,064	0,039	-0,103
50	-0,169	5,55	0,066	0,041	-0,103
75	-0,169	6,82	0,068	0,044	-0,101
100	-0,165	8,59	0,062	0,039	-0,103
200	-0,169	14,19	0,069	0,041	-0,100
300	-0,169	18,49	0,069	0,044	-0,100
400	-0,169	24,56	0,069	0,043	-0,100
500	-0,169	30,98	0,070	0,045	0,099

IV.1 – 3.4 – Composto 8

Tabela 18: Parâmetros eletroquímicos encontrados para o composto 8. Estudo em função da velocidade de varredura. E_{pc} vs Ag/AgCl/Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹).

ν (mV s ⁻¹)	E_{pIc} (V)	I_{pIc} (μA)	$E_{pIc} - E_{pIa}$	$E_{pIc} - E_{p1/2}$	E_{pIa} (V)
35	-0,161	4,07	0,065	0,041	-0,096
50	-0,161	5,80	0,068	0,043	-0,093
75	-0,161	6,45	0,062	0,042	-0,099
100	-0,163	8,74	0,067	0,037	-0,096
200	-0,163	11,25	0,064	0,041	-0,099
300	-0,163	15,34	0,064	0,042	-0,099
400	-0,163	18,27	0,067	0,044	-0,096
500	-0,163	21,39	0,072	0,047	-0,091

IV.1 – 3.5 – Composto 9

Tabela 19: Parâmetros eletroquímicos encontrados para o composto 9. Estudo em função da velocidade de varredura. E_{pc} vs Ag/AgCl/Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹).

ν (mV s ⁻¹)	E_{pIc} (V)	I_{pIc} (μA)	$E_{pIc} - E_{pIa}$	$E_{pIc} - E_{p1/2}$	E_{pIa} (V)
35	-0,155	2,72	0,050	0,036	-0,105
50	-0,155	3,34	0,050	0,036	-0,105
75	-0,155	4,30	0,050	0,036	-0,105
100	-0,152	5,88	0,051	0,037	-0,102
200	-0,159	9,39	0,062	0,044	-0,097
300	-0,160	13,57	0,072	0,040	-0,088
400	-0,162	17,07	0,073	0,044	-0,089
500	-0,162	21,34	0,073	0,043	-0,089

IV.2 – Estudos em Biossensor de DNA

IV.2.1 – Composto 5.

Os estudos do composto **5** em biossensor de dsDNA foram realizados de duas maneiras. Primeiramente, a análise da interação foi feita, adicionando-se 20 μL da solução etanólica da substância na concentração de 3 mmol L^{-1} à superfície do eletrodo modificado com dsDNA e realizada a varredura com um intervalo de tempo de 5 minutos. Em um segundo momento, o estudo foi realizado em solução, onde o biossensor foi imerso na solução aquoso-etanólica (1:1 v:v – Tampão acetato/Etanol) da substância e realizada a medida eletroquímica imediatamente e também após um tempo de 12 horas (em biossensores individuais). Outro biossensor de dsDNA foi submetido às mesmas condições (em solução do composto **5**), só que previamente à varredura do biossensor no ramo anódico foi realizada redução *in situ* da substância no seu valor de potencial de 2ª onda. Todos esses experimentos estão apresentados na figura 56, inclusive a voltametria de pulso diferencial do composto **5**, em eletrodo de carbono vítreo não modificado com dsDNA (eletrodo limpo e polido), para fins de comparação. Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo o branco do biossensor (realizadas as mesmas operações, na ausência da substância-teste), também realizado em triplicata.

De acordo com a literatura (Brett *et al.*, 1999; De-los-Santos-Álvarez *et al.*, 2004), em eletrodos de carbono vítreo, a eletrooxidação do DNA, em meio ácido (pH 4,5), relaciona-se à oxidação das bases guanina e adenina. Em geral, o dsDNA apresenta menores intensidades de correntes de oxidação em relação ssDNA (DNA de fita simples, após desnaturação ácida). Já quando ocorre interação de substâncias com o dsDNA ocorre exposição das bases na superfície do eletrodo e, com isso, estas tornam-se passíveis de oxidação e, dessa forma é possível observar os picos diagnósticos de oxidação da guanina e da adenina.

Dessa forma, conforme pode ser observado na figura 56, para todas as avaliações experimentais relacionadas à exposição do biossensor de dsDNA ao composto **5**, houve ausência clara de interação direta desta substância com o DNA, devido ao não aparecimento dos sinais característicos de oxidação das bases

nitrogenadas do DNA. O pico de oxidação, presente no voltamograma é relativo à oxidação do composto **5**.

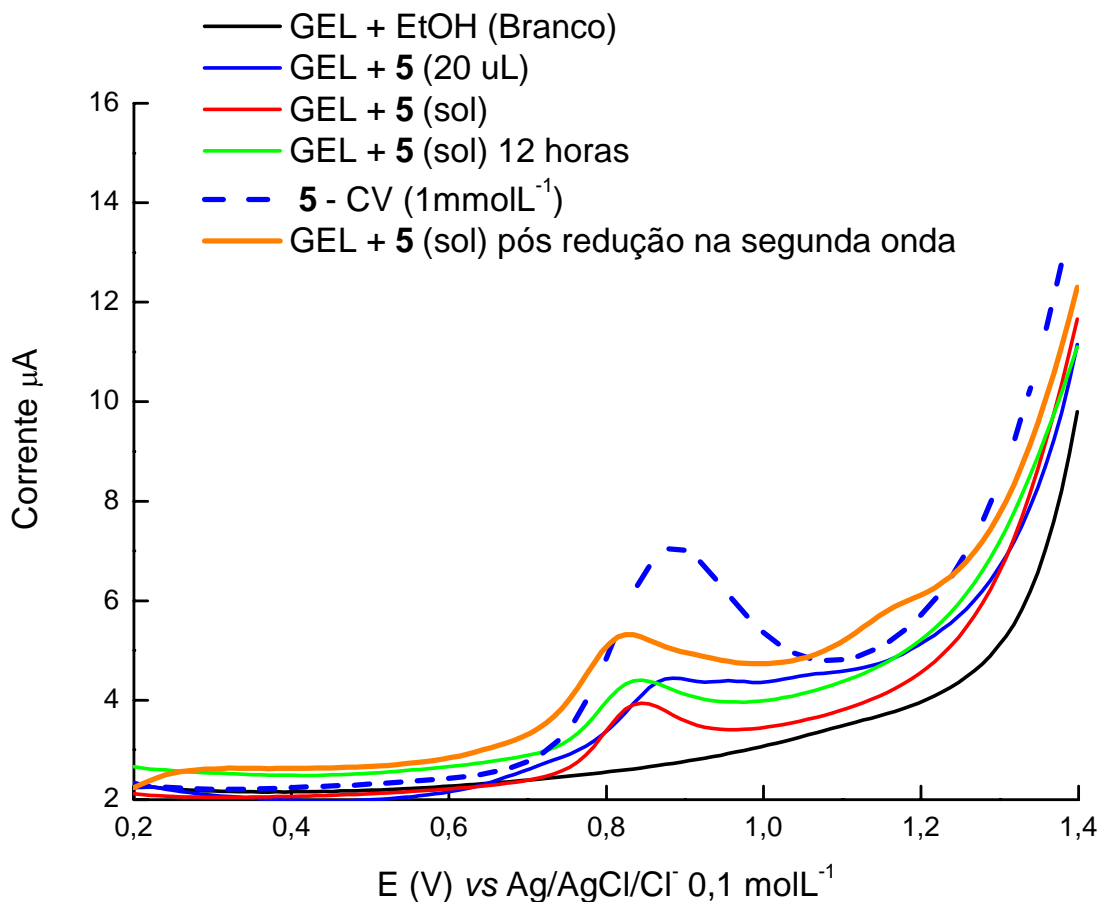


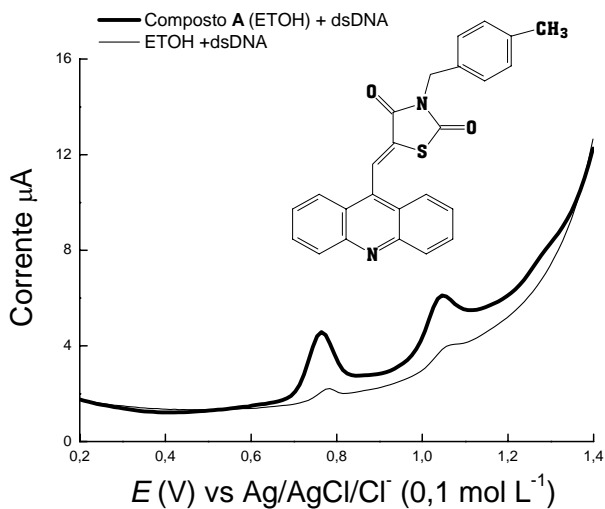
Figura 56. Voltametria de Pulso Diferencial do biossensor de DNA, com e sem adição do composto **5**. Composto **5** em $c = 3 \text{ mmol L}^{-1}$. Todos os voltamogramas foram realizados em meio aquoso (tampão Acetato pH 4,5). Eletrodo de CV modificado com dsDNA. $\nu = 5 \text{ mVs}^{-1}$. $E / \text{V vs Ag/AgCl/Cl}^{-1} (0,1 \text{ mol L}^{-1})$.

IV.2.2 – Adaptação da metodologia de preparação do biossensor de dsDNA para avaliação de substâncias insolúveis. Pasta de carbono modificada com as substâncias teste (acridinas):

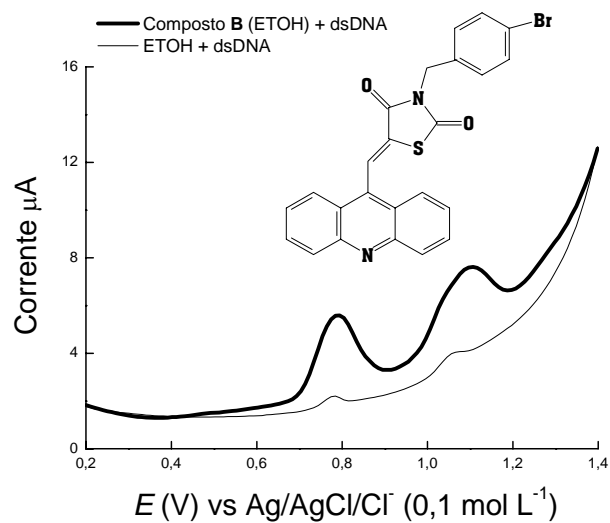
Há grande dificuldade em trabalhar com substâncias insolúveis em biossensores de DNA. A adição de solvente orgânicos, em muitos casos, não é permitida, pois causa alteração no pareamento das bases, o que expõe as bases, originando um falso positivo. Várias metodologias foram testadas, baseadas em Wang *et al.*, 2006, com utilização de DMSO e grande proporção de etanol. DMSO não deve ser utilizado, pois modifica a conformação do dsDNA. Após várias tentativas, optou-se pela metodologia descrita a seguir.

As voltametrias de pulso diferencial do dsDNA (Figura 57: **A, B, C e D**), sem adição de substâncias-teste (com a adição de etanol como controle) demonstrou o não aparecimento de picos de oxidação pelo fato de que nessa conformação do DNA em fita dupla, os sítios de oxidação no meio utilizado (pH 4,5) (bases púricas – guanina e adenina) estão participando de ligações de hidrogênio, conseqüentemente não estão disponíveis para oxidação. Além disso, existe uma maior restrição de flexibilidade em relação à fita simples, desta forma, pode-se observar apenas uma discreta intensidade de corrente correspondente à oxidação de algumas bases.

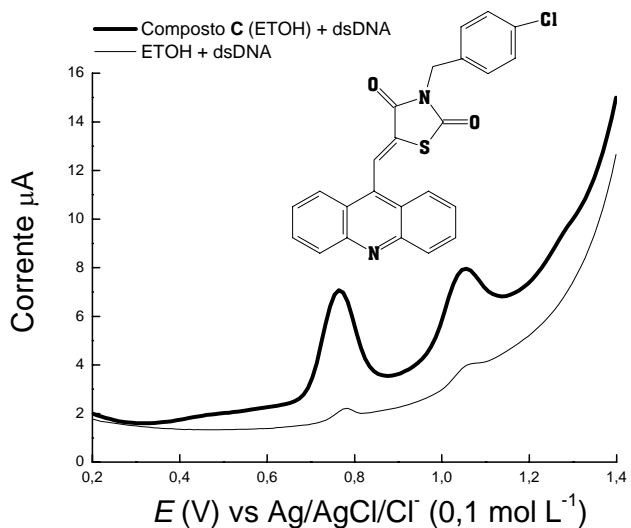
As quatro acridinas estudadas quanto a interação com o dsDNA (Compostos **A, B, C e D**) (Pitta *et al*, WO/2007/109871, 2007) apresentaram interação com o dsDNA, o que pode ser observado pela análise da figura 57, onde foram observados picos correspondentes às bases guanina e adenina ($E_{pa} \sim 0,7 \text{ V}$ e $0,9 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente).



