



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

ANNA CAROLINE LIMA CANDIDO

**ESTUDO ELETROQUÍMICO DA INTERAÇÃO DE QUINONA DE INTERESSE
BIOLÓGICO E DENDRÍMEROS PAMAM DE 2ª E 3ª GERAÇÃO**

MACEIÓ - AL

2017

ANNA CAROLINE LIMA CANDIDO

**ESTUDO ELETROQUÍMICO DA INTERAÇÃO DE QUINONA DE INTERESSE
BIOLÓGICO E DENDRÍMEROS PAMAM DE 2ª E 3ª GERAÇÃO**

Dissertação de Mestrado apresentado
como requisito para obtenção do título
de Mestre em Ciências pela
Universidade Federal de Alagoas.

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

MACEIÓ - AL

2017

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

C217e Candido, Anna Caroline Lima
Estudo eletroquímico de interação de Quinona de interesse biológico e
Dendrímeros PAMAM de 2ª e 3ª geração / Anna Caroline Lima Candido. – 2017.
64 f. : il.

Orientadora: Fabiane Caxico de Abreu Galdino.
Dissertação (mestrado em Ciências) – Universidade Federal
de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2017.

Bibliografia: f. 59-64.

1. Quinona. 2. Eletroquímica. 3. Dendrímeros. 4. PAMAM. I. Título.

CDU: 544.6



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



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone/Fax: (82) 3214-1144
email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da comissão julgadora da defesa de dissertação de mestrado de **Anna Caroline Lima Candido**, intitulada: “**Estudo eletroquímico da interação entre Quinona e Dendrímero PAMAM de 2ª e 3ª geração**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 20 de fevereiro de 2017, às 16h30, na Sala de Reuniões do IQB.

COMISSÃO JULGADORA

Fabiane Caxico de Abreu Galdino
Profa. Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino
Orientadora (PPGQB/IQB/UFAL)

Camila Calado de Vasconcelos
Profa. Dra. Camila Calado de Vasconcelos
(CESMAC)

Diógenes Meneses dos Santos
Prof. Dr. Diógenes Meneses dos Santos
(PPGQB/IQB/UFAL)

Aos meu pais,
que em tudo me apoiam,
são meu suporte e minha vida.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente à Deus e a minha família, meus pais Artur e Rosinha, que sempre sacrificaram o pouco que tínhamos para que pudéssemos estudar e ir em busca dos nossos sonhos, que me apoiaram em todas as minhas decisões e por darem todo o suporte para meus estudos... E, é claro, a todo amor que sempre recebi durante toda a minha vida.

Agradeço as minhas irmãs Isse e Clara, por todo apoio e todo carinho que sempre recebi.

As minhas tias, primos e primas, que sempre que eu precisei me auxiliaram e me trouxeram palavras de incentivo e de muito amor. Tenho com certeza a melhor família.

Aos meus amigos da UFAL, em especial minhas Farmacêuticas Marílya, Bia, Val e Amanda, por serem aquelas com quem vivi momentos muito especiais em minha vida.

Aos meus amigos de Laboratório e que são verdadeiros companheiros para todas as aventuras Samaysa, Marílya, Renata e Ygor.

A minha querida orientadora, pela paciência e apoio em vários momentos que se iniciaram na graduação e continuam até hoje no fim deste mestrado.

Aos membros da banca avaliadora pela disponibilidade e o aceite do convite em avaliar este trabalho, que marca uma etapa tão importante da minha carreira acadêmica e profissional.

A Universidade Federal de Alagoas, que é como minha segunda casa e onde encontrei amigos para a vida toda.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da UFAL e ao CNPq pela bolsa de pesquisa.

RESUMO

β -lapachona (β LP) é uma quinona de origem vegetal bastante estudada e promissora no tratamento do câncer, porém sua baixa solubilidade em água limita explorar ainda mais suas propriedades farmacológicas. Por isto, neste trabalho é apresentada uma alternativa para aumentar a solubilidade da naftoquinona β -lapachona com o dendrímero poliamidoamina (PAMAM) de geração 2 e 3 (G2 e G3), que é uma classe de polímeros altamente ramificados e de tamanho nanométrico. A técnica eletroquímica de voltametria cíclica foi escolhida para analisar a interação entre estes compostos em meio prótico (tampão fosfato pH = 7,0), utilizando eletrodos de carbono vítreo e ouro, modificados ou não, como eletrodo de trabalho, um fio de platina como contra eletrodo e Ag|AgCl|Cl⁻ (saturado) como eletrodo de referência. As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT (AUT73222). Todos os experimentos foram conduzidos em temperatura ambiente (25 \pm 2 °C) e sob atmosfera inerte. Também foram preparados complexos da β -lapachona com PAMAM que foram caracterizados por técnicas espectroscópicas de ultravioleta visível (UV-vis) e Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Nos estudos eletroquímicos observou-se maior intensidade de corrente para a β -lapachona quando utilizou-se eletrodo modificado com nanotubo de carbono (CNT) e PAMAM G2 ou G3, do que quando utilizado o eletrodo de carbono vítreo modificado com CNT, indicando uma maior interação desta quinona com dendrímero. Ao variar a concentração da β LP com eletrodo CNT/PAMAM G2 ou G3, calculou-se a constante de interação entre eles com valores de $6,63 \times 10^2$ e $2,59 \times 10^2$ M⁻¹, respectivamente. A fim de dispor da maior parte dos sítios ativos do dendrímero e propor como ocorre esta interação, o PAMAM G2 foi imobilizado em eletrodo de ouro com MUA e a concentração da quinona foi variada e a constante de equilíbrio do complexo calculada dando $2,9 \times 10^4$ M⁻¹. Estudos com o PAMAM livre em solução foram realizados, adicionando concentrações crescentes do PAMAM em meio aquoso com a quinona não solubilizada, em que se observou um aumento gradativo na corrente de pico de redução e oxidação, até a saturação do sistema, indicando transferência de fase. Os estudos espectroscópicos de UV-vis demonstraram a formação do complexo a partir de mudanças na banda de absorção da β LP em 256 nm e os estudos de FTIR indicaram que a interação entre estes compostos provavelmente ocorre através dos grupos carbonila da quinona com os grupos amida do interior do dendrímero.

Palavras-chaves: Quinonas. Dendrimeros. Eletroquímica. β -lapachona.

ABSTRACT

β -lapachone (β LP) is a highly studied and promising plant-derived quinone in the treatment of cancer, but one of its characteristics limits its pharmacological properties, which is its low solubility in water. In the present study an alternative to increase the solubility of β -lapachone naphthoquinone with polyamidoamine dendrimer (PAMAM) of generation 2 and 3 (G2 and G3), Which is a highly branched and nanometer-sized polymer. Electrochemical techniques such as cyclic voltammetry were used, in protic media (phosphate pH 7.0) using glassy carbon as working electrode, while the counter electrode was a Pt wire and the reference electrode an Ag|AgCl|Cl⁻ (saturated), using a Autolab PGSTAT12 potentiostat. All experiments were conducted at room temperature (25 ± 2 °C) and purging an inert gas (Argon). Also complexes of BLP with PAMAM were prepared and characterized by spectroscopy techniques, as UV visible (UV-vis) and Infrared by Fourier Transform (FTIR). In the electrochemical studies, it was observed a better amount of current to BLP when it was analyzed electrode modified with carbon nanotube (CNT) and PAMAM G2 or G3 than when it was only with the CNT, indicating a higher interaction of this quinone with dendrimer. Varying the concentration of the BLP with CNT/PAMAM G2 or G3 electrode can calculate the constant of interaction between them ($6,63 \times 10^2$ e $2,59 \times 10^2$). To have the most of active sites available of the dendrimer and propose how is this interaction, the PAMAM G2 was immobilized on the gold electrode with MUA and the concentration of the quinone was varied and the equilibrium constant of the calculated complex ($2,9 \times 10^4$). Studies with the free PAMAM in solution were performed, in which increasing concentrations of PAMAM was added in a medium with the non-solubilized quinone, where was observed a gradual increase in the peak current of reduction and oxidation, until system saturation, indicating phase transfer. Spectroscopic studies of UV-vis have shown the formation of the complex from changes in the absorption band of the BLP and FTIR indicated that the interaction between these compounds probably occurs through the carbonyl groups of the quinone with the amide groups inside the dendrimer.

Keywords: Quinones. Dendrimers. Electrochemistry. β -lapachone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tipos de quinonas de acordo com sua estrutura molecular.	16
Figura 2: Alguns derivados quinônicos obtidos a partir da oxidação de Hooker do lapachol.	17
Figura 3: Mecanismo de ação das quinonas.	18
Figura 4: Estrutura da β -lapachona	19
Figura 5: Esquema do mecanismo de ação da β LP (Q) em células cancerosas.	20
Figura 6: Representação genérica de um dendrímero de quarta geração.	22
Figura 7: Tipos de formulações utilizando dendrímeros (terceira geração esquematizado).	24
Figura 8: Diferentes tipos de dendrímeros.	25
Figura 9: Cella eletroquímica de três eletrodos:	28
Figura 10: Voltamograma cíclico para um sistema reversível	30
Figura 11: Voltamograma cíclico da β LP variando-se a concentração de PAMAM G2 de $1,05 \times 10^{-5}$ a $1,05 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ , com, em Tampão fosfato pH 7,0.	37
Figura 12: Foto da cela eletroquímica antes do experimento com a β LP não solubilizada e após a adição do PAMAM G2.	37
Figura 13: Voltamogramas cíclicos para a β LP 10 mmol L ⁻¹ com a) eletrodo modificado com CNT e CNT /PAMAM G2 e b) eletrodo modificado com CNT e CNT/PAMAM G3. Tampão fosfato pH 7,0, 10% de etanol, $v = 0,05$ V s ⁻¹ .	40
Figura 14: VC da β LP com concentrações de 10-100 μ mol L ⁻¹ , com eletrodo modificado com a) NTC/PAMAM G2 e b) NTC/PAMAM G3. Tampão fosfato pH 7,0 e 10% de etanol, $v = 0,05$ V s ⁻¹ .	42
Figura 15: Curva analítica gerada através dos valores de concentração e corrente da β LP com a) CNT /PAMAM G2 e b) CNT /PAMAM G3. Tampão fosfato pH 7,0 e 10% de etanol, $v = 0,05$ V s ⁻¹ .	43
Figura 16: Estudo com a variação da velocidade de varredura de 10 a 300 mV, da β LP com eletrodo modificado com CNT e a) PAMAM G2 e b) PAMAM G3, tampão fosfato pH 7,0 e 10% de etanol.	45
Figura 17: Plot entre Corrente versus velocidade de varredura, entre a β -LP eletrodo modificado com CNT e a) PAMAM G2 e b) PAMAM G3.	45

- Figura 18:** Plot entre corrente *versus* velocidade de varredura ao quadrado, 46
entre β LP e eletrodo modificado com CNT e a) PAMAM G2 e b) PAMAM G3.
- Figura 19:** Representação do eletrodo de ouro modificado com MUA e 46
dendrímero PAMAM.
- Figura 20:** Voltamogramas cíclicos para a β LP 12 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com eletrodo 47
de ouro e este modificado com MUA. Sulfato de sódio 0,2 mol L^{-1} , 5% de
etanol, $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$.
- Figura 21:** Voltamogramas cíclicos para a β LP 5-20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com a) eletrodo 48
de ouro modificado com MUA e PAMAM G2 e b) eletrodo modificado com
MUA. Sulfato de sódio 0,2 mol L^{-1} , 5% de etanol, $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$.
- Figura 22:** Curva analítica gerada através dos valores de concentração e 51
corrente da β LP com eletrodo de ouro modificado com MUA e PAMAM G2.
Sulfato de sódio 0,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 5% de etanol, $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$.
- Figura 23:** Espectros UV-vis dos complexos β LP-PAMAM em metanol na 52
região de 200 a 600 nm, com concentrações de 10 a 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$.
- Figura 24:** Espectros UV-vis da β LP em metanol na região de 200 a 600 nm, 52
com concentrações de 10 a 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$.
- Figura 25:** Curva analítica com valores de absorbância da β LP em metanol 53
no comprimento de onda de 256 nm
- Figura 26:** Espectros ATR FT-IR na região de a) 4000-500 cm^{-1} e b) 1800- 55
1000 cm^{-1} da β LP (•) e dos complexos 1:1 (•), 1:2 (•), 1:4 (•), 1:8 (•) e 1:12 (•)
de PAMAM- β LP.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados dos dendrímeros de PAMAM da G0-G7.	25
Tabela 2: Valores dos parâmetros eletroquímicos da β LP frente a eletrodo modificado com CNT e PAMAM G2 ou G3.	39
Tabela 3: Parâmetros eletroquímicos fornecidos pela interação da β LP com os eletrodos de ouro modificados com MUA/PAMAM e MUA.	47
Tabela 4: Número de moléculas incorporadas pelo PAMAM.	52
Tabela 5: Atribuições das bandas (em cm^{-1}) para a β LP e os complexos com PAMAM G2.	56