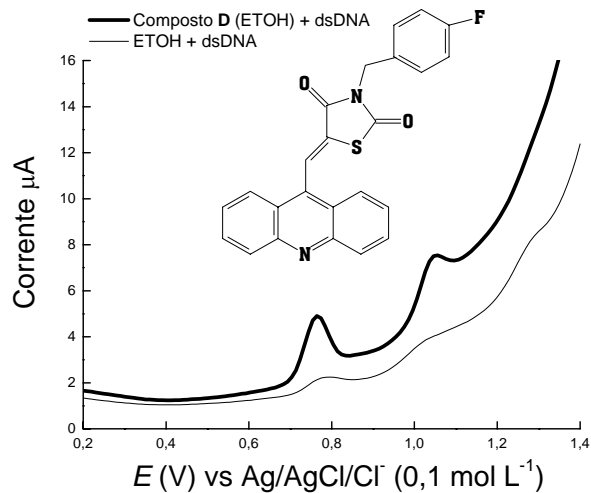
A



B



C

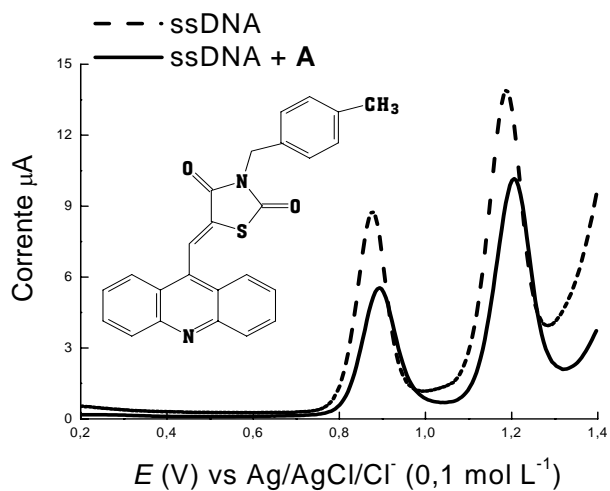


D

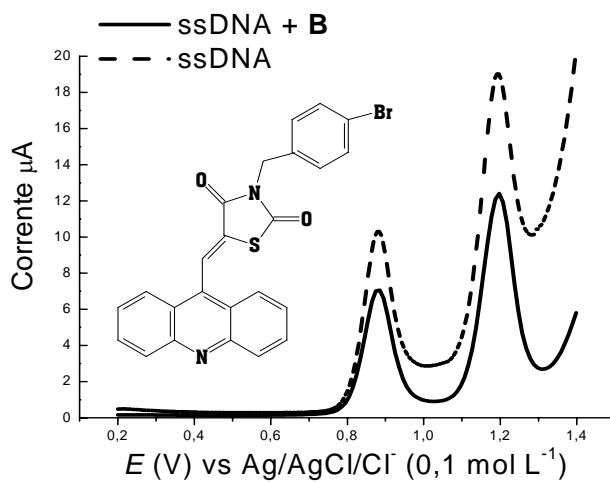
Figura 57. Voltamogramas de Pulso Diferencial em eletrodo de carbono vítreo modificado com o gel de dsDNA com e sem adição (de 20 µL) das substâncias teste (Acridinas, Compostos **A**, **B**, **C** e **D**) $C = 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (EtOH). A VPD do biossensor foi realizado em tampão acetato pH 4,5. $\nu = 5 \text{ mVs}^{-1}$.

Os resultados de interação das acridinas com o dsDNA foram correspondentes aos obtidos com o ssDNA (Figura 58) onde também foram evidenciadas características de interação. Nesse caso, foi observada diminuição das intensidades de corrente de picos anódicos correspondentes à eletrooxidação das bases guanina e adenina, respectivamente, quando da voltametria de pulso diferencial realizada com a pasta de carbono modificada com as acridinas (Figura 58: **A**, **B**, **C** e **D**). É importante ressaltar que quando a pasta de carbono não estava modificada com acridina, a corrente de pico das bases nitrogenadas foi mais intensa, como é possível observar na figura 58.

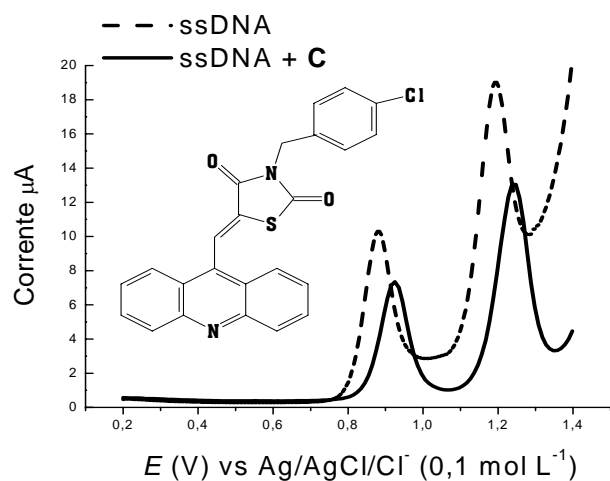
Partindo desses resultados é possível propor um mecanismo de ação farmacológica por meio de interação direta com o DNA. Esses resultados são reforçados por dados da literatura sobre as acridinas. Sabe-se que essas substâncias por suas características de reatividade, como também por sua conformação planar são agentes intercalantes de DNA, ou seja, interagem diretamente com o DNA e mudam sua conformação espacial (Pindur *et al.*, 2005; Braña *et al.*, 2001). Além disso, por meio do estudo em solução de ssDNA foi possível propor interação desses derivados diretamente com as bases, uma vez que houve diminuição de intensidade de corrente das bases correspondentes quando na presença das substâncias.



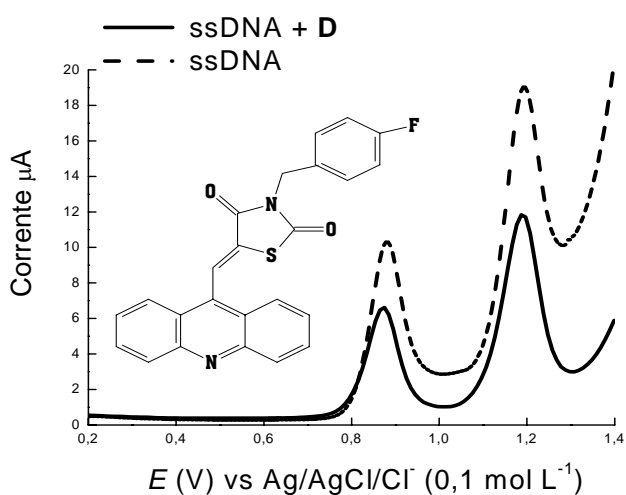
A



B



C



D

Figura 58. Voltamogramas de Pulso Diferencial ($\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$) da pasta de carbono modificada com os derivados de acridina ($10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em EtOH), imersa em uma solução de ssDNA em tampão acetato pH 4,5.

IV.3 – Estudos Farmacológicos

As quinonas são metabólitos amplamente distribuídos na natureza e apresentam participação muito relevante em vários processos bioquímicos vitais (Chambers *et al.*, 1988, Hillard *et al.*, 2008).

Do ponto de vista farmacológico e terapêutico, estas moléculas são utilizadas como medicamentos antitumorais, antibacterianos e antimaláricos e, incluem fármacos como antraciclinas, daunorrubicina, doxorubicina, mitomicina e mitoxantrona, amplamente utilizadas na terapia de tumores sólidos (Silva *et al.*, 2003). Particularmente em relação às naftoquinonas, destacam-se moléculas como a β -lapachona e o lapachol (Hussain *et al.*, 2007), que constituem um grupo promissor de compostos com propriedades citotóxicas e antitumorais (Asche *et al.*, 2005, Hillard *et al.*, 2008). O estudo de derivados destes compostos é uma estratégia relevante para o desenvolvimento de novos fármacos, desta forma, seguem os resultados encontrados para a citotoxicidade dos compostos estudados eletroquimicamente (Série 1 e Série 2), como também, para o composto **5**, para a qual foi realizado um estudo farmacológico mais abrangente, visando propor seu mecanismo de ação farmacológico.

IV.3 – 1 – Teste de citotoxicidade *in vitro* – Ensaio do MTT

As substâncias da série **1** já haviam sido testadas anteriormente pelo grupo do LOE (Laboratório de Oncologia Experimental da UFC) quanto à sua citotoxicidade (Da Silva Júnior *et al.*, 2007) (Tabela 20), frente a várias linhagens de células tumorais SF-295 (sistema nervoso central), HCT-8 (cólon), MDAMB-435 (melanoma), HL-60 (leucemia), PC-3 (próstata) e fibroblasto murino normal L-929. A avaliação foi realizada pelo método do MTT (em 72 horas). Todas as substâncias apresentaram atividade citotóxica, porém inespecíficas quanto à linhagem celular e com uma atividade citotóxica variada, com CI_{50} variando de 0,36 a 5,99 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O composto **1** foi o menos ativo da série, exceto contra MDA MB – 435 e PC-3. Foram, justamente, essas linhagens (MDA MB – 435 e PC – 3) as mais afetadas pelas quinonas. Os compostos halogenados (**2-4**) e o nitroderivado **5** foram os mais ativos. Daí, a

presença do grupo eletroatraente na molécula (**2**, **3**, **4** e **5**) provocou o aumento da atividade biológica, ou seja, diminuiu a Cl_{50} , em relação ao composto **1**, o que está de acordo com a literatura (Asche *et al.*, 2005). Para os derivados clorado (**3**) e bromado (**4**), a atividade em células cancerosas foi duas vezes maior do que em células normais.

Tabela 20: Atividade Citotóxica da série **1**, expressa em Cl_{50} em $\mu\text{mol L}^{-1}$ dos compostos em relação às linhagens de células de câncer e uma linhagem normal. (Da Silva Júnior, *et al.*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15 (2007) 7035–7041). * não definido.

Linhagem Celular	HL – 60	MDA MB – 435	SF – 295	HTC – 8	PC – 3	L - 929
Substância						
1 (H)	3,66	0,78	5,99	4,58	0,92	8,52
2 (F)	0,95	0,36	1,75	1,51	0,92	1,54
3 (Cl)	1,10	0,48	1,02	1,10	1,38	3,28
4 (Br)	1,26	0,50	2,34	1,26	1,15	2,57
5 (NO₂)	0,91	0,63	1,37	0,91	1,12	1,15
DOX	0,04	0,86	0,42	0,07	0,44	nd*

As substâncias da série **2** foram testadas quanto à sua citotoxicidade. A avaliação foi realizada pelo método do MTT (em 72 horas) em cinco linhagens de células (Tabela 21). Em geral as substâncias tiveram uma atividade citotóxica variada, com Cl_{50} variando de 0,12 a 2,77 $\mu\text{g/mL}$. Todas elas apresentaram atividade citotóxica, com seletividade relativa dos compostos **8** e **9** (principalmente **9**) para a linhagem de câncer de mama, pois como se pode observar na tabela 21, a Cl_{50} desses compostos para esta linhagem foi menor (cerca de 3 vezes menor para o composto **9**).

Tabela 21: Atividade Citotóxica da série **2**, expressa em Cl_{50} em $\mu\text{mol L}^{-1}$ dos compostos em relação às linhagens de células de câncer.

Linhagem Celular	HL – 60	MDA MB – 435	SF – 295	HTC – 8	PC – 3
Substância					
Nor-β-lapachona	1,75	0,31	1,58	1,36	5,61
6 (N₃)	3,08	1,19	3,23	2,78	4,79
7 (Isopropil-OH)	4,58	3,62	4,75	5,97	7,84
8 (Aril)	2,10	1,21	2,53	3,18	2,58
9 (Cicloexanol)	1,17	0,43	1,27	1,52	1,83
DOX	0,04	0,86	0,42	0,07	0,44

Observa-se que o composto **7** apresentou uma atividade menos pronunciada que os outros compostos da série **2** (para todas as linhagens celulares), mesmo sendo da mesma série de moléculas, e apresentando anel triazólico, por esse motivo foi necessário pesquisar qual o parâmetro físico-químico levaria a uma visível diferença em suas atividades biológicas, como por exemplo, os parâmetros eletroquímicos e os coeficientes de partição dessas moléculas (Log P) (Goodman *et al.*, 2003), que estão descritos na tabela 22.

Tabela 22: Coeficiente de partição e parâmetros eletródicos das substâncias da série **2**.

Compostos	<i>E</i> _{plc} Acetate buffer pH 4.5 V vs. Ag/AgCl	<i>E</i> _{plc} DMSO, TBABF ₄ V vs. Ag/AgCl	Log P
Nor-β-lapachona	-0,228	-0,685	1,240
6 (N₃)	-0,176	-0,682	0,722
7 (Isopropil-OH)	-0,165	-0,675	0,955
8 (Aril)	-0,163	-0,678	2,948
9 (Cicloexanol)	-0,155	-0,677	2,126

Nota-se que o composto **7** tem um valor de Log P bem menor que o dos compostos **8** e **9** e, inclusive menor que o Log P da *nor*-β-Lapachona, o que significa que ele é menos lipofílico, com isso, possivelmente ele apresenta maior dificuldade de penetrar, por difusão simples, através da membrana das células. Entretanto o composto **6** tem Log P ainda menor que o composto **7** e uma atividade biológica similar aos compostos **8** e **9**, neste caso deve-se considerar, em adição, que o composto **6** é uma molécula bem menos volumosa (M 269,26 g mol⁻¹) que o composto **7** (M = 353,14 g mol⁻¹) e demais compostos (M = 373,14 g mol⁻¹ e M = 393,17 g mol⁻¹, **8** e **9**, respectivamente).

Observa-se neste trabalho que, apesar de não ter havido uma correlação direta entre os valores de CI₅₀ e os potenciais de pico catódico (*E*_{plc}, em meio aprótico) para cada uma das substâncias, individualmente, as quinonas heterocíclicas, de ambas as séries (1 e 2), tem potencial de redução mais positivos que -0,75 V vs. Ag/AgCl⁻ (Conforme dados da literatura referidos

na introdução, Goulart *et al.*, 1997), e, portanto, todas estão dentro da faixa ótima de facilidade de redução requerida para uma atividade biológica relevante, conforme pode ser observado na figura 59.