LISTA DE ABREVIATURAS SÍMBOLOS E SIGLAS

A	Ampère
ATR	Reflectância total atenuada
Au	Ouro
βLP	β-lapachona
CNT	Carbon nanotube ou nanotubos de carbono
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DX	doxorrobucina
E	Potencial
<i>E</i>_{1/2}	Potencial de meia-onda
EDC	1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etil carbodiimida hidrocloreto
<i>E</i>_{pa}	Potencial de pico anódico
<i>E</i>_{pc}	Potencial de pico catódico
E_p	Potencial de pico
Eq.	Equação
EPR	<i>Enhanced Penetration and Retention</i>
FTIR	Infravermelho por Transformada de Fourier
HPβ-CD	hidroxipropil-β-ciclodextrina
HQ	Hidroquinona
HOPG	<i>Highly oriented pirolised Graphite</i>
I	Corrente
<i>I</i>_{pa}	Corrente de pico anódica
<i>I</i>_{pc}	Corrente de pico catódica

MUA	Ácido 11-mercaptoundecanóico
mV/s	Millivolts por segundo
<i>n</i>	Número de sítios ativos
NQO1	NAD(P)H: oxidoredutase quinona 1
O₂^{•-}	Ânion radical superóxido
[•]OH	Radicais hidroxilas
PAMAM	Poliamidoamina
PARP1	(poli (ribose ADP) polimerase 1)
pH	Potencial hidrogeniônico
Q^{•-}	Semiquinona
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SOD	Enzima superóxido desmutase
UV-vis	Ultravioleta visível
VC	Voltametria Cíclica
<i>v</i>	Velocidade de varredura de potencial
μA	Microampère

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Quinonas	15
1.1.2	β -lapachona	18
1.2	Dendrímeros	21
1.1.1	Dendrímero PAMAM	25
1.2	Técnicas eletroquímicas	27
1.2.1	Voltametria cíclica	28
2	OBJETIVOS	31
2.1	Geral	31
2.2	Específicos	31
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	Reagentes e Solventes	32
3.2	Estudos Eletroquímicos	32
3.2.1	Avaliação da interação da β -lapachona com PAMAM G2 e G3 em solução	33
3.2.2	Avaliação da interação da β -lapachona com CNT e PAMAM G2 ou G3 em eletrodo de carbono vítreo.	33
3.2.3	Avaliação da interação da β -lapachona com PAMAM G2 em eletrodo de ouro.	34
3.3	Estudos espectroscópicos	35
3.3.1	Preparação do complexo β -lapachona com os dendrímeros PAMAM G2.....	35
3.3.2	Preparação para a curva analítica.....	36
3.3.3	Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1	Interação entre PAMAM G2 e G3 com a βLP pela técnica de Voltametria cíclica (VC)	37
4.1.1	Avaliação da interação da β -lapachona com PAMAM G2 e G3 em solução	37
4.1.2	Avaliação da interação da β -lapachona com CNT e PAMAM G2 ou G3 em eletrodo de carbono vítreo	39
4.1.3	Avaliação da interação da β -lapachona com CNT e PAMAM G2 em eletrodo de ouro.....	46

4.2 Estudos espectroscópicos da formação do complexo entre PAMAM G2 e βLP	51
4.2.1 UV-vis da β LP e dos complexos PAMAM - β LP	51
4.2.2 Espectros de infravermelho da β LP e dos complexos PAMAM - β LP obtidos por ATR FTIR.....	54
5 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

O interesse em compostos isolados de fontes naturais tem crescido nas últimas décadas, principalmente de plantas, devido à presença de inúmeros compostos bioativos, como as quinonas, possuidoras de potentes e variados tipos de atividades biológicas. Plantas que possuem em sua constituição quinonas são bastante utilizadas na medicina popular (FERREIRA et al, 2011).

Entre as quinonas, a β -lapachona (β LP), embora bastante estudada, ainda vem se destacando nos últimos anos, devido suas várias atividades farmacológicas comprovadas, tais como: antibacteriana, antifúngica, antitripanossômica, antiviral, antiinflamatória e anticancerígena (DONG, 2009).

Apesar do seu elevado potencial terapêutico a β LP nunca chegou a ser comercializada devido à dificuldade de obtenção de uma forma farmacêutica estável, pois apresenta baixa solubilidade em meio aquoso, inviabilizando sua biodisponibilidade, fato que tem gerado inúmeras pesquisas na tentativa de criar microambientes que favoreçam sua solubilização (FREITAS-NETO, 2012). Existem diversas formas de aumentar a solubilidade de um fármaco, entre elas pode-se citar: modificações químicas, complexação, aumento da área superficial de dissolução e dispersões sólidas (LEUNER; DRESSMAN, 2000).

Nos últimos anos, a nanomedicina baseada em polímeros tem recebido atenção crescente devido à suas habilidades de melhorar a eficácia terapêutica no tratamento do câncer (PARK et al, 2008). Com isso, vários sistemas foram desenvolvidos com a esperança de conseguir uma liberação intratumoral controlada de fármacos anticancerígenos. Esta estratégia é muito vantajosa, uma vez que os tumores são expostos a níveis terapêuticos do fármaco durante um período de tempo prolongado, reduzindo ao mesmo tempo a toxicidade para as células saudáveis e os demais efeitos secundários sistêmicos (WANG, 2006).

Uma alternativa promissora para solubilizar a β LP em meio aquoso é a utilização de dendrímeros, que são polímeros altamente ramificados e que suas propriedades físico-químicas, como o alto controle em sua arquitetura, tamanho, forma, densidade e grupos superficiais com muitas funcionalidades, os fazem carreadores ideais em aplicações biomédicas como transporte de fármacos em locais específicos do sistema biológico (SVENSON; TOMALIA, 2005). Entre os dendrímeros disponíveis destaca-se

o dendrímero poliamidoamina (PAMAM), já testado com diversos fármacos antitumorais e o primeiro a apresentar sua série completa, ou seja, da geração 0 até 10, sendo os de geração mais baixa (G0-G3) aqueles que apresentam quase ou nenhuma citotoxicidade (PAN et al, 2013; POURIANAZAR; MUTLU; GUNDUZ, 2014).

Moléculas de fármacos podem ser incorporada nos dendrímeros PAMAM, quer através de encapsulação ou complexação. Uma vez que os agentes terapêuticos podem ser encapsulados dentro da estrutura dendrítica ou ligados aos grupos funcionais terminais de dendrímeros PAMAM através de ligações eletrostáticas ou covalentes (pró-fármaco) para serem entregues (POURIANAZAR; MUTLU; GUNDUZ, 2014).

Devido as suas excelentes propriedades estruturais, há um grande uso de dendrímeros PAMAM para modificar a superfície de eletrodos no desenvolvimento de biossensores, podendo estar associados a outros nanomateriais ou não e com isso auxiliar no reconhecimento de diversas substâncias bioativas (BAHADIR; SEZGINTÜRK, 2016).

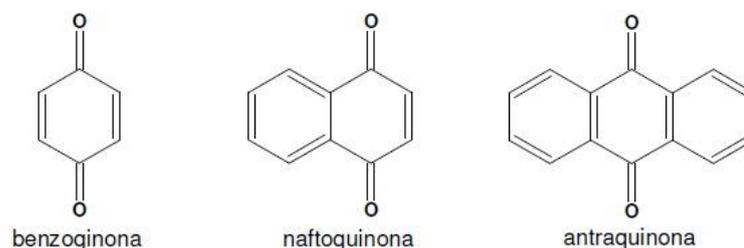
Neste contexto, a eletroquímica permite obter dados relativos aos produtos de redução, à estabilidade dos intermediários de redução e/ou interações com alvos biológicos importantes. Essas informações são relevantes para o entendimento dos mecanismos de ação em nível molecular (SOUZA, 2011).

A literatura não relata, até o momento, metodologias para avaliar a formação de complexos de inclusão entre substâncias bioativas e dendrímeros através da eletroquímica, por isso este trabalho visa propor uma alternativa para investigar este tipo de interação, entre a β LP e o dendrímero PAMAM de geração 2 e 3, associado a técnicas espectroscópicas comumente já utilizadas (UV-vis e FTIR), a fim de corroborar com os resultados obtidos.

1.1 Quinonas

As quinonas são divididas em diferentes grupos de acordo com sua estrutura molecular utilizando-se como critério o tipo de sistema aromático que sustenta o anel quinonoídico: benzoquinonas (anel benzênico); naftoquinonas (anel naftalênico); antraquinonas (antracênico linear ou angular), conforme Figura 1, a seguir.

Figura 1: Tipos de quinonas de acordo com sua estrutura molecular.

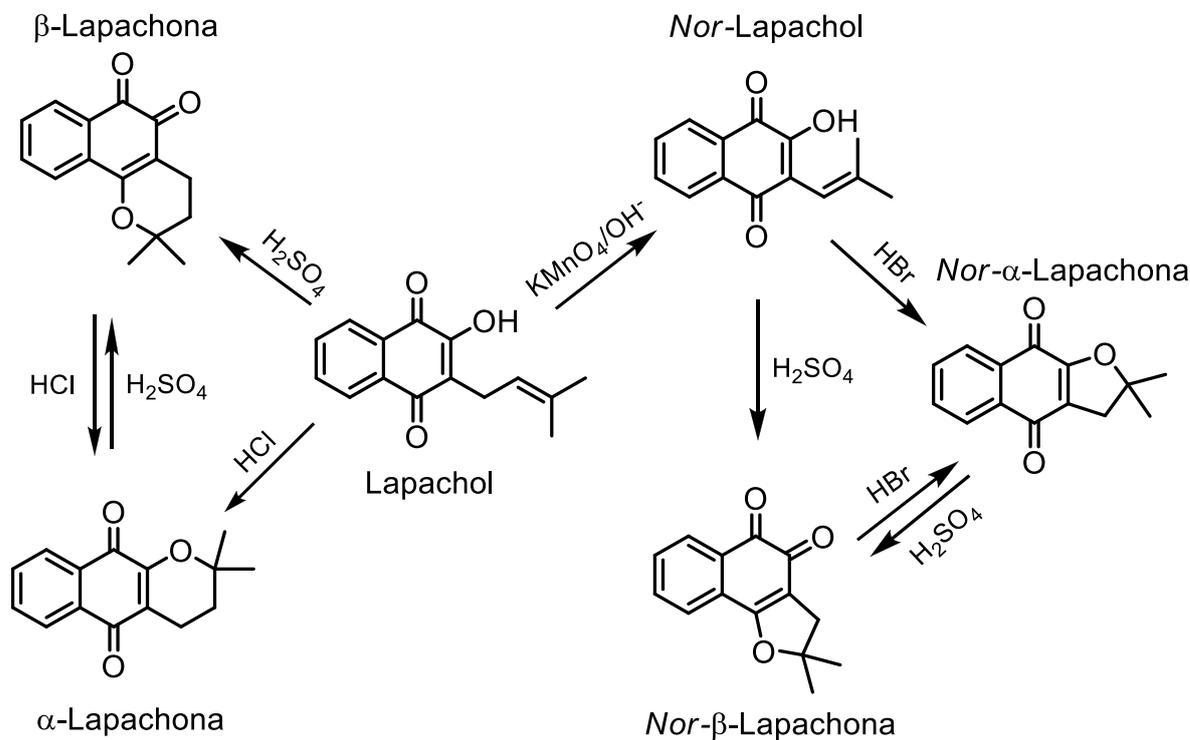


Fonte: SILVA, 2008.

As naftoquinonas são consideradas estruturas privilegiadas em química medicinal, com base em suas atividades biológicas e propriedades estruturais. Podem apresentar isomerias 1,2 ou *orto*-quinonoídica (quando as carbonilas são vizinhas) ou 1,4 ou *para*-quinonoídica (quando as carbonilas estão separadas por dois carbonos). Essas formas isoméricas diferem muito em suas propriedades físicas, químicas e quanto à sua atuação biológica. Um exemplo típico é a *orto*-naftoquinona β -lapachona que é muito mais ativa contra formas tripamastigotas de *Trypanosoma cruzi* do que seu isômero α -lapachona (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003; MOLFETA, 2007).

O lapachol e seus isômeros, α -lapachona e β -lapachona são naftoquinonas de grande importância farmacológica e são encontradas em espécies vegetais de várias famílias. Como uma das mais importantes desta classe, a β -lapachona, pode ser facilmente obtida por catálise ácida do lapachol, um composto extraído de plantas da família Bignoniaceae ou de Lomatia (Fig. 2).

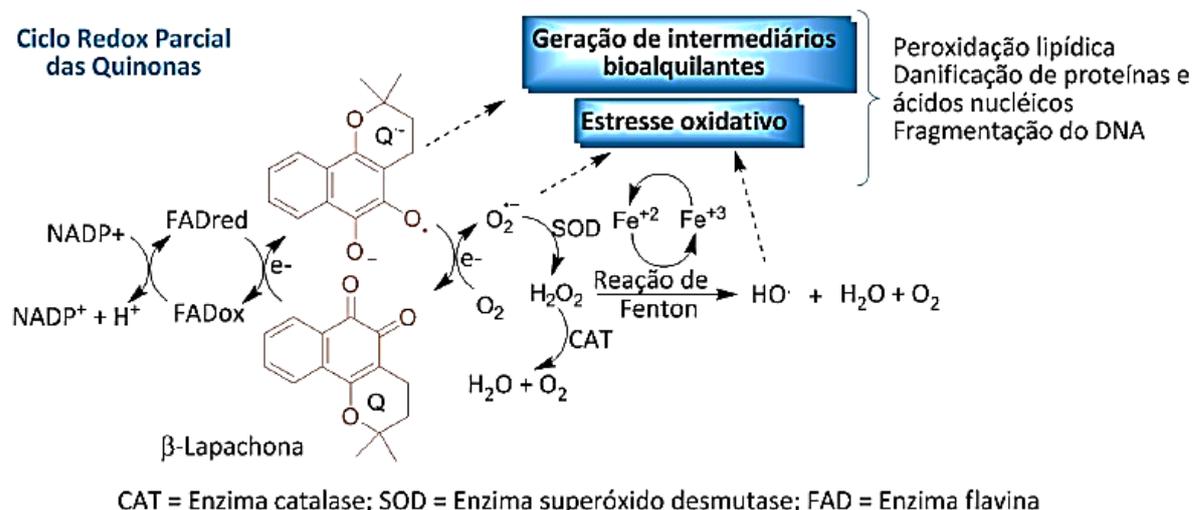
Figura 2: Alguns derivados quinônicos obtidos a partir da oxidação de Hooker do lapachol.



Fonte: Adaptado de SILVA, 2008.

A ação das quinonas pode estar envolvida com sua capacidade de gerar estresse oxidativo ao induzirem a formação deletéria endógena de espécies bioativas derivadas do oxigênio (O_2 , $\cdot\text{OH}$, O_2^- e H_2O_2), pois quando reduzidas ocorre a formação do radical semiquinona (Q^{\cdot}) ou hidroquinona (HQ - relativamente mais estável), que pode ser oxidado quando ocorre a transferência de elétrons a uma molécula ou radical aceptor. Quando formada, a espécie semiquinona reduz o oxigênio molecular ao ânion radical superóxido (O_2^-), em outra reação, na presença da enzima superóxido desmutase (SOD) transforma o ânion radical superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Ainda que o H_2O_2 não seja um radical livre, ele pode ser responsável pela oxidação de biomoléculas devido a sua reatividade. O ânion O_2^- por catálise com metais de transição, em reações do tipo Fenton, ou com H_2O_2 , reação de Harber-Weiis, gera radicais hidroxilas ($\cdot\text{OH}$) no interior da célula (CAVALCANTI, 2010; SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003; SILVA, 2008; MOLFETA, 2007).

Figura 3: Mecanismo de ação das quinonas.



Fonte: Ferreira et al, 2010

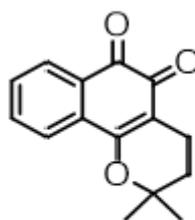
A produção dessas espécies, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxilas, é o principal mecanismo do estresse oxidativo, sendo elas responsáveis pela inativação da enzima e danos na membrana celular. O radical semiquinona é uma espécie extremamente reativa o que favorece a ocorrência de lesões em estruturas celulares (peroxidação lipídica, destruição de proteínas, danificação de ácidos nucleicos e quebra das fitas do DNA), que podem provocar a morte celular. Além do estresse oxidativo, as quinonas também são capazes, diretamente ou através de intermediários, de formar ligações covalentes com estruturas celulares (proteínas e ácidos nucleicos). A alteração da normalidade celular pode induzir a apoptose como alternativa, caso não se consiga eliminar por completo o estresse oxidativo, como ocorre no *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas. (CAVALCANTI, 2011; SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003; SILVA, 2008; MOLFETA, 2007).

1.1.2 β -lapachona

A β -lapachona (3,4-di-hidro-2,2-dimetil-2H-naftol [1,2-b] pirano-5,6-diona) (Fig. 3) é um ortonaftoquinona originalmente obtido das folhas e casca interna da árvore lapacho ou ipê-roxo (*Tabebuia avelanadae*) na América do Sul. Os compostos que

contêm o grupo quinona são encontrados em vários produtos naturais e muitas vezes estão associados a diferentes atividades farmacológicas, como fungicida (FREIRE et al, 2010), antimalárico (SHARMA et al, 2013), tripanossomicida (CARNEIRO et al, 2012), antituberculose (FERREIRA et al, 2010) e antibacteriana (FRANCISCO et al, 2010).

Figura 4: Estrutura da β -lapachona.



Fonte: Autora, 2017.

Mais especificamente, β -lapachona (β LP) demonstrou atividade citotóxica contra uma variedade de células cancerígenas *in vitro* e *in vivo*, até mesmo em doses micromolares, de modo que foi postulado como um novo agente antitumoral (LAMBERTI et al, 2013).

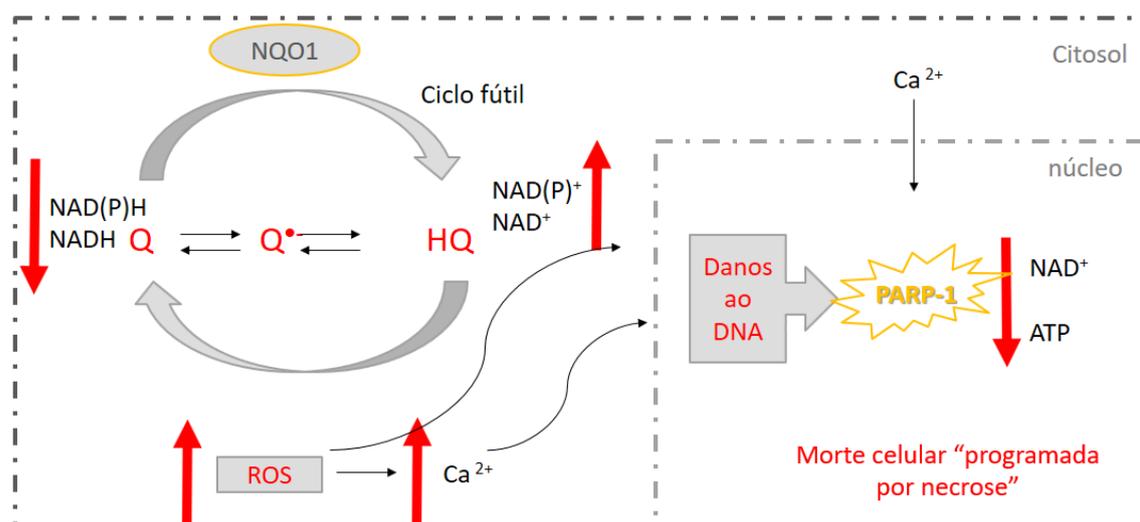
A β LP ativa a morte celular por apoptose em várias linhas celulares de câncer, incluindo câncer de próstata, de mama e leucemia. Esta naftoquinona também é considerado como sendo um bom sensibilizador da radioterapia no câncer do cólon e células da próstata. Sua atividade atitumoral é conhecida por estar diretamente correlacionada com uma hiperativação seletiva da PARP1 (poli (ribose ADP) polimerase 1) e depleção de NAD⁺ de forma específica, pois atua na atividade enzimática da NAD(P)H: oxidorredutase quinona 1 (NQO1) (CHAKRABARTI et al, 2015; MOORE et al, 2015; PARK et al, 2014).

A NQO1 é uma flavoproteína encontrada na maioria dos tecidos humanos e possui sua expressão aumentada (até 20 vezes mais) em uma variedade de cânceres humanos, incluindo de mama, cólon, pulmão, pâncreas e próstata (BLANCO, 2007). Normalmente, esta enzima reduz as quinonas (Q) para hidroquinonas (HQ) estáveis, que são então excretadas quando conjugadas com glicuronídeo ou sulfato. No entanto, sob condições aeróbias, NQO1 metaboliza β LP a uma hidroquinona instável

altamente reativa e esta é então espontaneamente oxidada de volta para semiquinonas ou quinona, envolvendo dois elétrons, de duas moléculas de O_2 diferentes, esta etapa é chamada de ciclo fútil.

Esta ciclagem entre as formas Q e HQ da β LP, utiliza NADH ou NAD(P)H como fontes de elétrons e com isso diminuem sua concentração intracelular, aumentando assim a de NAD^+ e $NAD(P)^+$. Através dos níveis elevados de NAD^+ criados por NQO1 via ciclo fútil da β LP são então geradas espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo o ânion radical superóxido e peróxido de hidrogênio, que causam danos ao DNA. Estes processos levam a uma hiperativação da PARP1, que promove esgotamento rápido e dramático dos níveis NAD^+ intracelular resultando na depleção severa do poder redutor intracelular, que induz a um aumento rápido do cálcio intracelular, a despolarização da membrana mitocondrial, perda de ATP, fragmentação do DNA e apoptose. Portanto, β LP pode matar seletivamente as células cancerosas que se destinam a NQO1, o esquema do mecanismo de ação desta quinona encontra-se na Figura 4. (CHAKRABARTI, et al, 2015; MOORE et al, 2015; PARK et al, 2014; SIEGEL; YAN; ROSS, 2012).

Figura 5: Esquema do mecanismo de ação da β LP (Q) em células cancerosas.



Fonte: Autora, 2017.

β LP provou ser uma promissora substância anticancerígena, cujo mecanismo de ação único permite agir com especificidade em alguns tumores. No entanto, sua baixa solubilidade em água limita a sua aplicação clínica e a literatura relata alguns

veículos que já são utilizados na prática clínica, como os lipossomas e os conjugados de polímero-fármaco: DOXIL[®] (injeção de cloridrato de doxorubicina encapsuladas em lipossomas) e Abraxane[®] (partículas paclitaxel se ligam às proteínas para suspensão injetável) são administrados como tratamentos de primeira linha em vários tipos de câncer. Os polímeros lineares tradicionais, como polietileno glicol (PEG), ácido poliglutâmico, polissacarídeo, poli (cloridrato de alilamina) e N- (2-hidroxipropil) metilacrilamida foram revistos como veículos de entrega de fármacos e aceitos para uso clínico, porém estes polímeros lineares têm estruturas químicas pouco definidas (MADAAN et al, 2014).

Alguns trabalhos já buscaram melhorar a limitação da solubilidade da β LP com o uso de ciclodextrinas e lipossomas, bem como a associação destes dois carreadores (CAVALCANTI et al, 2011). Polímeros *millirods* Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) (DONG et al, 2009) e polímeros micelares também têm sido utilizados (BLANCO, 2007). Apesar do sucesso do objetivo proposto pelos trabalhos, limitações são encontradas em todos eles. Os lipossomas, por exemplo, possuem uma capacidade de carga limitada devido à efeitos de desestabilização da membrana e a intrínsecas limitações estruturais, já que a maioria das partículas de lipossomas apresentam diâmetro maior que 90 nm, o que pode limitar consideravelmente o seu transporte em tecidos tumorais (BLANCO, 2007).

Os estudos que envolveram a formulação clínica de β LP com o veículo hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β -CD), foi responsável por causar hemólise. A rápida dissociação de β LP com HP β -CD levou a um curto tempo de sua circulação no sangue e distribuição rápida entre todos os órgãos (DONG et al, 2009).

Sabendo que a baixa de solubilidade da β LP em meio aquoso, sua inativação a nível de soro humano e a falta de uma estratégia eficaz para sua administração limita utilização deste composto clinicamente, é necessário combinar esta quinona com um sistema que permita sua liberação controlada, que demonstre eficácia antitumoral significativa e toxicidade sistêmica mínima.