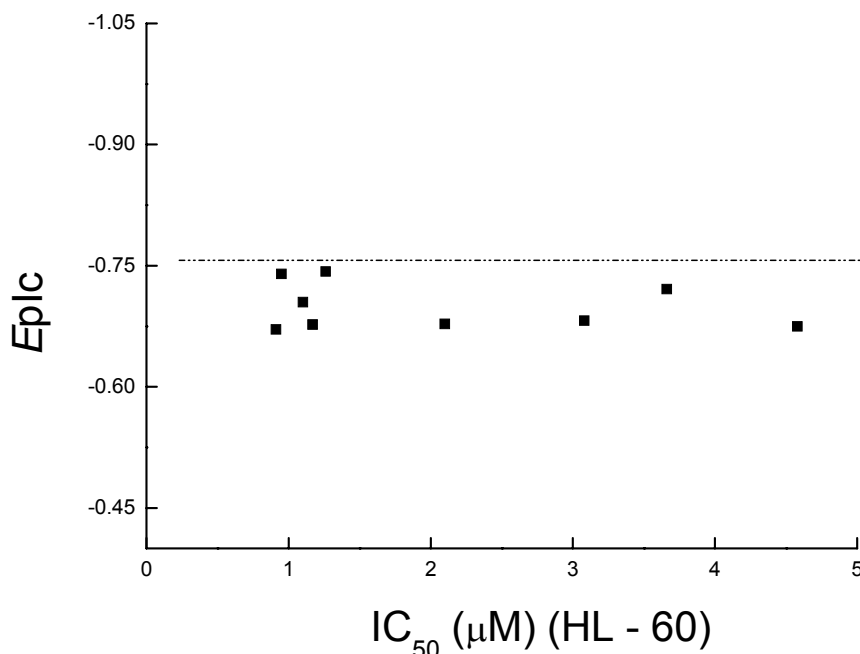


Figura 59: Relação entre os potenciais de pico catódicos (E_{plc}) e Concentração Inibitória mínima (CI_{50}) das quinonas heterocíclicas das séries **1** e **2** em linhagem HL – 60.

Dentre as duas séries, a substância **5** foi escolhida para os estudos farmacológicos mais abrangentes, visando propor seu mecanismo de ação farmacológico. A escolha do composto **5** teve como fundamento a presença de dois grupos farmacofóricos e eletroativos na molécula, seu comportamento eletroquímico, e seu valor de CI_{50} em teste do MTT, que foi próximo ao valor de CI_{50} do controle positivo (Doxorrubicina), no tempo de 24 horas, utilizando uma linhagem leucêmica (HL – 60), conforme pode ser observado na tabela 23. Também foi observado que o composto **5** apresentou uma CI_{50} 6 vezes menor que seu precursor, a Nor- β -Lapachona e por esse motivo em todos os testes farmacológicos, essa foi utilizada para comparação. Os resultados do ensaio do MTT foram baseados em dados coletados a partir de dois experimentos independentes, em triplicata. conforme mostrado na tabela 23.

Tabela 23: Atividade Citotóxica expressa em CI_{50} em $\mu\text{mol L}^{-1}$ do composto 5 e controle positivo (DOX) (linhagem celular HL-60) em um tempo de 24 horas.

Compostos	CI_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
<i>nor</i> - β Lapachona	2,9
5	0,48
DOX	0,5

Após este resultado foram realizados ensaios para avaliação da viabilidade celular por exclusão do azul de tripan, avaliando assim também a citotoxicidade desta molécula (composto **5**), em relação à linhagem HL-60.

IV.3 – 2 – Viabilidade celular – Exclusão por Azul de Tripan

Este teste (viabilidade celular feito por exclusão do azul de tripan) permitiu quantificar separadamente as células viáveis das células mortas pela substância testada. De acordo com a literatura, o corante penetra em todas as células, porém somente as células viáveis conseguem bombear o tripan para fora, sendo possível dessa maneira, observar uma coloração azulada nas células metabolicamente inativas (Peres *et al.*, 2005).

Foram testadas três concentrações de **5** e duas de *nor*- β -Lapachona (figura 60) baseando-se em suas CI_{50} encontradas a partir do ensaio por redução de MTT. Observou-se que o composto **5** diminuiu a viabilidade celular nas maiores concentrações (1,5 e 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$), mas foi apenas na maior concentração em que o número de células inviáveis foi significativo.

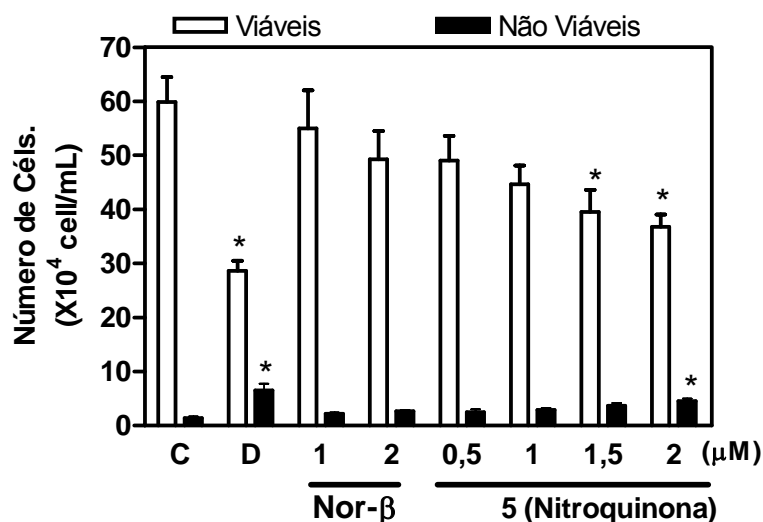


Figura 60: – Efeitos da *Nor-β*-Lapachona e do composto **5** na viabilidade de células HL – 60, determinados por exclusão do Azul de Tripán, após 24 horas de incubação. (C) Controle negativo tratado com veículo (Meio RPMI); (D) Doxorubicina usada como controle positivo (0,3 μg/mL). $p < 0.05$ comparado com o controle pela ANOVA seguido do teste de Dunnett, para dois experimentos realizados em duplicata ($n=4$).

IV.3 – 3 – Análise morfológica – Coloração diferencial por hematoxilina/eosina (HE).

Conforme a literatura, a coloração diferencial por hematoxilina/eosina permite a análise da integridade nuclear, bem como alterações existentes nos citoplasma e membrana (Peres *et al.*, 2005). Partindo deste princípio, a análise morfológica das células HL – 60 tratadas em relação às não-tratadas com o composto **5**, tratamento feito por coloração diferencial por hematoxilina/eosina demonstrou alterações mediadas pelo composto **5**. As células apresentaram morfologia compatível com apoptose (Hengartner *et al.*, 2000), incluindo redução no tamanho das células (ainda que discreto), formação de vacúolos intracelulares e formação de corpos apoptóticos. Além disso, apresentaram condensação (Figura 61A) e desordem (Figura 61B-C) da cromatina na maior concentração. Seguem as fotos relacionadas ao controle negativo e ao composto **5**, na maior concentração (2,0 μmol L⁻¹).

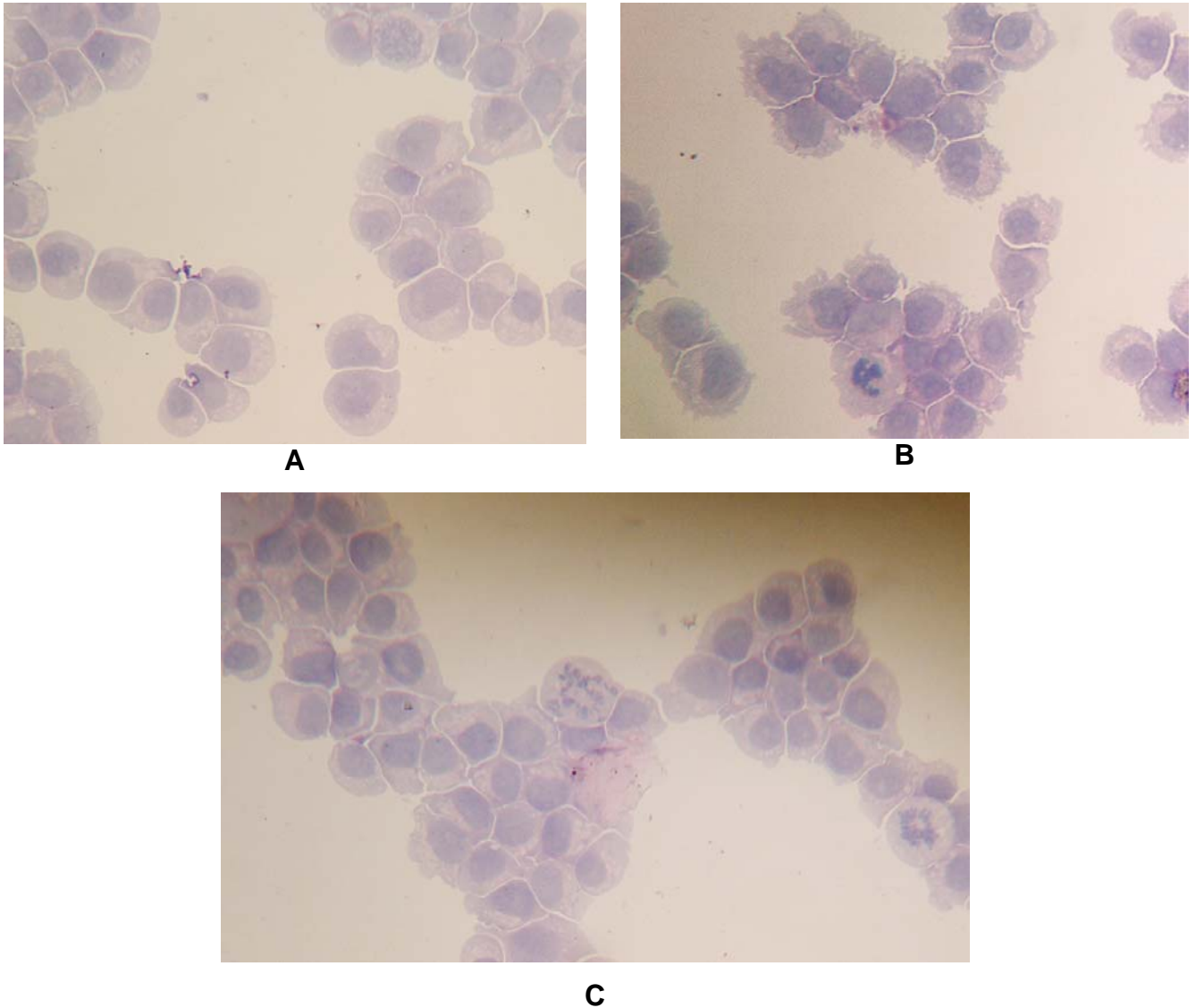


Figura 61: Coloração Hematoxilina/Eosina. (A) Controle. (B) e (C) Composto 5, $c = 2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$.

IV.3 – 4 – Análise morfológica - Coloração por May-Grunwald-Giemsa.

Esta coloração se baseia em interações eletrostáticas entre os corantes e moléculas-alvo, o que permite distinguir o citoplasma e o núcleo, sendo possível analisar a célula quanto à sua integridade nuclear, bem como avaliar alterações no citoplasma.

Da mesma forma que para a coloração com H/E foi possível observar a condensação da cromatina, como também uma desorganização desse material nuclear dentro da célula, conforme fotos exibidas na figura 62. Além disso, foi observada uma diminuição do tamanho celular e a formação de vacúolos no citoplasma, sinais estes compatíveis com apoptose (Hengartner *et al.*, 2000).

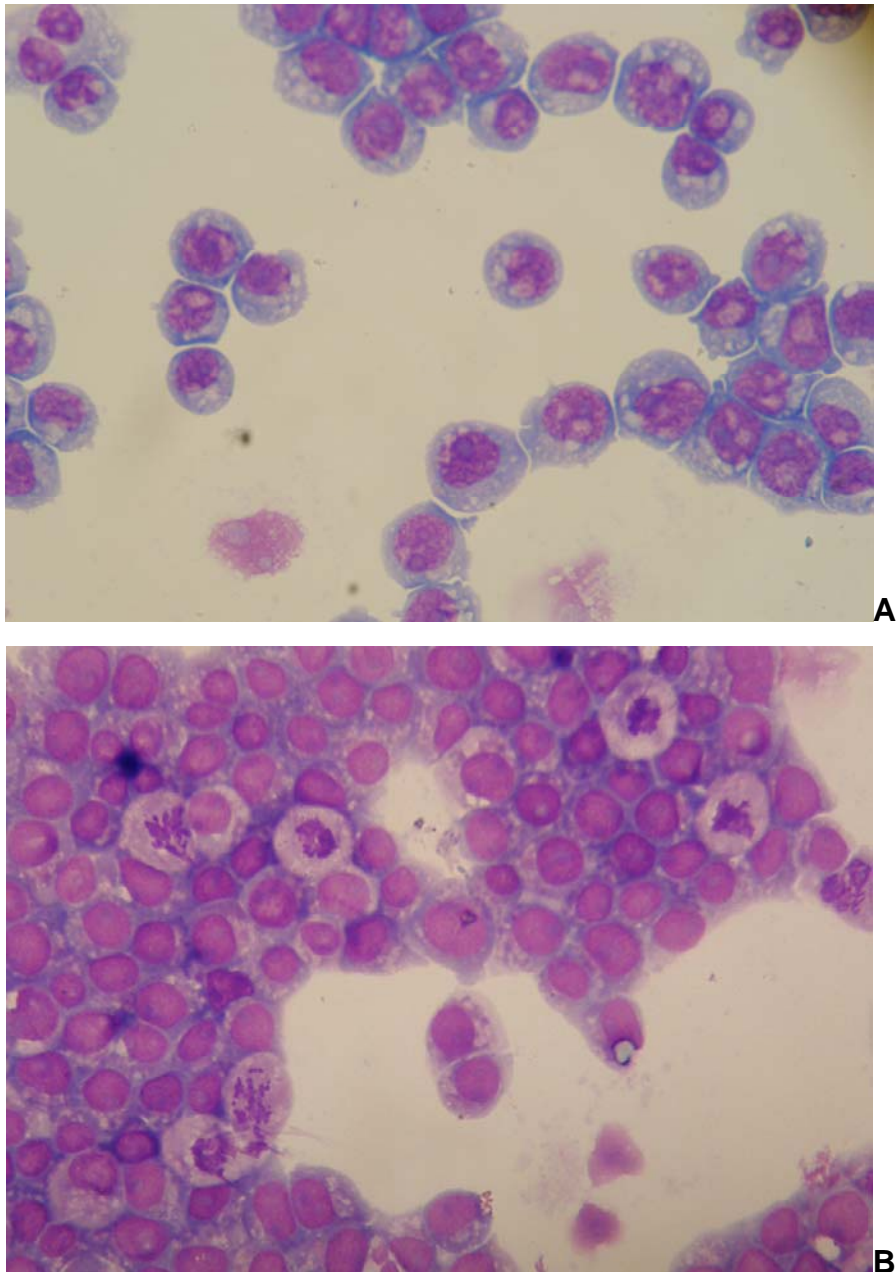


Figura 62: A Coloração May-Grunwald-Giemsa (Controle). B Coloração May-Grunwald-Giemsa Composto 5, $c = 2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$.