1.2 Dendrímeros

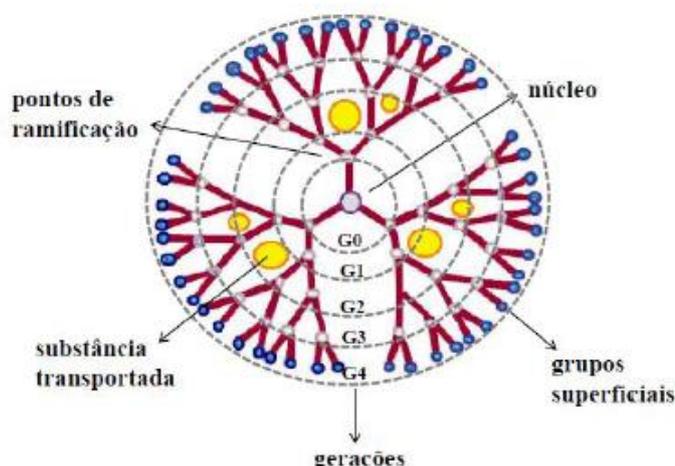
Dendrímeros são moléculas poliméricas, versáteis e tridimensionais com síntese química bem definida. Apresentam tamanho manométrico e baixo índice de

polidispersidade, além de possuírem propriedades físico-químicas, tamanho e forma comparáveis a biomacromoléculas, tais como proteínas e enzimas, e serem geralmente, não-imunogênicos (CAMINADE; TURRIN, 2014; GONZALO; FERNANDES, 2009).

Os dendrímeros têm recebido grande atenção nos últimos anos por causa de sua possível utilização em aplicações tão variadas como sensores de catálise em nanoescala química, micelas unimoleculares, imitação da função da enzima, encapsulamento de molécula, reconhecimento molecular, agentes de diagnóstico e como veículos para o transporte de genes e medicamentos. Uma grande parte das propriedades biológicas diz respeito à entrega de substâncias ativas ("drug delivery") no local de ação e por isso tem se mostrado como uma nova e das mais eficientes plataformas para sistema de liberação de fármacos (CAMINADE; TURRIN, 2014; GONZALO; FERNANDES, 2009; MADAAN et al 2014).

Eles são caracterizados por camadas entre cada ponto de ramificação, popularmente conhecido como "gerações". A arquitetura completa pode ser distinguida na porção interior do núcleo seguido de gerações radialmente ligados que possuem grupos funcionais químicos na superfície terminal exterior (Figura 5). Com o aumento da geração, o peso molecular e grupos superficiais terminais aumentam e oferecem grande potencial para interações múltiplas e, portanto, designado como altamente funcional (MADAAN et al 2014).

Figura 6: Representação genérica de um dendrímero de quarta geração.



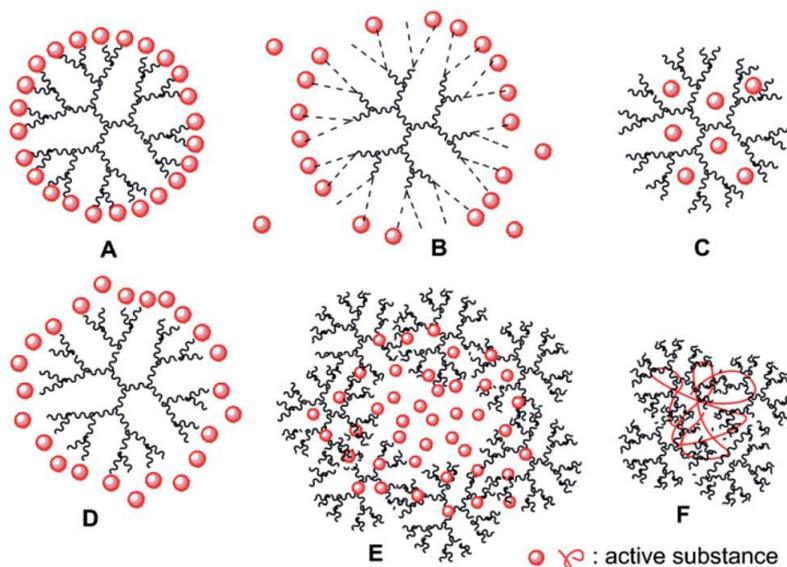
Fonte: CENTURION, 2015.

Existem três razões principais que justificam o recurso a dendrímeros como sistema de liberação de fármacos. O primeiro está relacionado ao fato de que apenas uma molécula de dendrímeros poder possuir várias moléculas do fármaco incorporadas em sua estrutura e por isso pode induzir um efeito de multivalência, que lembra as interações polivalentes que ocorre amplamente em sistemas biológicos. A segunda diz respeito a solubilidade de diversos fármacos em água e formulações com dendrímeros que poderia aumentar a solubilidade e, portanto, aumentar a biodisponibilidade destes compostos (CAMINADE; TURRIN 2014).

A terceira razão para a utilização de dendrímeros na área biológica é devido ao seu tamanho relativamente grande (geralmente vários nanômetros) que excede o limiar renal, e geralmente não é filtrado pelos rins. Além disso, o tamanho nanométrico pode induzir o chamado efeito de maior penetração e retenção (EPR), do inglês “Enhanced Penetration and Retention”. Tecidos normais possuem uma vasculatura bem formada com endotélio altamente revestido que impede o extravasamento dos materiais nanométricos, enquanto que os tecidos de tumor têm um endotélio ligeiramente comprimido que permite a permeação de materiais de grandes dimensões. Além disso, o sistema linfático, que geralmente remove materiais nanométricos não funciona em tecidos tumorais. Ambos os fenômenos são responsáveis pelo efeito EPR. No entanto, este efeito é frequentemente imprevisível e ineficaz para tumores não-sólidos, induzindo uma evolução clínica limitada (CAMINADE; TURRIN 2014).

Pode prever cinco tipos diferentes de interações entre fármacos e dendrímeros como mostrado na Fig. 6. Várias cópias do fármaco podem estar associadas ao grupo terminal de dendrímeros, ligadas, quer através de uma forte ligação covalente (6a), ou uma ligação clivável (6b). O fármaco também pode interagir de forma não covalente com a estrutura interna do dendrímero (6c), ou com a parte externa (6d). Consoante a estrutura e tamanho do dendrímero e do fármaco, esta interação pode ocorrer entre dendrímeros associados (6e e 6f) (CAMINADE; TURRIN 2014).

Figura 7: Tipos de formulações utilizando dendrímeros de terceira geração, esquematizado.



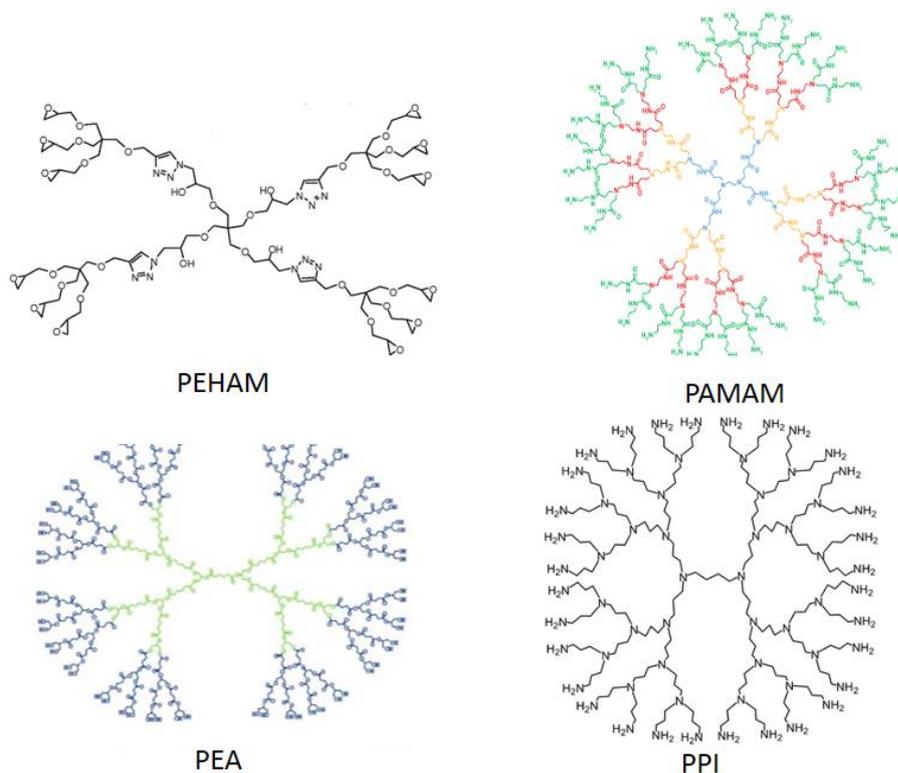
Fonte: CAMINADE; TURRIN, 2014.

A síntese de dendrímeros pode ser rastreada até 1980, quando D. Tomalia usou a "metodologia divergente" para sintetizá-los. Este método oferece uma vantagem de produzir dendrímeros modificados mudando os grupos terminais e por sua vez as suas propriedades físico-químicas podem ser alteradas de acordo com a aplicação desejada. Embora, esta abordagem sofra de limitações de defeitos estruturais, devido a uma reação incompleta de grupos que podem ser diminuídos pela adição excessiva de unidades monoméricas.

Uma outra abordagem para a síntese de dendrímeros é "metodologia convergente" iniciada por Hawker e Frechet em 1990. Essa metodologia sofre de uma limitação importante, pois dá um baixo rendimento na síntese de estruturas grandes e, portanto, é apropriado para a produção de dendrímeros de baixas gerações.

Vários dendrímeros como poliamidoamino (PAMAM), poli (propilenoimina) (PPI), poli-L-lisina, melamina, poli (eterhidroxilamina) (PEHAM), poli (esteramina) (PEA) e poliglicerol foram sintetizados e explorados como veículos para transporte de fármacos (Fig. 8) (MADAAN et al, 2014).

Figura 8: Diferentes tipos de dendrímeros.



Fonte: Adaptado de Caminade et al, 2011.

Ao contrário dos polímeros tradicionais, os dendrímeros têm recebido atenção considerável em aplicações biológicas, devido à sua alta solubilidade em água, biocompatibilidade, polivalência e o peso molecular bem definido. Estas características fazem deles um veículo ideal para a administração e direcionamento de fármacos (MADAAN et al, 2014).

Os dendrímeros também são ideais para a imobilização de superfícies eletródicas e no biorreconhecimento de moléculas, através de biossensores, melhorando sua capacidade de captura do alvo e análise específica, sensível e estável (BAHADIR; SEZGINTÜRK, 2016).

1.1.1 Dendrímtero PAMAM

O dendrímtero PAMAM tem crescido como promissor veículo como carreador de fármacos na medicina moderna devido às suas características únicas, como tamanho previsível e nanométrico, baixa polidispersidade e estrutura globular. Sua arquitetura ramificada e superfície multivalente e alta capacidade de entrega de fármacos, faz

deste dendrímero como um grande candidato para carreador de fármacos, genes, moléculas alvo e agentes de imagens (ABBASI et al, 2014).

A literatura mostra que a elevada solubilidade aquosa, arquitetura única, elevado número de grupos de superfície quimicamente versáteis dos dendrímeros PAMAM estão entre as vantagens que os tornam ideais transportadores para a entrega de agentes terapêuticos incluindo fármacos anticancerígenos (POURIANAZAR; MUTLU; GUNDUZ, 2014).

O tamanho do PAMAM varia de 1 a 13 nm de diâmetro da geração 0 (G0) até a geração 10. Sendo assim, o diâmetro cresce aproximadamente 1nm por geração. Da mesma forma que o diâmetro cresce com a geração, o número de grupos funcionais em sua superfície também, de forma exponencial (Tabela 1). O formato do dendrímero também é afetado a depender da geração, pois as gerações mais baixas (G0 – G4), possuem uma forma planar e elíptica, enquanto nas gerações maiores (G5-G10), suas ramificações são densamente empacotadas, conferindo a eles uma conformação esférica (POURIANAZAR; MUTLU; GUNDUZ, 2014).

Tabela 1: Dados dos dendrímeros de PAMAM da G0-G7.

Geração	Nº de grupos superficiais	Massa molar (g mol⁻¹)	Diâmetro (nm)
0	4	609	1,5
1	8	1522	2,2
2	16	3348	2,9
3	32	7001	3,6
4	64	14307	4,5
5	128	28918	5,4
6	256	58140	6,7
7	512	116585	8,1

Fonte: Adaptado de TOMALIA, 2004.

Para aplicações farmacêuticas é altamente eficiente e seguro, porém para PAMAM com grupos catiônicos em sua superfície a citotoxicidade e atividade hemolítica é dependente da sua concentração e geração, propriedades que estão associadas com suas aminas terminais. Por isso, as gerações maiores de dendrímero PAMAM, geralmente a partir de gerações intermediárias (G4 ou G5), possuem uma maior toxicidade. Na tentativa de mascarar esta desvantagem, a depender da aplicação do dendrímero, pode-se modificar a superfície do PAMAM, introduzindo grupos químicos eletricamente neutros ou negativos ou truncar a cadeia polimérica na metade de uma geração, fazendo com que a superfície apresente hidroxilas. Entre estes grupos que podem ser adicionados incluem-se polietilenoglicol (PEG), acetil, folatos, carboidratos e conjugação de peptídios (POURIANAZAR; MUTLU; GUNDUZ, 2014).