IV.3 – 5 – Análise morfológica – Coloração diferencial por Laranja de Acridina / Brometo de Etídio.

A morfologia de células HL – 60 tratadas com *nor*- β -Lapachona e com o composto **5**, foi investigada utilizando coloração LA/BE, para microscopia fluorescente. Foi calculada a percentagem de células viáveis, células apoptóticas e necróticas (McGahon *et al.*, 1995).

Células uniformemente verdes com morfologia normal foram observadas no grupo controle atingindo mais de 90% das células contadas (Figura 64A). As células tratadas com o composto **5** apresentaram um número crescente (dose-dependente) de células em apoptose. Tal característica foi significativa nas concentrações de 1,5 e 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($p < 0,05$, Figura 63); apenas nas maiores concentrações, foram encontradas células necróticas, entretanto, isso não foi significativo estatisticamente. Além disso, as células tratadas com doxorubicina também mostraram características apoptóticas, o que já era esperado, conforme a literatura (Hengartner *et al.*, 2000).

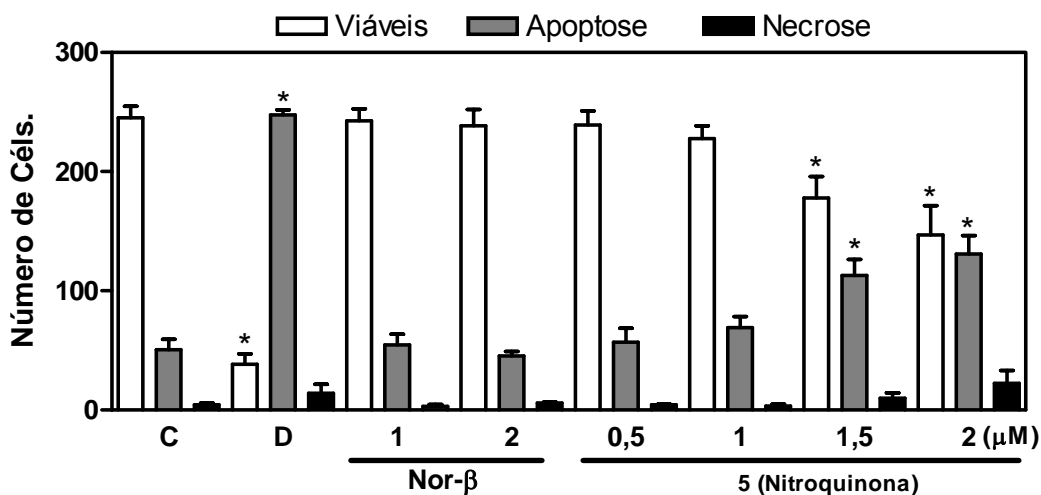


Figura 63: – Efeito da *Nor*- β -Lapachona e do Composto **5** na viabilidade celular da linhagem HL – 60. Coloração diferencial por acridina laranja e brometo de etídio. (AO/EB), por microscopia de fluorescência (após 24 horas de incubação); (C) Controle Negativo (meio RPMI); (D) Controle positivo – Doxorubicina (0.3 $\mu\text{g/mL}$). Foi considerado $p < 0.05$ comparado ao controle por ANOVA seguido de teste de Dunnett. Os valores apresentados foram comparados de dois experimentos distintos realizados em triplicata. ($n=6$).

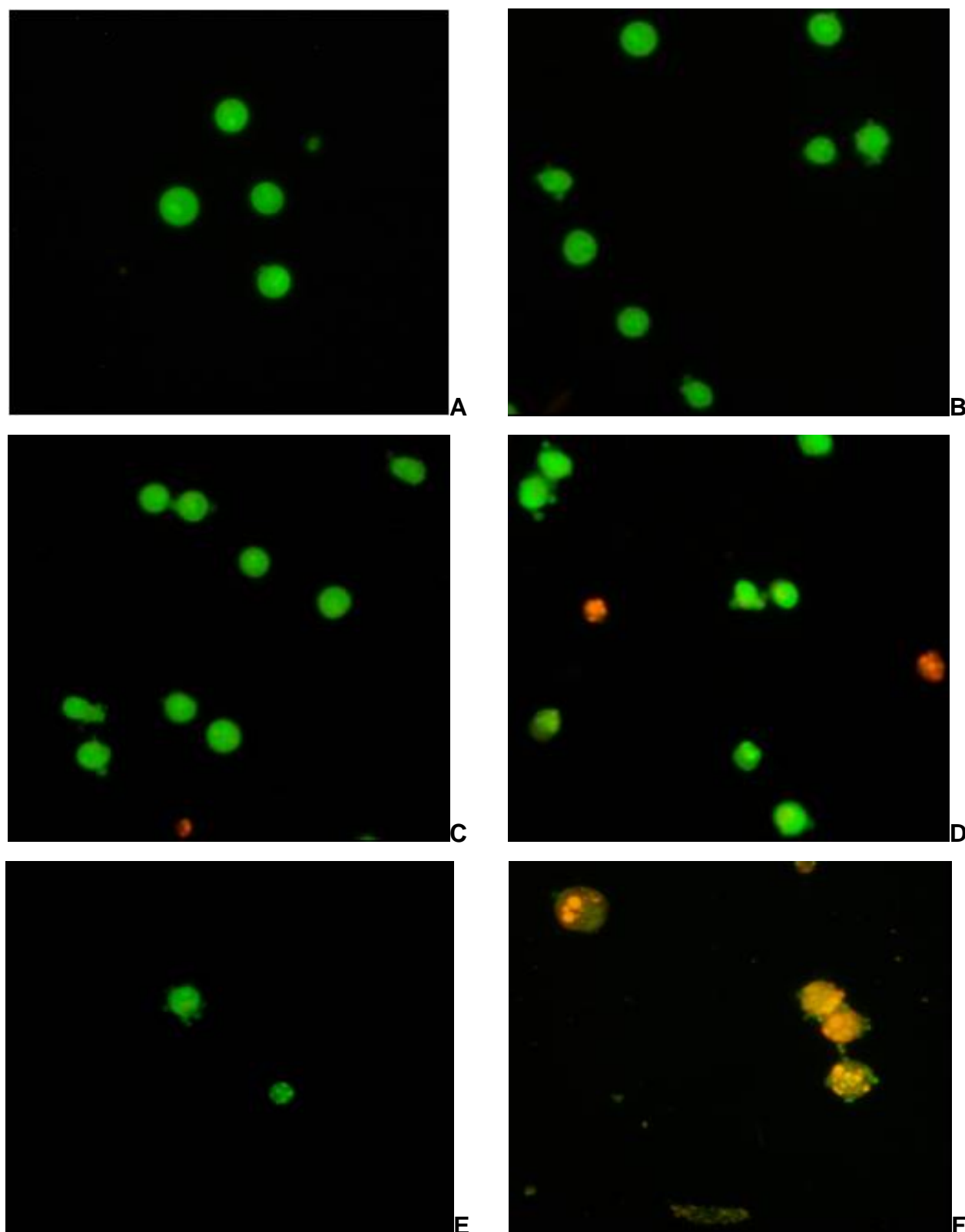


Figura 64: Fotos da coloração diferencial com acridina Laranja/Brometo de Etídio. (A) Controle; (B) Composto 5 [0,5] $\mu\text{mol L}^{-1}$; (C) Composto 5 [1,0] $\mu\text{mol L}^{-1}$; (D) Composto 5 [1,5] $\mu\text{mol L}^{-1}$; (E) Composto 5 [2,0] $\mu\text{mol L}^{-1}$. (F) Doxorubicina.

IV.3 – 6 – Síntese de DNA por incorporação de BrDU

Neste ensaio, foi avaliada a capacidade proliferativa das células tratadas em comparação as não-tratadas pela incorporação de BrdU no DNA (Figura 65). O composto **5**, apenas na maior concentração inibiu a síntese do DNA.

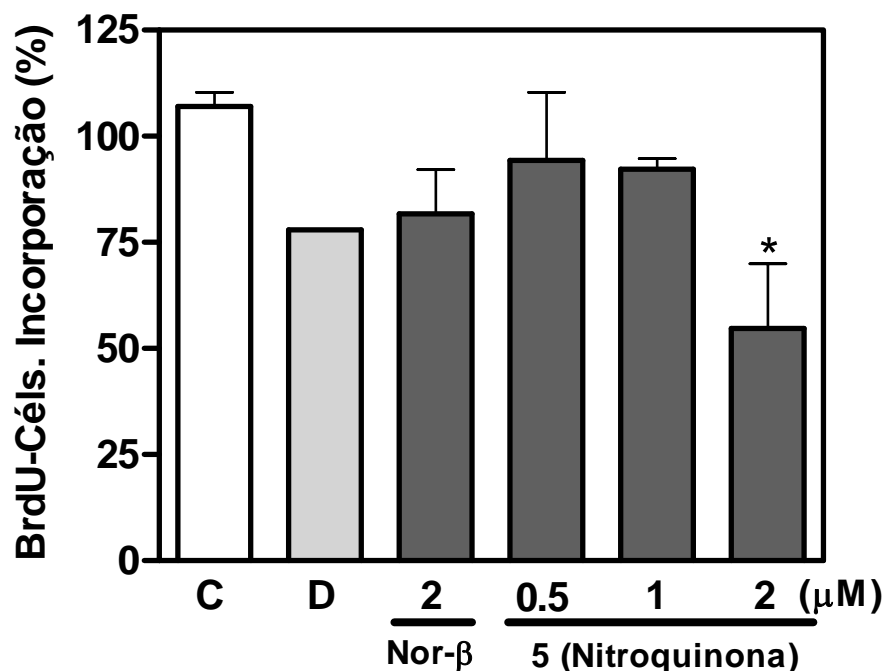


Figure 65 – Inibição da incorporação do BrDu (5-bromo-2'-desoxiuridina) em células HL-60 tratadas com Nor-β-Lapachona e composto **5**. **(D)** Doxorubicina (0.3 μg/mL), como controle positivo. Dados apresentados como valores médios de dois experimentos independentes, realizados em duplicata ($n=4$), de percentagem de positividade de BrDU por 200 células. $p < 0.05$ comparado ao controle por ANOVA, seguido de teste de Dunnett.

IV.3 – 7 – Avaliação farmacológica *in vitro* do potencial genotóxico da nitroquinona – Teste do Cometa.

O ensaio do cometa foi realizado para verificar, em célula única, a possibilidade de dano direto ao DNA pela *nor*-β-Lapachona e pela nitroquinona (composto **5**). A partir dos resultados (Figura 66), verificou-se que não houve

dano direto ao DNA após 3 horas e 24 horas de tratamento, nas mesmas concentrações utilizadas para os outros testes.

Esses dados corroboram com os estudos eletroquímicos em biossensor de DNA, e demonstram que o biossensor de DNA constitui uma poderosa ferramenta, contribuindo para o esclarecimento do mecanismo de ação de novos fármacos e candidatos a novos fármacos.

De posse destes resultados, podemos considerar que, a exemplo da β -lapachona que não é um agente que causa dano direto ao DNA (Wuerzberger *et al.*, 1998, Brett *et al.*, 2002^A), poderia se esperar que um derivado direto como a *nor*- β -Lapachona, também não atuasse por meio deste mecanismo. Entretanto, a nitroquinona teria a possibilidade de causar este dano devido à presença do grupo nitro na molécula, a exemplo da niclosamida (Brett *et al.*, 2002^B), mas foi comprovado pelos dois métodos, ensaio do cometa e biossensor de DNA, que o mecanismo de ação farmacológico da nitroquinona não ocorre por interação direta com o DNA.

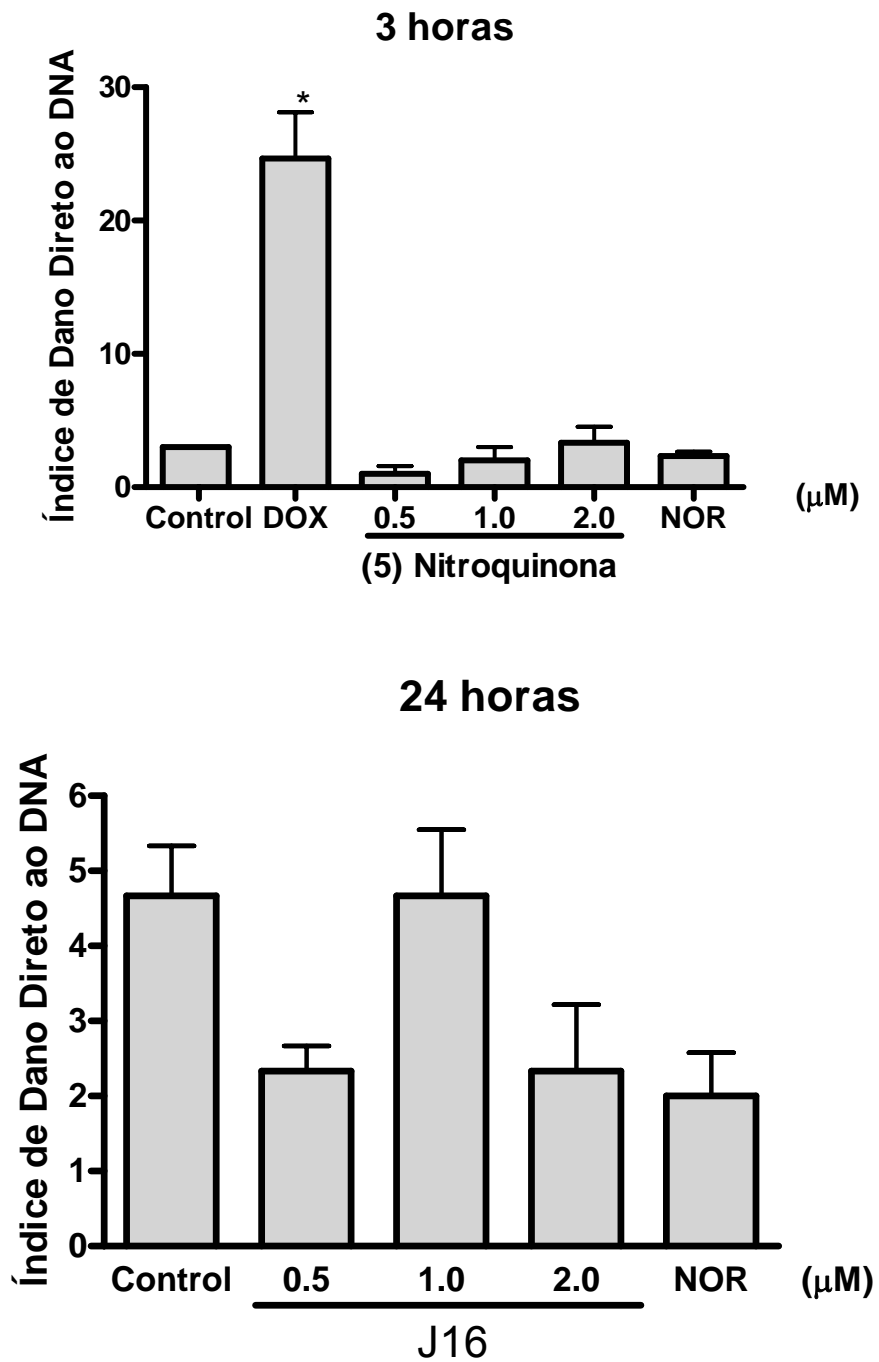


Figura 66: (A) – Índice de dano em um tempo de 3 horas e (B) – Índice de dano em um tempo de 24 horas no teste do cometa em HL – 60. *p < 0,05 vs. controle (ANOVA, teste de Dunnett).

IV.3 – 8 – Análises por citometria de fluxo

1º) Determinação da integridade da membrana celular por Citometria de Fluxo - Viabilidade Celular.

A análise da integridade de membrana celular células HL – 60 tratadas com *nor*- β -Lapachona e com o composto **5** (nitroquinona) não evidenciou interferência significativa em relação às células não tratadas (Figura 67), para a maioria das concentrações, exceto para a maior concentração da nitroquinona (composto 5) (Figura 67).

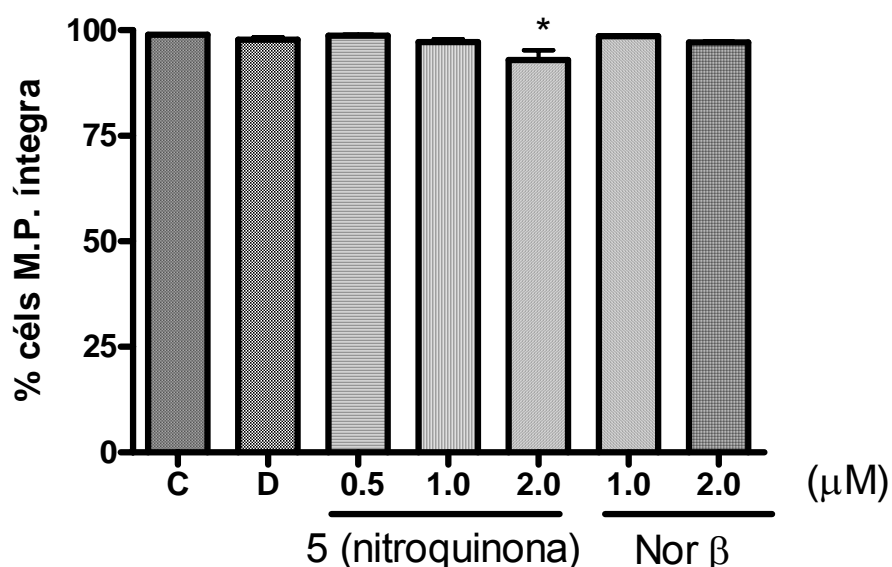
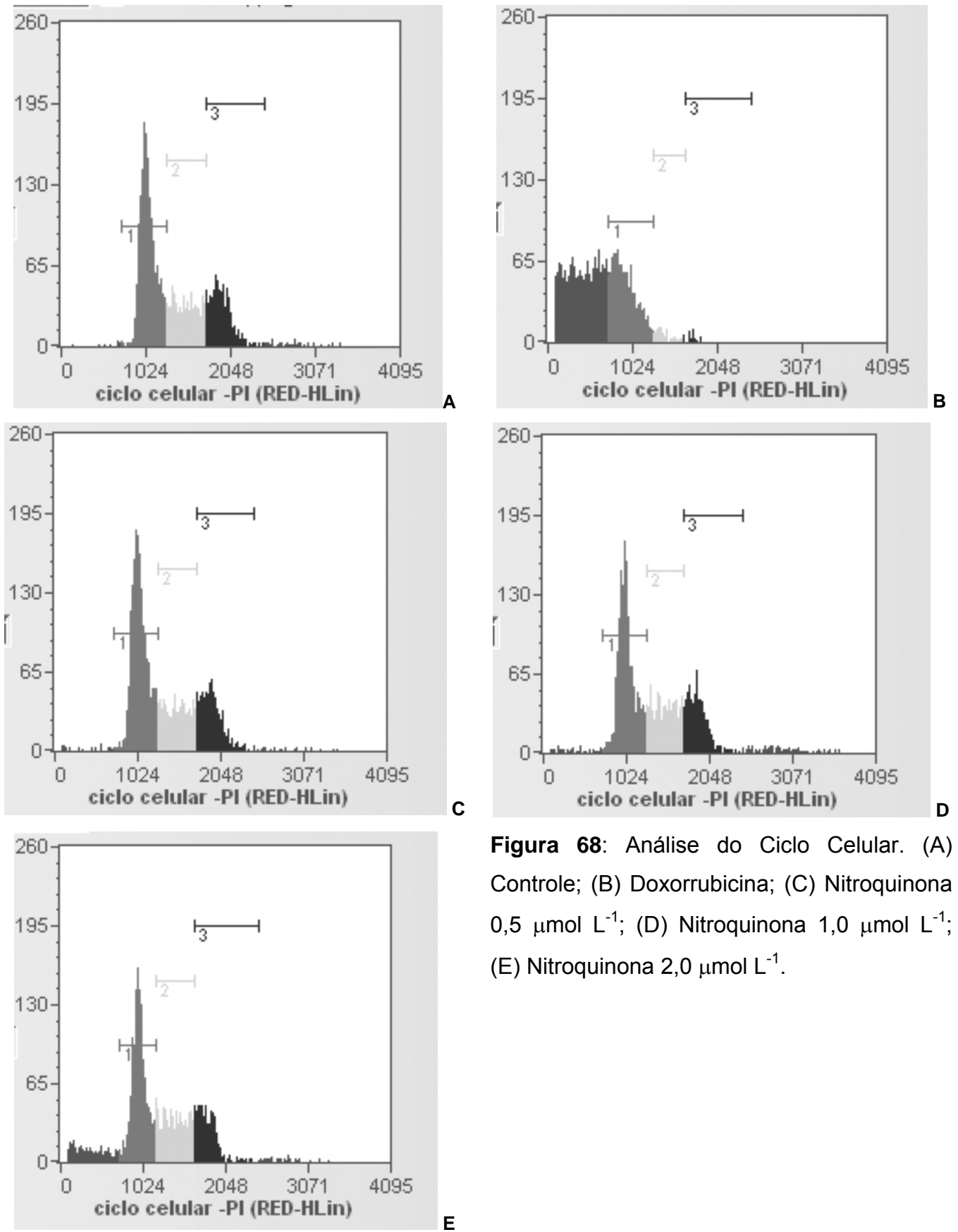


Figura 67: Análise da integridade de membrana celular células HL – 60 tratadas com *Nor*- β -Lapachona e com o composto **5** (nitroquinona).

2º) Análise do Ciclo Celular e Fragmentação de DNA.

A análise do ciclo celular das células tratadas com *nor*- β -Lapachona e a nitroquinona derivada (composto **5**) não evidenciou interferência em nenhuma fase específica do ciclo celular em relação às células não tratadas (Figura 68). Contudo, foi observado um aumento na fragmentação de DNA na maior dose (Figura 68E), que pode ser secundário ao processo de apoptose, previamente observado por meio dos estudos de coloração diferencial.



O mesmo comportamento foi observado para a *nor*- β -Lapachona (Figura 69).

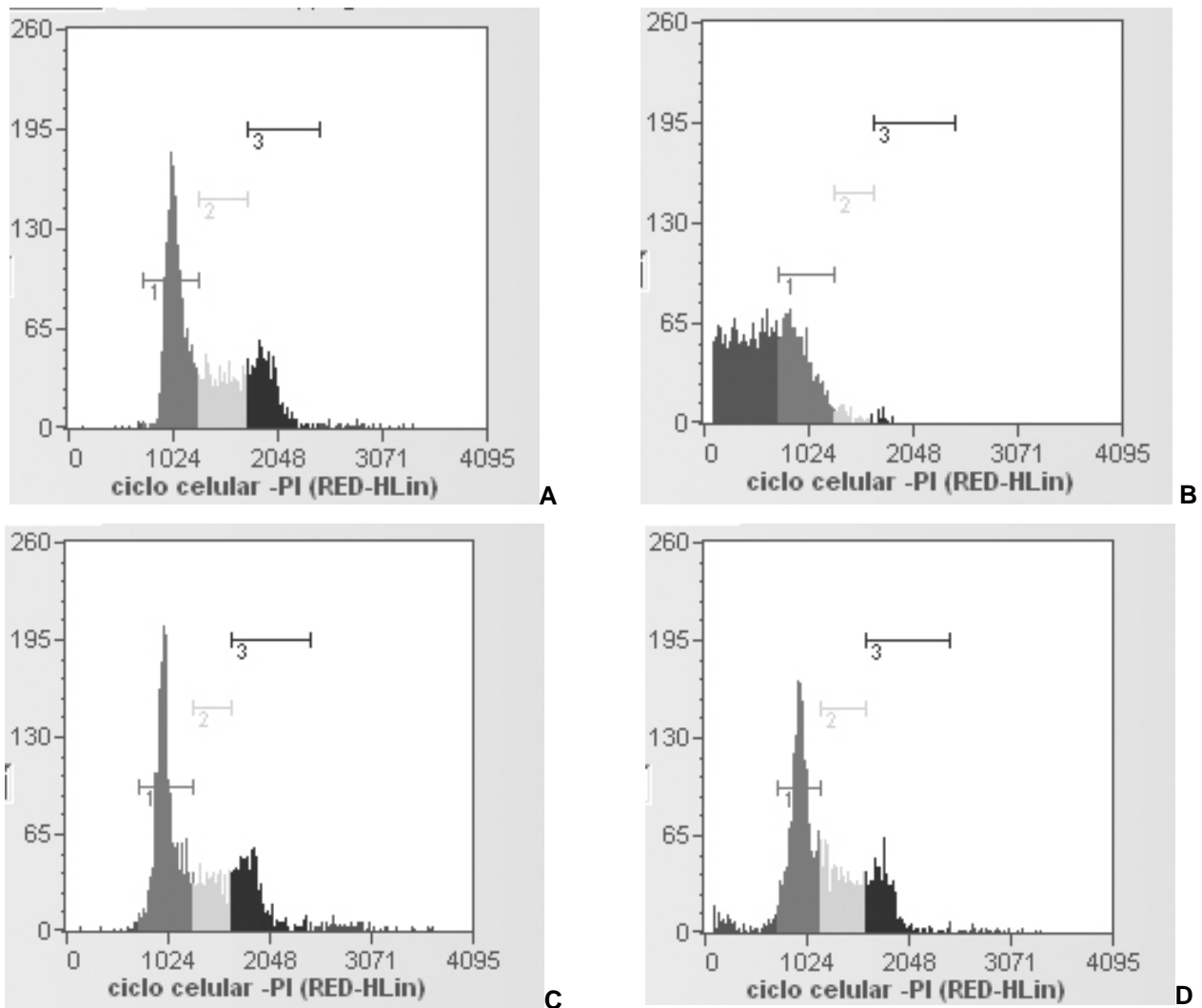
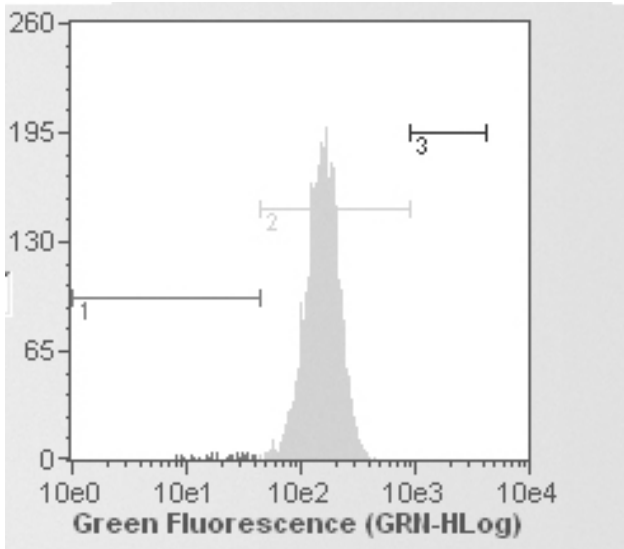


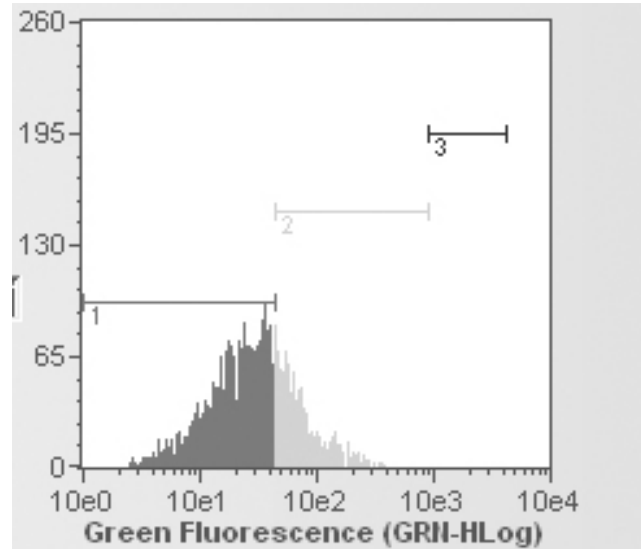
Figura 69: Análise do Ciclo Celular. (A) Controle; (B) Doxorubicina; (C) *Nor*- β -Lapachona 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (D) *Nor*- β -Lapachona 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

3º) Determinação do Potencial Transmembrânico da Mitocôndria.