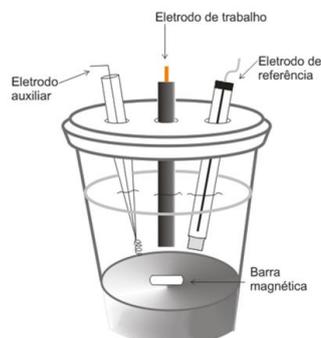
Devido as suas excelentes propriedades estruturais, há um grande uso de dendrímeros PAMAM na superfície de eletrodos, em que o sucesso desta imobilização depende também de outros nanomateriais empregados, como nanotubos de carbono (CNT), nanopartículas de ouro, grafeno e *quantum dots*. As vantagens de se utilizar o PAMAM na superfície do eletrodo estão relacionadas as suas múltiplas possibilidades de conjugação com as moléculas e sítios de ligação estruturalmente estáveis (BAHADIR; SEZGINTÜRK, 2016).

1.2 Técnicas eletroquímicas

A voltametria é uma técnica eletroquímica onde as informações qualitativas e quantitativas de uma espécie química são obtidas a partir do registro de curvas corrente-potencial, obtidas durante a eletrólise dessa espécie em uma cela eletroquímica constituída por pelo menos dois eletrodos, sendo um deles o eletrodo de trabalho, de menor superfície, e o outro um eletrodo de superfície relativamente grande, usualmente um eletrodo de referência. O potencial é aplicado entre os dois eletrodos em forma de varredura, isto é, variando-o a uma velocidade constante em função do tempo. O potencial e a corrente resultante são registrados simultaneamente, a curva entre estes dois parâmetros é chamada de voltamograma. Para resolver algumas limitações das células de dois eletrodos, foi desenvolvida a célula de três eletrodos, onde o terceiro eletrodo é chamado de eletrodo auxiliar, geralmente de platina, mas podendo ser de outro, carbono vítreo, entre outros. Ele foi

introduzido na célula voltamétrica para assegurar o sistema potenciostático (Fig. 7) (ALEIXO, 2003).

Figura 9: Cella eletroquímica de três eletrodos:



Fonte: ANDRADE, 2013.

O eletrodo de trabalho é comumente feito de um material inerte, como ouro, platina, carbono ou mercúrio. Quando é constituído de um eletrodo gotejante de mercúrio, a técnica é chamada de polarografia, porém por questões ambientais os demais passaram a substituir o mercúrio e o carbono vem se mostrando uma alternativa bastante útil e utilizada, devido a sua ampla faixa de potencial, ser quimicamente inerte, possuir grande reprodutibilidade e apresentar custo relativamente menor (ALEIXO, 2003; BRITO, 2011).

Muitos dos mais importantes processos em célula viva, desde seu metabolismo até sua defesa, envolvem processos de oxidação e redução, tornando seu estudo relevante para a compreensão de diversos processos que ocorrem no meio biológico. Esses processos requerem uma atmosfera redox que permita realizar corretamente sua função, sustentado por um complexo grupo de proteínas, peptídeos e genes, com base em uma série de transformações redox e não-redox, catalisadas enzimaticamente ou não, e envolvem transferência de elétrons e de átomos. Alterações nesse equilíbrio podem acarretar mudanças na homeostase celular ou em outros ambientes (MOURA, 2008).

1.2.1 Voltametria cíclica

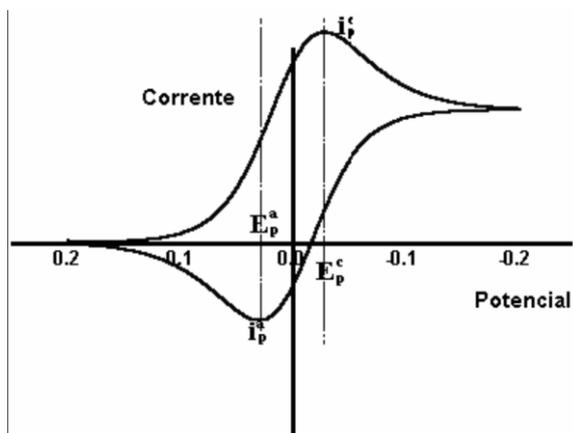
Dentre os vários métodos eletroquímicos, a voltametria cíclica (VC) é provavelmente a técnica mais amplamente utilizada, pois tem se mostrado

experimentalmente simples e precisa para aquisição quantitativa de dados cinéticos e termodinâmicos que auxiliam na elucidação do mecanismo de ação de fármacos ou até mesmo pode colaborar no planejamento de compostos biologicamente ativos. É uma das principais técnicas utilizadas no estudo eletroquímico de uma infinidade de compostos, inclusive quinonas, tanto em meio aprótico, quanto em meio prótico (BRITO, 2011; WANG et al., 2010; JIMÉNEZ-ALONSO, et al., 2011; MA et al., 2011; SOUZA, 2011).

Na voltametria cíclica é possível fazer apenas um ciclo ou múltiplos, a depender do analito eletroativo estudado, em solvente estável e em velocidade conhecida. Para a redução da espécie em análise, deve-se aplicar um aumento do potencial para valores mais negativos, o que nos fornece um pico de corrente catódica proporcional a concentração do analito em solução, até o potencial atingir o valor em que não se espera nenhuma redução. Após isso, o potencial é varrido no sentido inverso até o valor inicial. Novos ciclos podem ser produzidos quando o potencial retorna ao início e com os mesmos parâmetros do primeiro ciclo. Quando o potencial aplicado for no sentido positivo, as reações possíveis serão de oxidação e a corrente, neste caso anódica, será proporcional a concentração (BRITO, 2011).

A partir dos resultados gerados nas reações de oxirredução, 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 ($\Delta E_{p/2}$) pode-se analisar o processo eletroquímico ocorrido, como pode-se observar na Fig. 8, para um sistema reversível. O estudo do potencial e da corrente com a variação da velocidade de varredura, com a concentração da substância eletroativa e a partir da adição de eletrófilos, nucleófilos ou prótons, com análise baseada em testes diagnósticos, permite obter informações importantes como reversibilidade do processo eletródico, ou seja, se o processo é reversível, quase-reversível ou irreversível, a presença de reações química acopladas, adsorção e fenômenos catalíticos, bem como avaliar a influência do meio reacional sobre estes parâmetros, sobre a existência e estabilidade de radicais e intermediários formados pela redução de espécies eletroativas como as quinonas (GREEF et al, 1985; BRETT; BRETT, 1996).

Figura 10: Voltamograma cíclico para um sistema reversível



Fonte: Adaptado de GREEF et al, 1985.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a formação de complexo de inclusão da β -lapachona com dendrímeros de gerações 2 e 3 através de técnicas eletroquímicas e espectroscópicas.

2.2 Específicos

- Verificar a formação de complexos por inclusão da β -lapachona, β LP, com dendrímeros de 2^a e 3^a geração através da técnica eletroquímica de voltametria cíclica,
- Verificar a interação da β LP com nanotubo de carbono (CNT);
- Preparar o complexo β LP e dendrímero PAMAM, de diferentes gerações e caracterizá-los através das técnicas de espectroscópicas UV-vis e FTIR.
- Calcular a constante de interação entre a β LP e o PAMAM por técnica eletroquímica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes e Solventes

A quinona utilizada neste trabalho foi a β -lapachona, obtida no Laboratório de Produtos Naturais da UFRJ e gentilmente cedida pela Professora Ligia Maria Marino Valente. O hidrogenossulfato de potássio (KHSO_4), fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), *N,N*-dimetilformamida (DMF) e o metanol têm procedência da Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil). O nanotubo de carbono (CNT) de Nano-Lab (Massachusetts, EUA), PAMAM G2 e G3 (20% m/v em metanol), 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etil carbodiimida hidrocloreto (EDC; 98%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) e o ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA) foi obtido da Merck (Darmstadt, Germany).

Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas em água ultrapura (18 M Ω cm) obtida de um sistema de purificação Milli-Q da Millipore Inc.

3.2 Estudos Eletroquímicos

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PGSTAT (AUT73222) da Metrohm Autolab[®] em um sistema de três eletrodos. Como eletrodo de trabalho utilizou-se eletrodo de carbono vítreo (BAS, diâmetro 1,6 mm) ou eletrodo de ouro; como eletrodo auxiliar foi utilizado um fio de platina e como eletrodo de referência foi utilizado o sistema $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{Cl}^-$ (saturado) da BAS. As medidas foram realizadas à temperatura ambiente 25 ± 1 °C. O tratamento posterior dos gráficos foi realizado através do programa Origin 8.0.

Nas análises eletroquímicas em meio prótico utilizou-se como eletrólito suporte uma solução de tampão fosfato (pH 7,0, força iônica 0,2 mol L⁻¹) ou solução de sulfato de sódio 0,2 mol L⁻¹ e utilizou-se etanol como co-solvente neste sistema. Para o preparo do tampão, foram utilizados fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) e fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), dissolvidos em água purificada. O valor de pH da solução foi determinado em pH-metro modelo Quimis Q400A.

3.2.1 Avaliação da interação da β -lapachona com PAMAM G2 e G3 em solução

Utilizou-se como eletrólito de suporte uma solução de tampão fosfato pH 7,0, eletrodo de carbono vítreo e a técnica de voltametria cíclica. Após varredura do eletrólito de suporte, adicionou-se na cela 0,24 mg da β LP sólida (não-solubilizada) e, em seguida, foram realizadas adições sucessivas do PAMAM G2 ou G3 (20% m/v – solução comercial) (2, 5, 10 e 20 μ L), variando a concentração do PAMAM 10,5 a 105 μ mol L⁻¹, com o objetivo de observar se ocorre transferência de fase, através do perfil eletroquímico e os valores de corrente catódica e anódica gerados.

3.2.2 Avaliação da interação da β -lapachona com CNT e PAMAM G2 ou G3 em eletrodo de carbono vítreo.

Antes dos experimentos, o eletrodo de carbono vítreo (BAS) passou por um procedimento de limpeza mecânica, sendo inicialmente polido com alumina (0,3 μ m) e lavado abundantemente com água, para então de ser levado em etanol ao ultrassom por 30 s. Após este procedimento, para verificar a eficiência do polimento, foi realizado o teste com uma solução de ferricianeto de potássio/ferrocianeto de potássio e, com isso verificou-se também a área eletroativa do eletrodo.

Para avaliar a interação da quinona com nanotubo de carbono (CNT) e os dendrímeros de PAMAM, inicialmente a superfície do eletrodo de carbono vítreo foi modificado com 10 μ L de uma suspensão de CNT (1 mg/mL) em DMF, adicionando 1 μ L por vez na superfície do eletrodo de carbono vítreo e levado a estufa por 10 minutos à 70°C.

Na análise com dendrímeros, utilizou-se o de poli (amidoamina) (PAMAM 20% m/v metanol), das gerações 2 ou 3, que foi imobilizado na superfície do eletrodo posteriormente ao CNT, adicionando-se 5 μ L da solução de PAMAM, seco sob um fluxo de gás inerte, até observação de um filme em sua superfície.

Utilizou-se como eletrólito suporte uma solução etanólica tamponada (tampão fosfato pH 7,0, 10% v/v de etanol). Após a varredura do eletrólito suporte, adicionou-se a cela o correspondente a 100 μ mol L⁻¹ de β LP, previamente solubilizada em etanol. Em seguida foram realizados 20 scans sucessivos para cada modificação do eletrodo. Antes das varreduras o meio foi desaerado e para isto foi borbulhado gás inerte (argônio) por cerca de 10 min.

Para calcular a constante interação entre a quinona e o PAMAM G2 e G3 em eletrodo de carbono vítreo, variou-se a concentração da β LP de 10-100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, a partir de uma solução estoque desta quinona à 1 mmol L^{-1} em etanol.

A partir dos valores de corrente catódicos obtidos para cada concentração, a equação da reta foi gerada e, em seguida, foi calculado a constante de interação entre a β LP e o PAMAM, através da equação derivada da isoterma de Langmuir (Eq 1) (MAEDA, 1997; FERREIRA et al, 2010).

$$\frac{[\beta LP]_0}{I} = \frac{1}{KI \max} + \frac{[\beta LP]_0}{I \max} \quad \text{Eq 1}$$

Onde I o valor de corrente catódica quando a concentração inicial da β LP é $[\beta LP]_0$, K é a constante de associação do complexo, $I \max$ é o valor máximo de corrente obtido.

Com a finalidade de verificar como ocorre o processo de transferência de massa Da solução para a superfície do eletrodo, a velocidade de varredura foi variada (10, 20, 35, 50, 100, 200 e 300 mV s^{-1}).