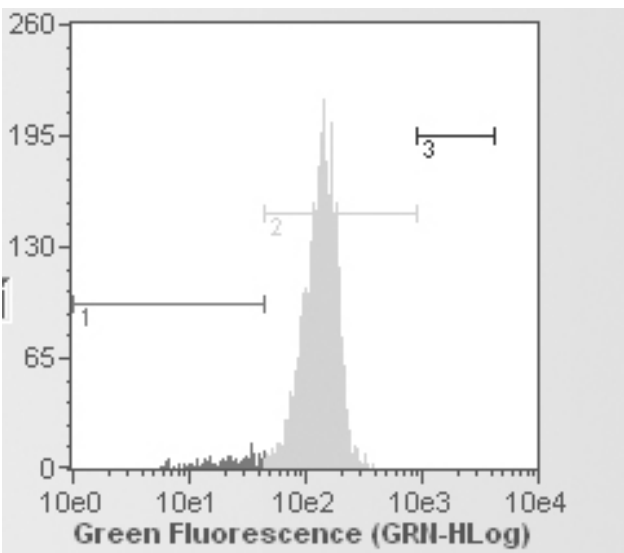
A análise do potencial transmembrana da mitocôndria das células tratadas com *nor*- β -Lapachona e Nitroquinona (Composto 5) foi realizada por citometria de fluxo com coloração por Rodamina 123. E desta análise foi constatada a despolarização da mitocôndria, em todas as concentrações da nitroquinona usadas nos tratamentos, desde a sua menor concentração (Figura 70). Também foi observada despolarização de mitocôndria com a *Nor*- β -Lapachona, entretanto não com a mesma intensidade que com a nitroquinona (Figura 71)



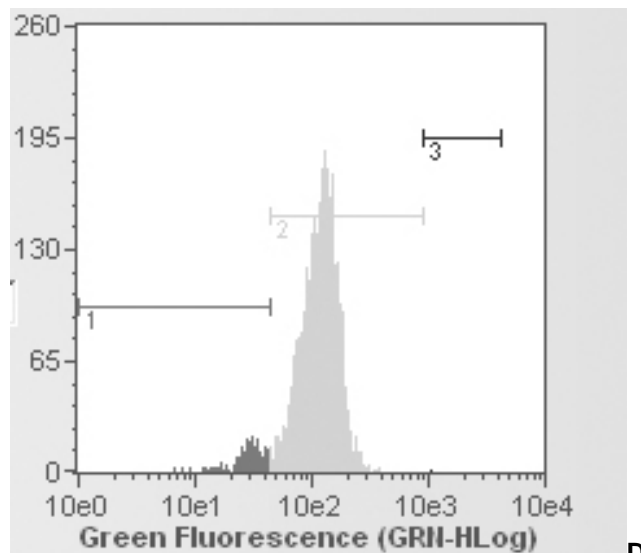
A



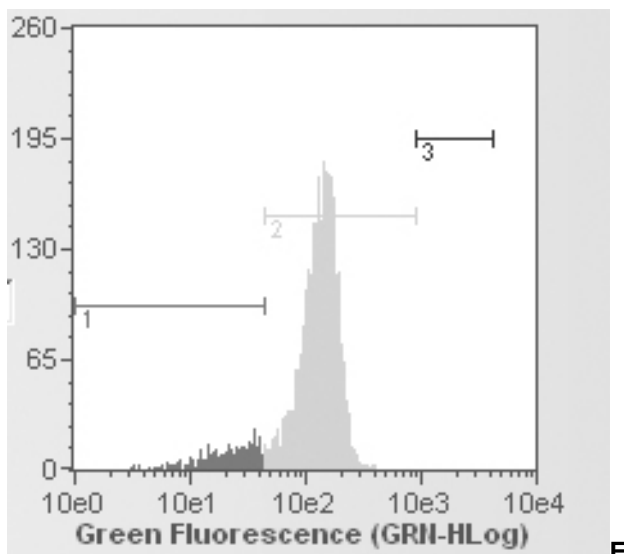
B



C



D



E

Figura 70: Análise do potencial transmembrânico de mitocôndria. (A) Controle; (B) Doxorubicina; (C) Nitroquinona 0,5 μM ; (D) Nitroquinona 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (E) Nitroquinona 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

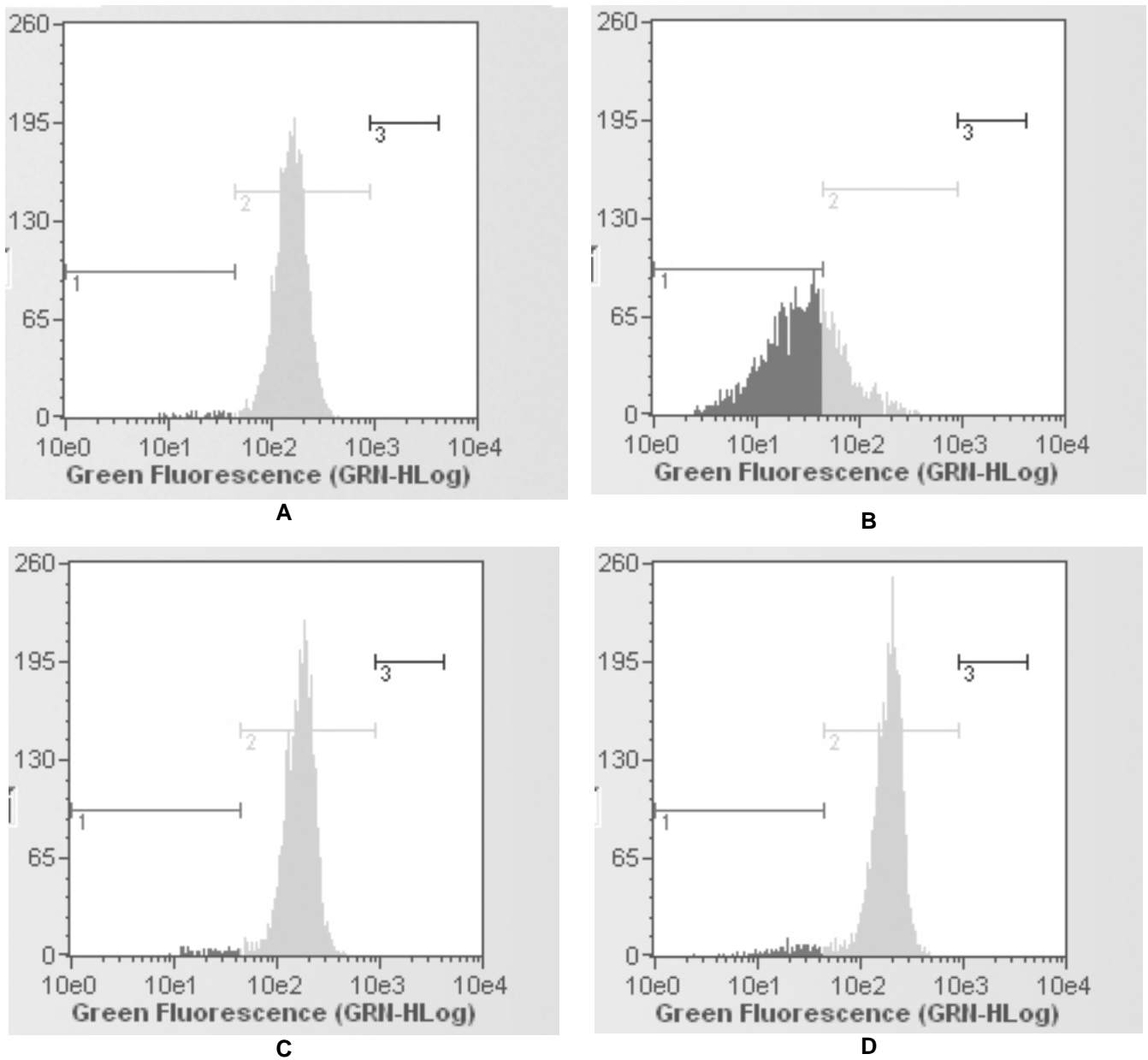


Figura 71: Análise do potencial transmembrânico de mitocôndria. (A) Controle; (B) Doxorubicina; (C) Nor-β-Lapachona 1,0 μmol L⁻¹; (D) Nor-β-Lapachona 2,0 μmol L⁻¹.

IV.4 – Racionalização dos resultados dos ensaios farmacológicos – proposição do mecanismo de ação da nitroquinona.

A partir dos resultados dos testes de citotoxicidade realizados com os compostos das séries **1** e **2**, foi possível observar que todas as quinonas heterocíclicas apresentam atividade contra células tumorais de várias linhagens. A partir dos resultados de citotoxicidade deu-se início à pesquisa do mecanismo de ação da nitroquinona (composto **5**).

Informações morfológicas características, observadas tanto diretamente por coloração diferencial com hematoxilina/eosina (H/E), Giemsa ou acridina laranja/Brometo de etídio (AL/BE) (redução de volume celular, aparecimento de corpos apoptóticos, formação de vacúolos intracelulares e condensação da cromatina) e quanto de viabilidade celular por citometria de fluxo sugeriram indução de morte celular por apoptose. Entretanto a via de indução deste processo ainda não se encontrava esclarecida.

Os estudos para análise do dano direto ao DNA, através do teste do cometa e do biossensor eletroquímico de DNA, confirmaram que a via de morte celular provocada pela nitroquinona não era desencadeada por interação direta com o DNA, o que comprova mais uma vez que o biossensor de DNA é uma ferramenta das mais importantes para contribuição na pesquisa do mecanismo de ação de candidatos a fármacos, cujo alvo seja o DNA.

Sabe-se que a mitocôndria desempenha um papel chave na deflagração da apoptose, em certas condições celulares. A via intrínseca da apoptose é também conhecida como via dependente da mitocôndria. A alteração no potencial transmembrânico mitocôndrial é medida para verificação indireta da ativação da via intrínseca. (Orrenius *et al.*, 2004). Com isso, a descoberta de que a presença da nitroquinona tem a capacidade de despolarizar a mitocôndria foi o passo mais significativo no estudo farmacológico desta substância, pelo fato de que confirma que as características morfológicas das células tratadas, observadas através das colorações com H/E, Giemsa e AL/BE, são realmente decorrentes de processo apoptótico, além disso, a citometria de fluxo confirmou que a indução de morte celular desencadeada

pela nitroquinona ocorre por ativação da via intrínseca da apoptose, ou seja, via mitocondrial.

Sobre a razão da despolarização da mitocôndria, estudos farmacoeletrouímicos podem ser novamente utilizados. A comprovação da geração, em meio aprótico de um diânion-diradical (pág. 87, figura 45), sugere um produto eletrogerado muito reativo, hábil para reagir com O_2 e provocar uma grande profusão local de espécies reativas de oxigênio (pág. 30, figura 17), que provocariam, desse modo, a despolarização da membrana mitocondrial, isto é, a via apoptótica induzida por desbalanço redox.

Conclusões

V – Conclusões

Os estudos farmacoeletrouímicos da nitroquinona **5**, em biossensor de DNA e de genotoxicidade direta, por meio do teste do cometa, contribuíram para a definição do mecanismo de ação da nitroquinona **5**, uma vez que demonstrou-se não haver interação direta com o DNA, mostrando que a substância não apresenta atividade genotóxica direta.

A avaliação conjunta de todos os ensaios farmacológicos realizados permitiu sugerir a via apoptótica como mecanismo de ação antitumoral da nitroquinona, sendo a análise por citometria de fluxo crucial para essa definição. Com essa ferramenta, definiu-se que a nitroquinona induz apoptose pela via intrínseca, pois causa despolarização de mitocôndria.

A obtenção dos parâmetros eletroquímicos das quinonas, em meio aprótico, permitiu concluir que tais substâncias, tanto da série **1**, quanto da série **2**, têm comportamento eletroquímico típico de quinonas, neste meio e que são afetadas pelos substituintes.

A análise eletroquímica das quinonas da série 2, em meio prótico, permitiu a observação de que essas substâncias também têm características de redução típica de quinonas e que o anel triazólico funcionou como um grupo altamente eletroatraente, deslocando positivamente os processos de redução desses compostos.

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

Os potenciais de redução catódicos (E_{pc}) de ambas as séries de quinonas não estão diretamente relacionados às atividades biológicas dos compostos, todas elas ativas. Entretanto, todos os derivados de quinonas estudados sofrem redução na faixa ótima de potencial de redução, capaz de transferir elétrons para o oxigênio, desencadeando atividades biológicas, baseadas em desbalanço redox.

O Log P, na série **2**, mostrou-se útil em termos de correlação com atividades antitumorais: substâncias mais lipofílicas mostraram-se mais ativas.

As acridinas antitumorais estudadas em biossensor de DNA, mostraram interação direta com o DNA e, conforme literatura, a intercalação entre as bases do DNA é o principal mecanismo de ação farmacológica dessas substâncias. A adaptação da metodologia do biossensor de DNA possibilitou o estudo dessas substâncias (insolúveis) em ssDNA.