3.2.3 Avaliação da interação da β -lapachona com PAMAM G2 em eletrodo de ouro.

Através da metodologia descrita por Bustos e colaboradores (2008), o eletrodo de ouro foi modificado com o MUA e, posteriormente, com o PAMAM G2.

Inicialmente o eletrodo de ouro foi limpo através o aquecimento em chama, até atingir a cor rubra. Para a funcionalização com a MUA o eletrodo limpo foi imerso por 24h em uma solução metanólica deste ácido com concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Passada as 24h, o eletrodo foi lavado com metanol e então imerso em outra solução metanólica, agora contendo $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de EDC e $21 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de PAMAM G2 por 12h. Após decorrido o tempo da modificação do eletrodo, este foi lavado com metanol e utilizado para as análises.

Utilizou-se como eletrólito de suporte uma solução etanólica (desulfato de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, 5% v/v de etanol). Após varredura do eletrólito de suporte, adicionou-se na cela alíquotas de uma solução estoque de β LP (1 mmol L^{-1} em etanol), sendo sua concentração variada de 5-20 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A cada adição da β LP a solução foi agitada

com o auxílio de um agitador magnético e desaerada com gás inerte (argônio) por 30 minutos, pois observou-se a necessidade de um tempo maior de interação da quinona com o dendrímero antes da varredura.

Os valores de corrente catódica gerado pela interação da β LP com eletrodo modificado com MUA e MUA/PAMAM G2 e a concentração da quinona foram utilizados para calcular a constante de interação com o dendrímero PAMAM G2, utilizando equação adaptada de Scatchar-Klotz (BOBROVNIK, 2002; BUCZKOWSKI et al, 2011; STATCHARD, 1949):

$$\frac{1}{\Delta I} = \frac{1}{K[\beta LP]} + \frac{1}{n} \quad \text{Eq 2}$$

Onde ΔI , é a diferença entre os valores de corrente com eletrodo modificado com MUA/PAMAM e apenas com MUA ($I_P - I_M$), geradas pela redução da β LP em diferentes concentrações, com o eletrodo de ouro modificado com MUA/PAMAM (I_P) e apenas com o eletrodo modificado com MUA (I_M), n é o número de sítios ativos em que o fármaco pode se ligar no dendrímero, K a constante de equilíbrio do complexo formado e $[\beta LP]$, a concentração da β LP.

3.3 Estudos espectroscópicos

3.3.1 Preparação do complexo β -lapachona com os dendrímeros PAMAM G2

Para obtenção dos complexos sólidos de β -lapachona (β LP) com os dendrímeros PAMAM (PAMAM- β LP) foi escolhido o PAMAM G2 (β LP -PAMAM G2) conforme descrito na literatura (DEVARAKONDA et al, 2007; NA et al, 2006; KOLHE et al, 2003).

Pesou-se 1,21 mg de β LP, que foi transferido para um balão volumétrico de 5 mL. Adicionou-se metanol até completar o volume, obtendo-se uma solução com concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A partir desta solução mãe e da solução de PAMAM (20% m/v – solução comercial) foram adicionados volumes adequados para se obter as seguintes proporções de β LP-PAMAM em 5 mL de metanol: 1:1, 2:1, 4:1, 8:1 e 12:1, em balões de fundo redondo de 10 mL. A solução permaneceu com agitação constante durante 24h à 250 rpm. Após a agitação o metanol foi evaporado à 40°C sob vácuo. Em seguida, adicionou-se 5 mL de água purificada e a dispersão formada

foi novamente agitada a 150 rpm durante 24 h. A suspensão foi filtrada em membrana Polietersulfônica (PES) 0,2 μm . A dispersão aquosa contendo o complexo de βLP - PAMAM foi congelada em freezer e liofilizada. Em seguida, realizou-se a análise por UV-vis.

Os complexos liofilizados foram individualmente solubilizados em 5 mL de metanol e analisados no comprimento de onda de 256 nm, que é comumente utilizado para análise da βLP em ensaios de identificação e quantificação (PRESMICH et al, 2010).

O número de moléculas de βLP para cada mol de PAMAM foi obtido a partir da equação da reta gerada na curva analítica para a βLP em metanol (descrito abaixo). A equação gerada é do tipo $y = a + bx$, onde y é a absorbância em 256 nm, a o coeficiente linear e b coeficiente angular e x a concentração da quinona. A partir da concentração obteve-se o número de mols da βLP , que dividido pelo número mols de PAMAM, obtem-se número de moléculas da βLP para cada mol de PAMAM.

3.3.2 Preparação para a curva analítica

Para quantificação da βLP através de espectrofotometria de UV-vis foram obtidas curvas de calibração a partir de uma solução estoque de βLP em metanol na concentração de 1 mmol L^{-1} . Posteriormente, sucessivas diluições foram realizadas, para a construção das curvas de calibração, nas seguintes concentrações: 10, 20, 40, 80 e 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os espectros de absorção da βLP no espectrofotômetro UV-Vis foram obtidos a 256 nm, utilizando como branco o metanol. A metodologia utilizada para esta curva analítica da βLP foi desenvolvida e validada por Presmich e colaboradores em 2010.

3.3.3 Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros FTIR da βLP e dos complexos βLP – PAMAM liofilizados foram registrados à temperatura ambiente, utilizando o equipamento espectrômetro IRPrestige-21 com transformada de Fourier (Shimadzu Corp, Kyoto, Japão) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de selênio. A análise foi realizada com 16 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} na região compreendida entre 4000 a 400 cm^{-1} , com a análise direta do pó.

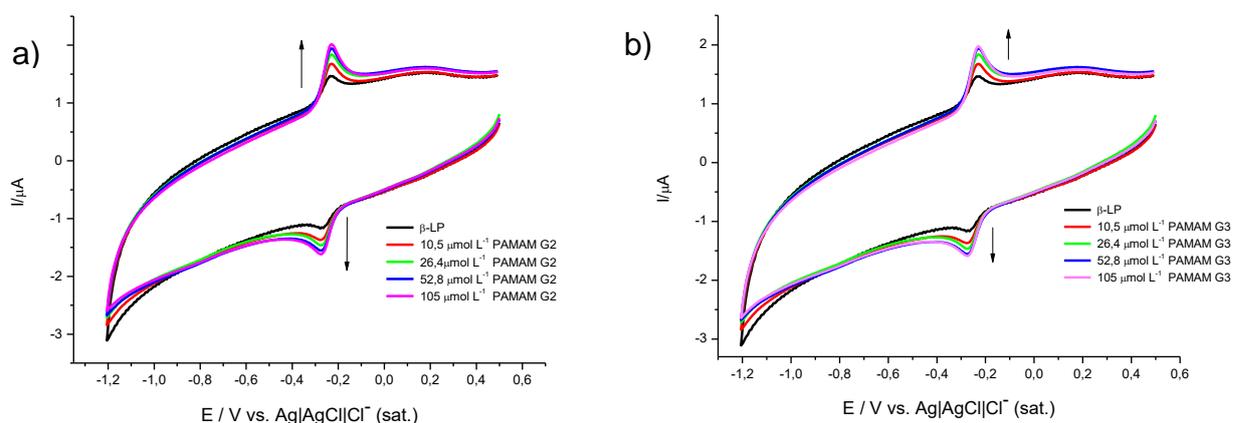
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Interação entre PAMAM G2 e G3 com a β LP pela técnica de Voltametria cíclica (VC)

4.1.1 Avaliação da interação da β -lapachona com PAMAM G2 e G3 em solução

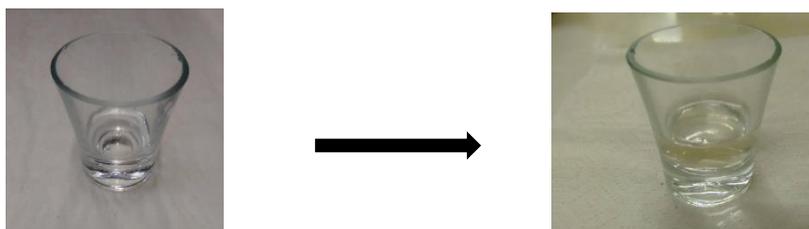
Com a finalidade de observar e verificar o processo de transferência de fase da β LP não solubilizada em solução contendo PAMAM G2 ou G3 em meio aquoso, variou-se a concentração do PAMAM G2 no meio, conforme o voltamograma da Fig. 11. Esse processo de transferência de fase também foi acompanhado visualmente, pois a solução passa de incolor para uma coloração alaranjada (Fig. 12).

Figura 11: Voltamograma cíclico da β LP variando a concentração de PAMAM a) G2 e b) G3 10,5 a 105 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com, em Tampão fosfato pH 7,0.



Fonte: Autora, 2017.

Figura 12: Foto da cela eletroquímica antes do experimento com a β LP não solubilizada e após a adição do PAMAM G2.



Fonte: Autora, 2017.

Em meio aquoso a β LP na ausência de co-solvente apresenta pico catódico em torno de -0,3 V (ABREU, 2002), gerando sua HQ correspondente que está relacionada a onda de redução nos voltamogramas obtidos para PAMAM G2 (Fig. 9a) e PAMAM G3 e (9b). Conforme aumentou a concentração do PAMAM no meio, observou-se um aumento na corrente de pico de catódico e sua correspondente onda anódica, até a saturação do sistema. Isto ocorre devido à provável interação da β LP com o dendrímero, sem interferir significativamente no processo de oxirredução desta quinona. Além disto houve um discreto deslocamento no potencial de redução para valores mais negativos, que pode ser atribuído a uma maior interação da quinona reduzida pelo interior do dendrímero.

A forma elipsoidal dos dendrímeros PAMAM, a presença de diversas ramificações e cavidades internas vazias os tornam capazes de encapsular moléculas de fármacos diretamente para o interior da macromolécula. Estas cavidades internas vazias têm geralmente propriedades hidrofóbicas, que torna possível a interação com substâncias fracamente solúveis em água através de interações hidrofóbicas. O método mais comum para o encapsulamento de moléculas hóspedes em dendrímeros faz uso destas interações (POURIANAZAR; MULTLU, GUNDUZ, 2014).

Há poucos relatos na literatura de estudos entre dendrímeros e quinonas, porém uma substância desta classe foi anteriormente estudada com PAMAM, o fármaco doxorrobucina (DX). Papagiannaros e colaboradores (2005) prepararam o complexo entre eles, a fim de obter um sistema de liberação da DX, sendo o complexo, posteriormente incorporado em lipossomas. Ke e colaboradores (2007) também utilizaram o complexo DX-PAMAM contra células cancerosas do cólon em um sistema de liberação oral de fármacos que aumentou a biodisponibilidade da DX cerca de 700 vezes mais do que ela livre. Em ambos os casos, apenas estudos espectrocópicos foram realizados com a finalidade de caracterizar a interação entre estes compostos.

No estudo reportado por Papagiannaro e colaboradores (2005), a quinona DX foi melhor incorporada no PAMAM quando o meio apresentava pH 7,5 do que em um meio mais ácido (pH 4,5), pois naquele pH as interações hidrofóbicas entre PAMAM e doxorubicina são favoráveis, aumentando a incorporação do fármaco no dendrímero. Ke e colaboradores também atribuí a incorporação às características básicas do PAMAM neste meio, junto com o caráter ácido da DX.

4.1.2 Avaliação da interação da β -lapachona com CNT e PAMAM G2 ou G3 em eletrodo de carbono vítreo

O uso de CNTs com dendrímeros de PAMAM é bastante vasto na literatura, principalmente no desenvolvimento de sensores e biossensores (ZHU et al, 2009; WU et al 2016; ZHANG et al 2015; XU et al, 2007), bem como em aplicações biomédicas, como transferência gênica e terapia antimicrobiana (ABBASI et al, 2014). Os nanotubos de carbono têm atraído um interesse crescente em sensores, uma vez que possuem uma área de superfície relativamente grande, alta estabilidade química, capacidade de adsorção forte e uma excelente condutividade elétrica. Por outro lado, os dendrímeros PAMAM são uma classe única de macromoléculas poliméricas, que possuem numerosos grupos periféricos e são adequados para modificar superfícies de electrodos (ZHANG et al 2015).

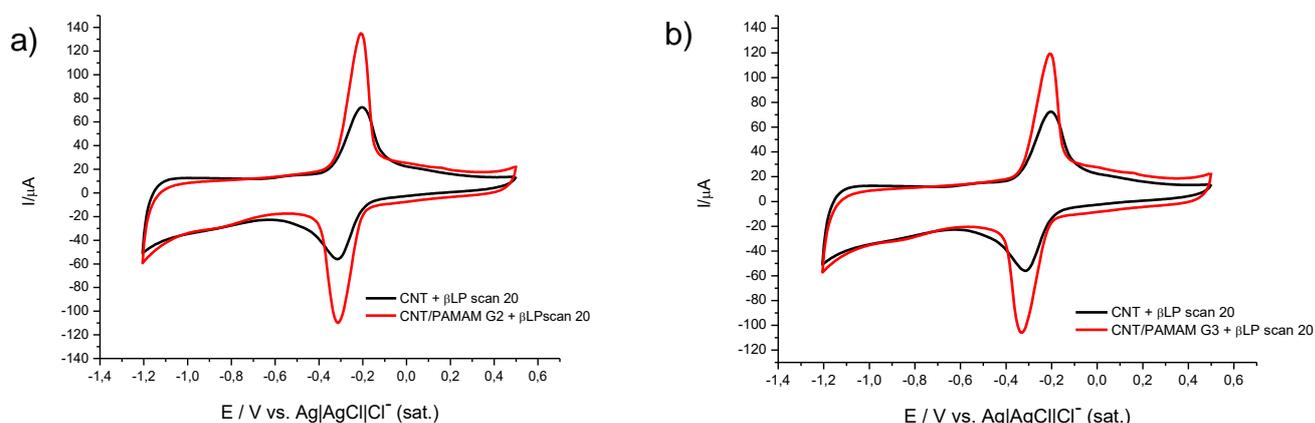
Segundo Vijayaraghavan e Steveson (2007) a adsorção do PAMAM ao CNT puro (sem modificações) é atribuída a fortes interações de van der Waals com a superfície do nanotubo e, de modo especial, ao PAMAM com terminações amino que adsorvem ainda mais fortemente em suportes incluindo HOPG (*Highly oriented pirolised graphite*), ouro e carbono vítreo, do que PAMAM com terminações OH.

Funcionalização por ligação covalente tanto no CNT quanto no dendrímero poderiam danificar a superfície do CNT e alterar algumas propriedades do PAMAM, por isso este tipo de metodologia tem sido uma estratégia não só para o desenvolvimento de biossensores, como para aumentar a solubilidade do CNT em solventes polares (VASUMATHI et al, 2013; HERRERA et al 2010). Porém, quando comparado ao CNT oxidado, ou seja, funcionalizado com grupos OH, a adsorção do PAMAM em sua superfície é mais baixa e é formado aglomerados, e não uma camada bem dispersa, mas ainda assim apresenta alta atividade catalítica (HERRERA et al, 2010; VIJAYARAGHAVAN; STEVESON, 2007).

Com o objetivo de verificar a diferença entre a interação da quinona com o CNT e o CNT/PAMAM no eletrodo, foram realizados 20 scans sucessivos, com o eletrodo modificado. Ao fim dos 20 scans, verificou-se uma estabilidade, (figura 13a e b) e observou-se um valor de corrente cerca de duas vezes maior para o eletrodo modificado com PAMAM G2 ou G3 quando comparado ao mesmo eletrodo, modificado apenas com CNT.

O uso do dendrímero PAMAM para modificar a superfície do eletrodo é indicada também devido a sua boa biocompatibilidade e seus grupos funcionais que são adequados para sua fixação. Há relatos de que este polímero é capaz de aumentar a concentração de moléculas hidrofóbicas na interface solução-eletrodo, aumentando a sensibilidade do sistema, bem como sua seletividade, visando detectar reações eletroquímicas específicas (XU et al, 2007)

Figura 13: Voltamogramas cíclicos obtidos para a β LP (10 mmol L^{-1}) em eletrodo de carbono vítreo modificado com CNT e CNT/PAMAM G2 (a) e G3 (b). Tampão fosfato pH 7,0, 10% de etanol, $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$.



Fonte: Autora, 2017.

Em meio aquoso-etanólico a β LP apresentou potencial de redução em cerca de $-0,3 \text{ V}$, gerando sua HQ correspondente que está relacionada a onda de redução, de natureza reversível, dos voltamogramas (Figura 13a e b). O potencial de redução para β LP nos eletrodos modificados CNT/PAMAM G2 e CNT/PAMAM G3 não apresentou variação significativa, conforme valores mostrados na Tabela 2. Desta forma, observou-se que o CNT e PAMAM não interferiram significativamente no processo de oxirredução desta quinona. Além disto, vários estudos têm investigado e relatado o comportamento eletroquímico de quinonas demonstrando a correlação entre os parâmetros eletroquímicos (E_{pc}) e suas atividades biológicas (BOUFFIER et al, 2012; CRUZ et al, 2014; MORENO, 2011).

No entanto, deve-se salientar que o perfil do processo de oxidação apresenta-se ligeiramente mais lento do que a redução quando o eletrodo está modificado apenas com CNT, indicando uma possível complexação entre a forma reduzida da β LP e CNT, o que poderia explicar a ligeira diminuição aparente na reversibilidade do processo redox para este sistema, conforme também relatado por ABREU e colaboradores (2007).

Tabela 2: Valores dos parâmetros eletroquímicos da β LP frente a eletrodo modificado com CNT e PAMAM G2 ou G3.

	E_{pc} (V)	I_{pc} (μA)	E_{pA} (V)	I_{pA} (μA)
CNT	- 0,312	-44,33	- 0,201	59,99
CNT/PAMAM G2	- 0,312	-96,74	- 0,207	120,8
CNT/PAMAM G3	- 0,329	-90,60	- 0,201	104,4

Fonte: Autora, 2017.

Para obter a constante de interação entre a quinona e o PAMAM de G2 e G3, voltamogramas cíclicos foram obtidos (Fig. 14a e b) em concentrações crescentes da β LP (10-100 $\mu\text{mol L}^{-1}$), com o eletrodo modificado com CNT e PAMAM G2 ou G3, em meio aquoso-etanólico.

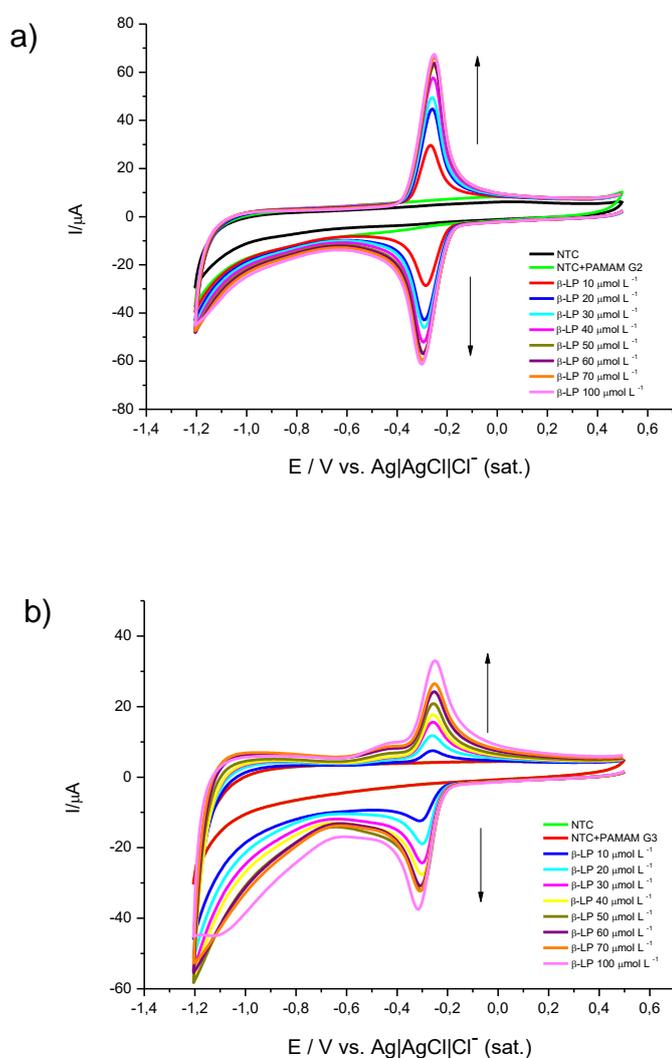
A constante de associação de estabilidade do complexo foi calculada de acordo com a equação derivada da isoterma de Langmuir (MAEDA, 1997; FERREIRA et al, 2010), a partir dos valores de corrente catódica obtida para cada concentração e a equação da reta gerada entre eles (Fig. 15a e b):

$$\frac{[\beta LP]_0}{I} = \frac{1}{KI_{\max}} + \frac{[\beta LP]_0}{I_{\max}} \quad \text{Eq 1}$$

Onde I o valor de corrente catódica quando a concentração inicial da β LP é $[\beta LP]_0$, K é a constante de associação do complexo, I_{\max} é o valor máximo de corrente obtido. As constantes obtidas foram $6,63 \times 10^2$ e $2,59 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ para PAMAM G2 e

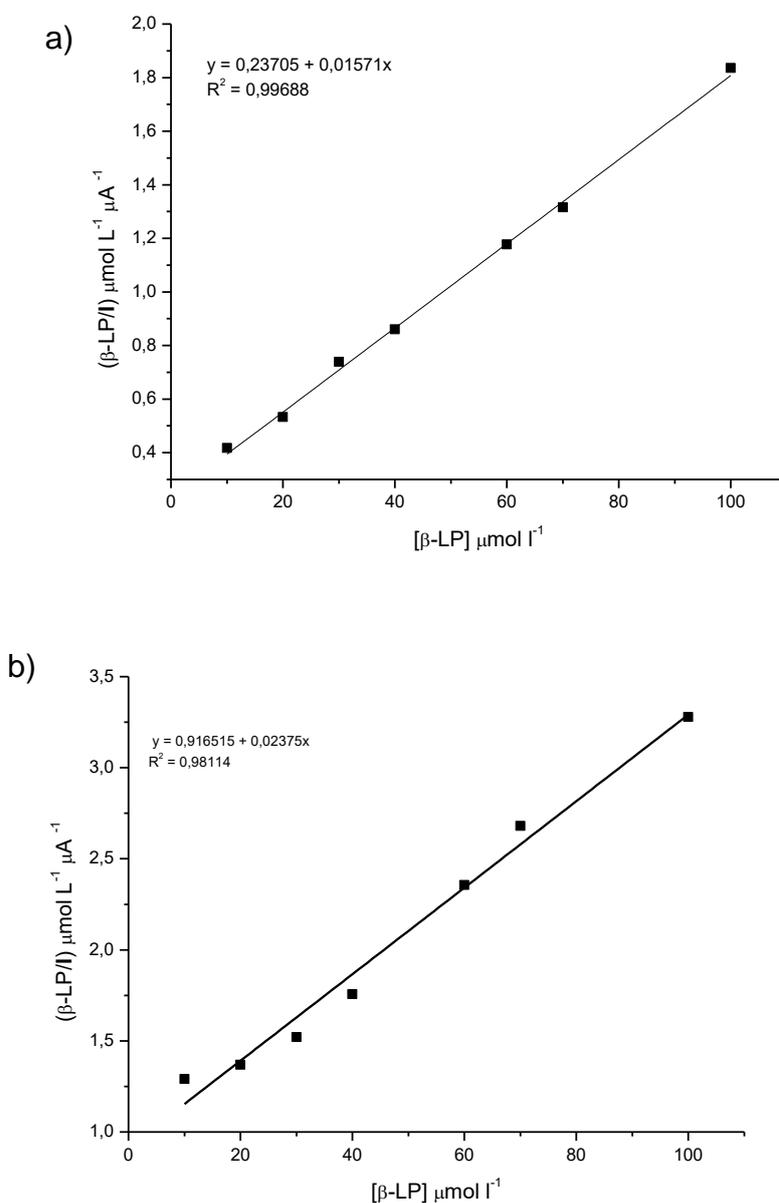
PAMAM G3, respectivamente. Apesar da constante apresentar um valor baixo, demonstra que há interação entre eles. É importante ressaltar que neste tipo de imobilização do PAMAM no eletrodo apenas alguns dos seus sítios ativos estão disponíveis, pois como mencionado anteriormente a adsorção do PAMAM na superfície do CNT é baixa, formando aglomerados, e não uma camada bem dispersa e uniforme.

Figura 14: VC da β LP com concentrações de 10-100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com eletrodo modificado com a) NTC/PAMAM G2 e b) NTC/PAMAM G3. Tampão fosfato pH 7,0 e 10% de etanol, $\nu = 0,05 \text{ V s}^{-1}$.



Fonte: Autora, 2017.

Figura 15: Curva analítica gerada através dos valores de concentração e corrente catódica da β LP com a) CNT /PAMAM G2 e b) CNT /PAMAM G3. Tampão fosfato pH 7,0 e 10% de etanol, $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$.



Fonte: Autora, 2017.