Perspectivas

VI – Perspectivas

A nitroquinona **5** mostrou-se muito promissora e seu estudo abriu várias perspectivas para pesquisas posteriores. Uma característica peculiar da nitroquinona é que a mesma apresenta baixa solubilidade em meio aquoso, o que dificulta estudos em mais altas concentrações, a despeito do valor de citotoxicidade (CI₅₀) baixa. Tem-se o interesse de realizar estudos *in vivo* com essa substância, com isso, a baixa solubilidade é um fator limitante, por exemplo, para realização de testes de toxicidade em camundongos (DL₅₀), entretanto existe a possibilidade de síntese de sais da nitroquinona, o que provavelmente aumentará sua solubilidade em meio aquoso. Esta alternativa é também muito promissora uma vez que o sítio provável para a formação do sal é o grupo amino aromático, ou seja, possivelmente, a referida modificação estrutural pouco irá interferir na atividade biológica, pois se sabe que os principais grupos farmacofóricos são a quinona e o nitroaromático. Esta predição também é importante para os estudos em biossensor de DNA, uma vez que a própria nitroquinona apresenta uma onda de oxidação. A síntese do sal no grupo amina poderia anular o sinal eletroquímico de oxidação, interferente, deixando ainda mais clara a análise em biossensor de DNA.

Além disso, estudos de encapsulação da nitroquinona serão realizados.

Devido ao mecanismo de ação ter sido estabelecido como apoptose por via mitocondrial, visa-se posteriormente realizar testes mais específicos para caspases. Ainda assim, como se observa na literatura, há interação da β -Lapachona com topoisomerase, daí, a avaliação em relação à nitroquinona derivada da *nor*- β -Lapachona, faz-se indispensável. E ainda, devido a desordem cromossômica observada nos ensaios morfológicos, visa-se realizar estudos relacionados à avaliação da interação dessa quinona com citoesqueleto.

Ainda em relação à atividade biológica, visa-se realizar estudos da nitroquinona em linhagem de células normais humanas, a fim de avaliar a toxicidade seletiva desta substância.

Outra expectativa que surgiu com este trabalho é a possibilidade de definição de mecanismos eletroquímicos de redução de outros compostos,

através da técnica de espectroeletróquímicas (ESR), aliados a estudos em presença de concentrações diferenciadas de oxigênio, visando a averiguação a possibilidade da nitroquinona gerar espécies reativas de oxigênio.

Várias dessas atividades já se encontram em realização.

***Referências
Bibliográficas***

VII – Referências Bibliográficas

ADAMS, G. E., CLARKE, E. D., JACOBS, R. S., STRATFORD, I. J., WALLACE, R. G., WARDMAN, P., WATTS, M. E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1976**, 72, 824.

AGUILAR-MARTINEZ, N. A. MACÍAS-RUVALCABA, J. A. BAUTISTA-MARTÍNEZ, M. GÓMEZ, F.J. GONZÁLEZ, I. GONZÁLEZ.: “Review: Hydrogen bond and protonation as modifying factors of the quinine reactivity”. *Curr. Org. Chem.* **2004**, 8, 1721.

ALMEIDA, V. L., LEITÃO, A., REINA, L. C. B., MONTANARI, C. A., DONNICI, C. L., “Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular Não Específicos que Interagem com DNA: Uma Introdução”. *Quimica Nova*, **2005**, 28, 1, 118-129.

ASCHE, C.: “Antitumour quinones”. *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2005**, 5, 449-467.

ASHNAGAR, A., BRUCE, J. M., DUTTON, P. L., PRINCE, R. C.: “One-electron and 2-electron reduction of hydroxy-1,4-naphthoquinones and hydroxy-9,10-anthraquinones - the role of internal hydrogen-bonding and its bearing on the redox chemistry of the anthracycline antitumour quinones” *Biochim. Biophys. Acta.* **1984**, 801, 351.

BALMAIN, A.; GRAY, J.; PONDER, B. “The genetics and genomics of cancer”. *Nature genetics*, (supplement) **2003**, v.33, p.238-244.

BARD A. J., FAULKNER L. R., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*; Wiley; New York, **1990**.

BOLLO S., NÚÑEZ-VERGARA L. J., BONTÁ M., CHAUVIERE G., PERIÉ J., "Cyclic voltammetric studies on nitro radical anion formation from megazol and some related nitroimidazole derivatives". *Journal of Electroanalytical Chemistry* 511, 46-54, **2001**.

BOLTON, J. L., TRUSH, M., PENNING, T., DRYHURST G., MONKS, T. J., "Role of Quinones in Toxicology", *Chem. Res. Toxicol.*, **2000**, 13, 135-160.

BRAÑA, M. F., CACHO, M., GRADILLAS, A., PASCUAL-TERESA, B., RAMOS, A., "Intercalators as Anticancer Drugs", *Current Pharmaceutical Desing*, **2001**, 7, 1745-1780.

BRETT, A. M. O., GOULART, M. O. F., DE ABREU, F. C., "Detection of the damage caused to DNA by niclosamide using a DNA biosensor". *Biosensors and Bioelectronics*, **2002**, 17, 913-919^B.

BRETT, A. M. O., GOULART, M. O. F.; DE ABREU, F. C.: "Reduction of beta-lapachones and its reaction with L-cysteine and mercaptoethanol onto glassy carbon electrode" *Bioelectrochem.*, **2002**, 56, 53.^A

BRETT, A. M. O., MACEDO, T. R. A., RAIMUNDO, D., MARQUES, M. H., SERRANO, S. H. P.: "Voltammetric behaviour of mitoxantrone at a DNA-biosensor" *Biosens. Bioelectronics*. **1998**, 13, 861.

BRETT, A. M. O., SERRANO, S. H. P., GUTZ, I. G. R., LA-SCALEA, M. A: "Comparison of the voltammetric behavior of metronidazole at a DNA-modified glassy carbon electrode, a mercury thin film electrode and a glassy carbon electrode" *Electroanal.* **1997**, 110.

BRETT, A. M. O., SERRANO, S. H. P., GUTZ, I. G. R.; LA-SCALEA, M. A.: "Electrochemical reduction of metronidazole at a DNA-modified glassy carbon electrode" *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **1997**, *42*, 175.

BRETT, A. M. O., SERRANO, S. H. P., MACEDO, T., RAIMUNDO, D., MARQUES, M. H., LA-SCALEA, M. A.: "Electrochemical determination of carboplatin in serum using a DNA-modified glassy carbon electrode" *Electroanal.* **1996**, 992.

BRETT, A. M. O., SERRANO, S. H. P., PIEDADE, J. A. P., COMPTON, R.G., HANCOCK, G.: In "Comprehensive Chemical Kinetics", Elsevier: Amsterdam, **1999**, cap. 3, 91.

CAREY, F. AND SUNDBERG, R. Free-Radical Reaction, Chapter 12. *Advanced Organic Chemistry, Fourth Edition. Part A: Structure and Mechanisms.* **2007**.

CAVALCANTI, J. C. ; ABREU, F. C. ; OLIVEIRA, N. V. ; MOURA, M. A. B .F. DE ; CHAVES, J. G. ; ALVES, R. J. ; BERTINARIA, M. ; FRUTTERO, R. ; GOULART, MARÍLIA O. F. "Effect of the leaving group on the electrodic reduction mechanism of anti-Helicobacter pylori metronidazole derivatives, in aprotic and protic media". *Bioelectrochemistry*, v. 63, **2004**, p. 353-357^B.

CAVALCANTI, J. C. M., MOURA, M. A. B. F., OLIVEIRA, N. V., FRUTTERO, R., BERTINARIA, M., GOULART, M. O. F., "Evidence of self-protonation on the electrodic reduction mechanism of an anti-Helicobacter pylori metronidazole isostere.". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Irlanda, v. 571, n. 2, **2004**, p. 177-182^A.

CÉNAS, N., ANUSEVICIUS, Z., BIRONAITÉ, D., BACHMANOVA, G. L., ARCHAKOV, A. I., ÖLLINGER, K., “The Electron-Transfer Reactions of NADPH-Cytochrome P450 Reductase with Nonphysiological Oxidants”, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1994**, 315, 400.

CHABNER, B. A.; CALABRESI, P. Antineoplásicos Em As Bases Farmacológicas da Terapêutica; Goodman, L. S.; Gilman, A., eds.; Mc Graw Hill: Rio de Janeiro, p.903-949, **1995**.

CHAIRES, J. B. A “Thermodynamic signature for drug–DNA binding mode”. *Arch. Biochem. Biophys.* **2006**, 453, 26-31.

CHAMBERS, J. Q.: “Electrochemistry of Quinones” In *The Chemistry of Quinonoid Compounds*; Patai, S., ed. John Wiley & Sons Ltd: New York, **1974**, 737.

CHAMBERS, J. Q.: “Electrochemistry of Quinones” In *The Chemistry of Quinonoid Compounds*; Patai, S.; Rapport, Z., eds. John Wiley & Sons Ltd: New York, **1988**, 719.

CHENG, A. C., JIAN, C. B., HUANG, Y., T., LAI, C. S., HSU, P. C., PAN, C. H., “Induction of apoptosis by *Uncaria tomentosa* through reactive oxygen species production, cytochrome c release, and caspases activation in human leukemia cells”, *Food and Chemical Toxicology*, 45, **2007**, 2206–2218.

COLLINS AR. “Comet Assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations”. *Mol. Biotechnol.* **2004**; 26: 249-61.

CRAWFORD, P.W., CARLOS, E., ELLEGOOD, J. C., CHENG, C. C., DONG, Q., LIU, D. F., LUO, Y. L.: "The electrochemistry of antineoplastic furanquinones: Electrochemical properties of benzo[b]naphtho[2,3-d]furan-6,11-dione derivatives" *Electrochim. Acta.* **1996**, 41, 2399.

CRUCHTEN, S. V., BROECK, W. V., "Morfological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis". *Anatomy, Histology e Embryology*, **2002**, 31:214-223.

CURI, R., Peres, C. M., "*Como Cultivar Células*". Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, **2005**.

DA SILVA JÚNIOR, E. N., SOUZA, M. C. B. V., PINTO, A. V., PINTO, M. C. F. R., GOULART, M. O. F., BARROS, F. W. A., PESSOA, COSTA-LOTUFO, L., MONTENEGRO, R. C., MORAES, M. O., FERREIRA, V., "Synthesis and potent antitumor activity of new arylamino derivatives of nor-b-lapachone and nor-a-lapachone", *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15 (**2007**) 7035–7041.

DA SILVA JÚNIOR, E. N., SOUZA, M. C. B., FERNANDES, M., MENNA-BARRETO, R. F. S., PINTO, M. C., PINTO, F. R., LOPES, F. A., DE SIMONI, C. A., DE ANDRADE, C., PINTO, A. V., "Synthesis and anti-Trypanosoma cruzi activity of derivatives from nor-lapachones and lapachones". *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (**2008**) *in press*.

DATASUS, Incidência de câncer no Brasil <<http://w3.datasus.gov.br/datasus/>>. acesso em 09.04.2008.

DE ABREU F. C., FERRAZ P. A. L., GOULART M.O.F., "Some applications of electrochemistry in biomedical chemistry. Emphasis on the correlation of electrochemical and bioactive properties". *Journal Of The Brazilian Chemical Society* 13 (1): 19-35, **2002**.

DE ABREU, F. C., DE PAULA, F. S., FERREIRA, D. C. M., NASCIMENTO, V. B., LOPES, J. C. D., SANTOS, A. M. C., SANTORO, M. M., SALAS, C. E., GOULART, M. O. F., "The application of DNA-biosensors and differential scanning calorimetry to the study of the DNA-binding agent berenil". *Sensors* **2008**, 8, 1519-1538.

DE ABREU, F. C., FERREIRA, D. M., AMATORE, C. J., FERREIRA, V. F., SILVA, M., SOUZA, M., GOMES, T. S., XIMENES, E. A., GOULART, M. O. F., "Electrochemistry of β -lapachone and its diazoderivative: Relevance to their compared antimicrobial activities." *Electrochemistry Communications* 7 (**2005**) 767–772.

DE ABREU, F. C., GOULART, M. O. F., "Trypanocidal Activity And Redox Potencial Of Heterocyclic-And-2- Hydroxy-Naphthoquinones" *BIOORGANIC MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS*, **1997**, v. 7, p. 2043-2048.

DE ABREU, F. C., GOULART, M. O. F., BRETT, A. M. O.: "Reduction of lapachones in aqueous media at a glassy carbon electrode". *Electroanal.* **2002**, 14, 29.

DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ, P., LOBO-CASTAÑÓN, M. J., MIRANDA-ORDIERES, A. J., MUÑÓN-BLANCO, P.: "Electrochemistry of Nucleic Acids at Solid Electrodes and Its Applications" *Electroanal.* **2004**, 16, 1193-1204.

DRYHURST, G. *Electrochemistry of Biological Molecules*, Academic Press, New York, **1977**.

EGGERS, S., "A história do câncer em direção à cura". *Hands*, 15 jun. **2002**.

FOSTER, I., Cancer: a cell cycle defect. *Radiography*, **2008**, 14, 144-149.

FRONTANA, C., GONZÁLEZ, I., "Effects of the molecular structure on the electrochemical properties of natural occurring α -hydroxyquinones. An electrochemical and ESR study". *Journal of Electroanalytical Chemistry* 603 (2007) 155-165.

FRY, F.H., JACOB, C.: "Sensor/Effector Drug Design with potential relevance to cancer". *Curr. Pharm. Design*. **2006**, 12, 4479.

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.: "Induction of DNA topoisomerase II-mediated DNA cleavage by beta-lapachone and related naphthoquinones" *Cancer Res*. **1997**, 57, 620.

FUCHS, D. F., WANNMACHER, L., FERREIRA, M. B. C., "Farmacologia Clínica: Fundamentos da Terapêutica Racional", 3ª Edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, **2004**.

GENG, C.X., ZENG, Z.C., WANG, J.Y. "Docetaxel inhibits SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells growth and induces apoptosis". *World J. Gastroenterol*, **2003**, 9: 696-700.

GIVAN, A. L., "Flow Cytometry", *Methods in Molecular Biology: Flow Cytometry Protocols*, 2nd ed., Humana Press Inc. **2000**.

GOLDBERG, I. R., MCKINNEY, T. M.: "Principles and Techniques of Electrochemical-Electron Spin Resonance Experiments". In *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, Kissinger, P. T., Heineman, W. R., eds. Marcel Dekker: New York, 2 ed., **1996**, 675.

GOODMAN & GILMAN, "As Bases Farmacológicas da Terapêutica", 10ª Edição, Rio de Janeiro, McGraw-Hill, **2003**.

GORDILLO, G., SCHIRIN, D. J., "The electrochemistry of ubiquinone-10 in a phospholipid model membrane". *Faraday Discuss.*, **2000**, 116, 89-107.

GOULART, M. O. F., DE SOUZA, A. A., DE ABREU, F. C., DE PAULA, F. S., SALES, E. M., ALMEIDA, W. P., BURIEZ, O., AMATORE, C., "Electrochemical Study Of Methyl 2-[*P*-Nitrophenyl(Hydroxy)Methyl]Acrylate, An Anticancer Drug And Its Reactivity Towards GSH and Oxygen". *Journal of Electrochemical Society*, 154 (11) **2007**, P121-P129.

GOULART, M. O. F., FREITAS, L. R., TONHOLO, J., DE ABREU, F. C., RASLAN, D. S., STARLING, S., ZANI, C. L., OLIVEIRA, A. B., CHIARI, E., "Trypanocidal activity and redox potential of heterocyclic- and 2-hydroxy-naphthoquinones" *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, 7, 2043–2048.

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

GRIMSHAW, J., in *Organic Electrochemistry: An introduction and a guide*. 3rd ed. H. Lund and O. Hammerich Editors, p. 411-434, Marcel Dekker, New York (**2001**).

GRITZNER, G.; KÜTA, J. *Pure. Appl. Chem.* **1984**, 4, 462.

HENGARTNER, M. O., "The Biochemistry of Apoptosis". *Nature*, **2000**, 407: 770-776.

HILLARD, E. A., DE ABREU, F. C., FERREIRA, D. C. M., JAOUEN, G., GOULART, M. O. F., AMATORE, C., "Electrochemical parameters and techniques in drug development, with an emphasis on quinones and related compounds", *in press (Chem. Commun.)*, **2008**.

HUSSAIN, H., KROHN, K., AHMAD, V. U., MIANA, G. A., GREEN, I. R., Lapachol: an overview ARKIVOC. **2007** (ii) 145-171.

INCA. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. *Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro.* <www.inca.gov.br/>. Acesso em 12 de março de 2008.

IRONS, R. D., SAWAHATA, T.: In "Bioactivation of Foreign Compounds" M. W. Anders, Ed. Academic Press, New York , **1985**, Cap. 9.

ITOH, S., HIROKATSU, K., FUKUZUMI, S., "Electrochemical Behavior and Characterization of Semiquinone Radical Anion Species of Coenzyme PQQ in Aprotic Organic Media". *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 7271 – 7277.

IYANAGI, T., MAKINO, N., MASON, H. S.: "Redox properties of reduced nicotinamide adenine-dinucleotide phosphate-cytochrome p-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide-cytochrome b5 reductases" *Biochem.* **1974**, 13, 1701.

JACQ, J.: "Reactions chimiques et electrochimiques couplées en regime stationnaire. Systemes redox consecutifs" *Electrochim. Acta*, **1967**, 12, 1345.

JEFTIC, L., Manning, G.: "a survey on electrochemical reduction of quinones" *J. Electroanal. Chem.* **1970**, 26, 195.

KELSON, B., MCNAMARA, J. P., PANDEY, A., RYAN, K. J., DORIE, M. J., MCAFEE, P. A., MENKE, D. R., BROWN, J.M., TRACY, M.: "1,2,4-Benzotriazine 1,4-dioxides. An important class of hypoxic cytotoxins with antitumor activity" *Anti-Canc. Drug Des.* **1998**, 13, 575.

KOVACIC, P., BECVAR, L. E.: "Mode of action of anti-infective agents: focus on oxidative stress and electron transfer". *Curr. Pharm. Des.* **2000**, 6, 143^A.

KOVACIC, P., OSUNA JR. J. A. "Mechanisms of Anti-Cancer Agents: Emphasis on Oxidative Stress and Electron Transfer" *Curr. Pharm. Des.* **2000**, 6, 277.^B

KOYAMA, J., I. MORITA, K. TAGAHARA, T. OSAKAI, H. HOTTA, M. X. YANG, T. MUKAIANAKA, H. NISHINO AND H. TOKUDA, "Correlation with Redox Potentials and Inhibitory Effects on Epstein-Barr Virus Activation of Azaanthraquinones.". *Chem. Pharm. Bull.*, **2001**, 49, 1214–1216.

KOYAMA, J., MORITA, I., KOBAYASHI, N., OSAKAI, T., "Correlation of redox potentials and inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation of 2-azaanthraquinones.". *Cancer Lett.*, **2004**, 212, 1–6;

KOYAMA, J., MORITA, I., KOBAYASHI, N., OSAKAI, T., HOTTA, H., TAKAYASU, J., NISHINO, H., TOKUDA, H., "Correlation between reduction potentials and inhibitory effects on Epstein–Barr virus activation of poly-substituted anthraquinones.", *Cancer Lett.*, **2003**, 201,25–30.

KUMMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ROBBINS.; COTRAN. "Pathology Basis of Disease", 7th ed. China: *WB Saunders*, **2004**, 1552.

LIVERTOUX, M-H, LAGRANGE, P., MINN, A.: "The superoxide production mediated by the redox cycling of xenobiotics in rat brain microsomes is dependent on their reduction potential" *Brain Res.* **1996**, 725, 207.

LOURO, I. D., LERENA, J. C., MELO, M. S. V., ASHTON-PROLLA, P., CONFORTI-FROES, N., "Genética Molecular do Câncer". Ed. MSG Produção Editorial, **2002**, Cap. 6, 63-79.

LOWN, J. W.: "Newer approaches to the study of the mechanisms of action of antitumor antibiotics" *Acc. Chem. Res.* **1982**, *15*, 381.

LUND, H., *Organic Electrochemistry*, 4th. ed., H. Lund and O. Hammerich, Editors, p. 389, Marcel Dekker, New York (**2001**).

MARIN, D., PEREZ, P., TEIJEIRO, C., PALECEK, E.: "Interactions of surface-confined DNA with acid-activated mitomycin C" *Biophys. Chem.* **1998**, *75*, 87.

MAYA J. D., BOLLO S., NÚÑEZ-VERGARA L. J., SQUELLA J. A., *Trypanosoma cruzi: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurán derivatives. Biochemical Pharmacology*, *65*, 999-1006, **2003**.

MCGAHON, A.J., MARTIN, S.M., BISSONNETTE, R.P., MAHBOUBI, A., SHI, Y., MOGIL, R.J., NISHIOKA, W.K. & GREEN, D.R. "The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis *in vitro*". *Meth. Cell Biol.*, **1995**, *46*: 153-185.

MONKS, T. J., HANZLIK, P., COHEN, G. M., ROSS, D., GRAHAM, D. G.: "Contemporary issues in toxicology: quinone chemistry and toxicity" *Toxicol. Appl. Pharmac.* **1992**, *112*, 2.

MONKS, T.J., JONES, D.C.: "The metabolism and toxicity of quinones, quinonimines, quinone methides, and quinone-thioethers". *Curr. Drug Metabolism*, **2002**, *3*, 425-438.

MOSMANN, T. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". *Journal of immunological methods*, **1983**, 16, 55-63.

ORRENIUS S. "Mitochondrial regulation of apoptotic cell death". *Toxicology Letters*, v. 149, 2004, p.19.

OTT, M., GOGVADZE, V., ORRENIUS, S., ZHIVOTOVSKY, B., "Mitochondria, oxidative stress and cell death", *Apoptosis*, **2007**, 12:913–922.

PEOVER, M. E., A polarographic investigation into the redox behaviour of quinones: the roles of electron affinity and solvent", *J. Chem. Soc.* **1962**, 4540.

PERERA, F.P. "Environment and Cancer: Who are susceptible?" *Science*. **1997**, v.278.

PERES, C. M., CURI, R., "Como Cultivar Células", *Guanabara Koogan*, Rio de Janeiro, 2005.

PETROVA, S. A., KOLODYAZHNY, M. V., KSENZHEK, O. S.: "Electrochemical properties of some naturally occurring quinones" *J. Electroanal. Chem.* **1990**, 277, 189.

PIEPADE, J. A., FERNÁNDEZ, I. R., BRETT, A. M. O.: "Electrochemical sensing of DNA–adriamycin interactions" *Bioelectrochem.* **2002**, 56, 81.

PINDUR, U.; JANSEN, M.; LEMSTER, T. ADVANCES IN DNA-LIGANDS WITH GROOVE BINDING, "Advances in DNA-Ligands: Intercalating and/or Alkylating Activity: Chemistry, DNA-Binding and Biology". *Curr. Med. Chem.* **2005**, 12, 2805-2847.

PITTA, I. R., GALDINO, S. L., LIMA, M. C. A., "Acridine derivatives with antitumoral activity". WO/2007/109871. 2007.

RAJSKI, S. R., WILLIAMS, R. M.: "DNA cross-linking agents as antitumor drugs" *Chem. Rev.* **1998**, 98, 2723.

RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M., MOORE, P. K., "Farmacologia", 5ª Edição, São Paulo, Elsevier, **2004**.

RAUF, S., GOODING, J.J., AKHTAR, K., GHOURI, M.A., RAHMAN, M., ANWAR, M.A., KHALID. A. M.: Electrochemical approach of anticancer drugs-DNA interaction. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, 37, 205.

SCHAFFER, F.Q., BUETTNER, G. R.: "Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple" *Free Rad. Biol. Med.* **2001**, 30, 1191.

S-DON, A., HOGG, P. J., "Mitochondria as cancer drug targets", *TRENDS in Molecular Medicine*, **2004**, 10, 8.

SHAPIRO, H. M. "Practical flow cytometry". Terceira ed., New York: *Wiley-Liss*, **1995**.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M.C.B.V. "Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na B-lapachona e derivados". *Quim. Nova*, 26 (3): **2003**, 407-416.

SILVA, R.L.A. "Oncogenes e Genes Supressores de Tumor". *Oncologia Molecular*, **2004**, p.29.

SINHABABU, A. K., THAKKER, D. R.: "Prodrugs of anticancer agents" *Adv. Drug Delivery Rev.* **1996**, 19, 241.

SOUTHAMPTON ELECTROCHEMISTRY GROUP. *Instrumental Methods in Electrochemistry*. Edited by Southampton Electrochemistry Group. 2001.

SOUZA D., MACHADO S. A. S., AVACA L., *Square wave voltammetry. Part I: theoretical aspects*. *Quim. Nova*, Vol. 26, No. 1, 81-89, **2003**.

SQUELLA, J. A., BOLLO, S., NÚÑEZ-VERGARA, L. J., "Recent developments in the electrochemistry of some compounds of biological significance". *Curr. Org. Chem.*, **2005**, 9, 565.

STRYER, L., In *Biochemistry*, 4 ed., W. H. Freeman: New York, **1995**, cap. 21, 529.

TOCHER, J. H., EDWARDS, D. I., *Biochem. Pharmacol.*, **1995**, 50, 1367.

TYTECA, S., LEGUBE, G., TROUCHE, D., "To die or not to die: a hat trick" *Molecular Cell*, **2006**, 24 (6), 807-808.

VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M.T.D., MAZUR, M., TELSER, J.: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease". *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, 39, 44.

VERAS, M.L., BEZERRA, M.Z., BRAZ-FILHO, R., PESSOA, O.D., MONTENEGRO, R.C., PESSOA, C., MORAES, M.O., COSTA-LUTUFO, L.V., "Cytotoxic epimeric withaphysalins from leaves of *Acnistus arborescens*". *Planta Medica*, v.70, **2004**, p.551-555.

VIDAL, A., KOFF, A., "Cell-Cicle Inibitors: Three families united by a common cause". *Gene*, **2000**, 247: 1-15.

VOUSDEN, K. H., LANE, D. P., "P53 in Health and Disease". *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, **2003**, 8: 275-283.

WANG, J., OZSOZ M., CAI X. H., RIVAS G., SHIRAISHI H., GRANT D. H., CHICHARRO M., FERNANDES J., PALECEK, E.: "Interactions of antitumor drug daunomycin with DNA in solution and at the surface" *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1998**, 45, 33.

WANG, Z., XIAO, S., CHEN, Y., "β-Cyclodextrin incorporated carbon nanotubes-modified electrodes for simultaneous determination of adenine and guanine." *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 589, **2006**, 237–242.

WARDMAN, P.: "Electron transfer and oxidative stress as key factors in the design of drugs selectively active in hypoxia" *Curr. Med. Chem.* **2001**, 8, 739.

WARDMAN, P.: "Reduction potentials of one-electron couples involving free-radicals in aqueous-solution" *J. Phys. Chem. Ref. Data.* **1989**, 18, 1637.

WARDMAN, P.: In "Selective Activation of Drugs by Redox Processes" Adams, G. E., Breccia, A., Fielden, E. M., Wardman, P., eds. Plenum Press: New York, **1990**, 11.

WARING, M. J., "DNA modification and cancer". *Annu. Rev. Biochem.* **1981**, 50, 159-192.

WEIL, B., W., *Electron Paramagnetic Resonance* (1994).

WUERZBERGER, S. M.; PINK, J. J.; PLANCHON, S. M.; BYERS, K. L.; BORNMANN, W. G.; BOOTHMAN, D. A. *Cancer Res.* **1998**, 58, 1876-1885.

ZUMAM, P.; *Substituent Effects in Organic Polarography*, Plenum Press: New York, pp 46-48, 273, **1967**.