A partir das curvas analíticas construídas, calculou-se os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para β LP em eletrodo modificado com NTC/PAMAM G2 e NTC/PAMAM G3. Sabendo que limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, este foi obtido segundo a equação

3 num valor de 3,5824 e 9,396 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para NTC/PAMAM G2 e NTC/PAMAM G3, respectivamente

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

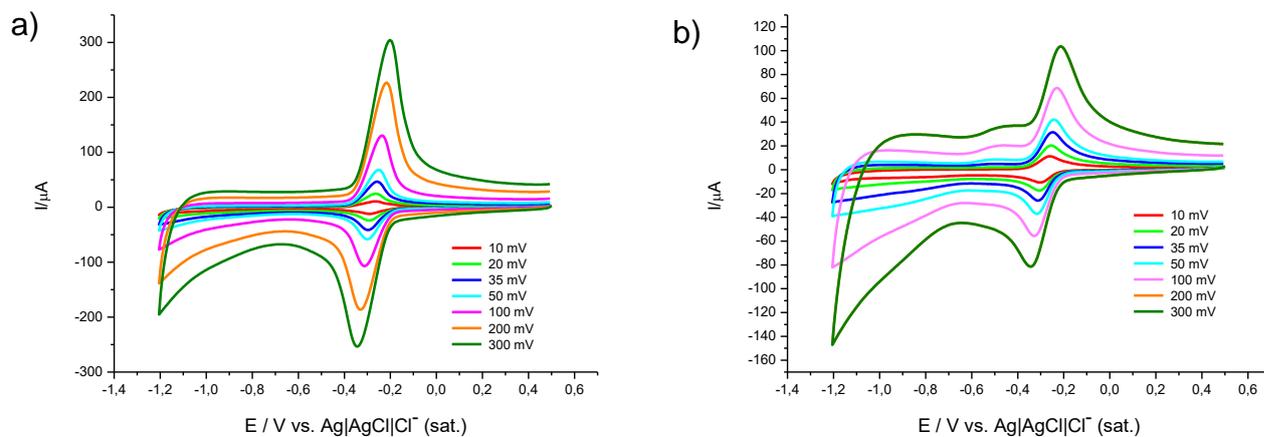
O limite de quantificação por sua vez, é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão, obtido pela aplicação da equação 4 resultando em 11,96 e 31,3221 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para NTC/PAMAM G2 e NTC/PAMAM G3, respectivamente.

$$LQ = \frac{10S_B}{b} \quad \text{Eq. 4}$$

Onde S_B é o desvio padrão médio e o b o valor do coeficiente angular da curva analítica. O sistema avaliado apresentou alta sensibilidade, permitindo seu uso para identificação e eletroanálise da βLP .

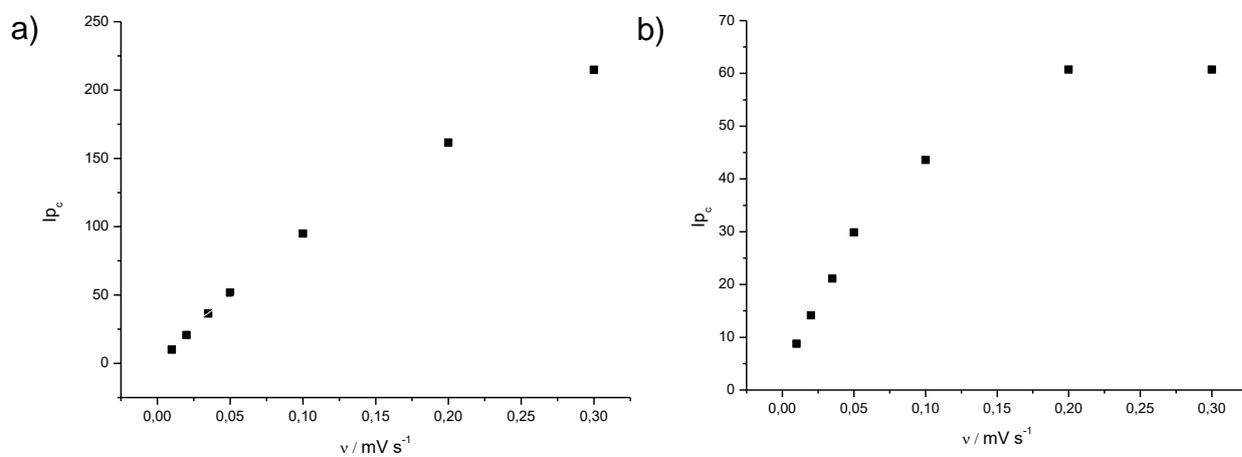
Com a finalidade de verificar como ocorre o processo de transferência de massa da solução para a superfície do eletrodo, variou-se a velocidade de varredura na (0,01, 0,02, 0,035, 0,05, 0,1, 0,2 e 0,3 V s^{-1}). A partir dos voltamogramas mostrados nas Fig. 16a e 16b, e através do plot entre corrente *versus* velocidade de varredura (Fig. 17) e corrente *versus* velocidade de varredura ao quadrado (Fig. 18), observa-se que este processo se deu de forma difusional para ambos eletrodos modificados com PAMAM G2 e G3 (ABREU; GOULART; BREET, 2002).

Figura 16: Voltamogramas obtidos para a βLP a partir da variação da velocidade de varredura de 0,01 a 0,3 V s^{-1} , em eletrodo de carbono vítreo modificado com CNT e a) PAMAM G2 e b) PAMAM G3, tampão fosfato pH 7,0 e 10% de etanol.



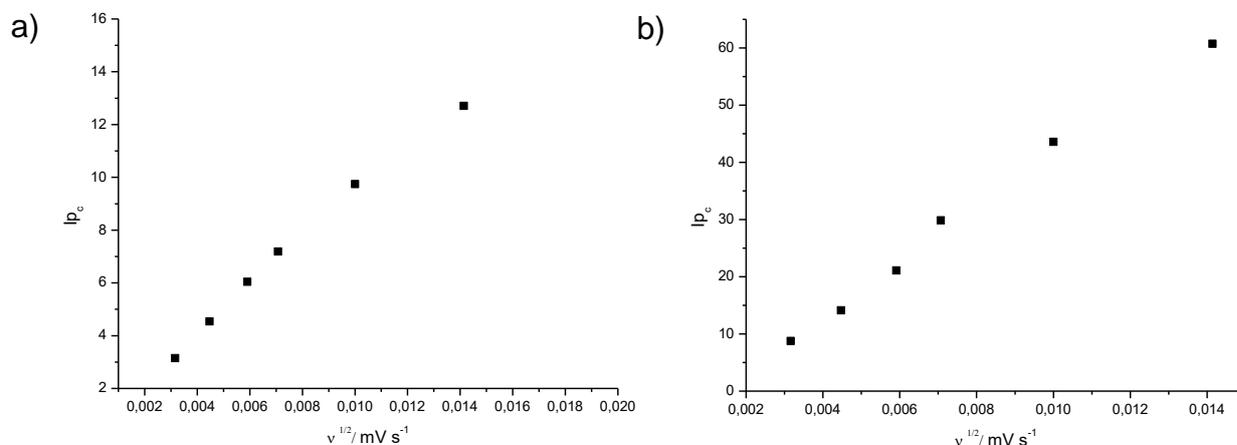
Fonte: Autora, 2017

Figura 17: Plot entre corrente *versus* velocidade de varredura obtida para βLP em eletrodo de carbono vítreo modificado com CNT e a) PAMAM G2 e b) PAMAM G3.



Fonte: Autora, 2017.

Figura 18: Plot entre corrente *versus* velocidade de varredura ao quadrado, para βLP em eletrodo de carbono vítreo modificado com CNT e a) PAMAM G2 e b) PAMAM G3.

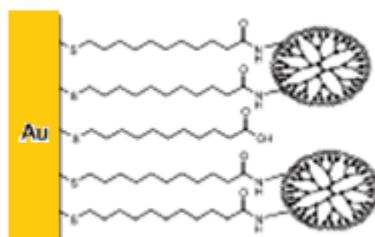


Fonte: Autora, 2017

4.1.3 Avaliação da interação da β -lapachona com CNT e PAMAM G2 em eletrodo de ouro

Bustos e colaboradores (2008) realizaram uma modificação no eletrodo de ouro com PAMAM e MUA, que mais se aproximou com a realidade experimental do trabalho, mantendo disponível a maior parte das aminas terminais e demais sítios ativos deste dendrímero para possível encapsulação, conforme ilustrado na Fig. 19.

Figura 19: Representação do eletrodo de ouro modificado com MUA e dendrímero PAMAM.



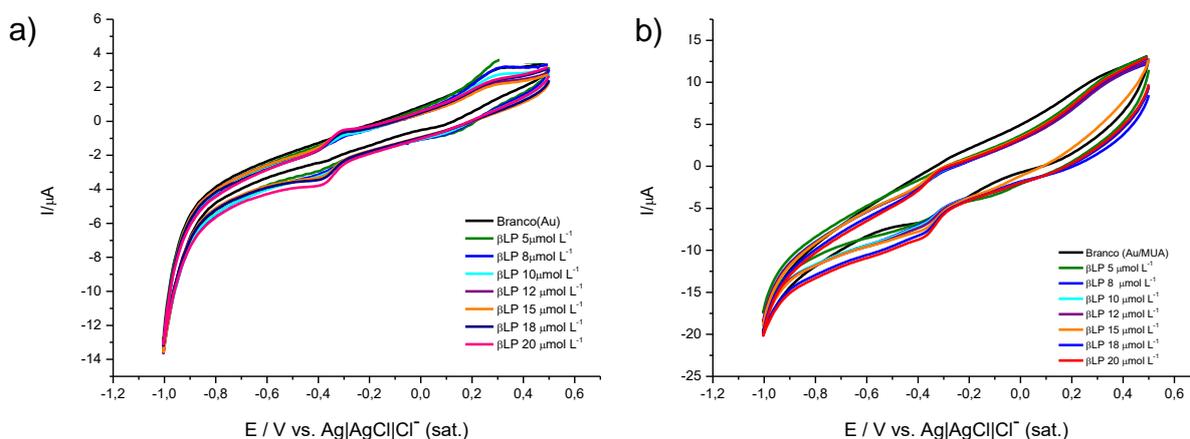
Fonte: Adaptado de BUSTOS et al, 2008.

A estequiometria de formação do complexo com o dendrímero PAMAM geralmente envolve mais de uma molécula do fármaco para cada mol do PAMAM (DEVARAKONDA et al, 2007). Por isso, segundo dados da literatura, a equação de Benesi-Hildebrand é aplicável para interações com estequiometria 1:1 ou 1:2 para

calcular a constante de equilíbrio de um complexo (WANG; YU, 2007; KADAR et al, 2005). Neste caso, foi necessário buscar uma metodologia alternativa para calcular uma constante mais fidedigna e também que permita deixar disponível o maior número possível de sítios ativos do dendrímero.

Inicialmente, avaliou-se a interação da β LP com o eletrodo de Au e este modificado apenas com MUA, conforme mostrado nos voltamogramas das Fig. 20a e 20b, respectivamente. Foi possível verificar uma fraca interação em ambos os sistemas. No eletrodo de Au modificado com MUA, verificou-se diminuição da reversibilidade do processo redox da β LP, por provável bloqueio da transferência de elétrons.

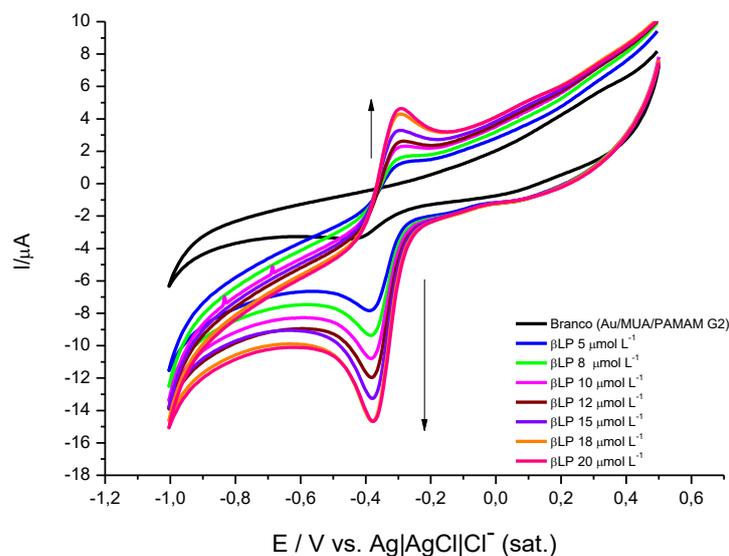
Figura 20: Voltamogramas cíclicos para a β LP de 5 a 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com eletrodo de a)ouro e b) ouro modificado com MUA. Sulfato de sódio 0,2 mol L^{-1} , 5% de etanol, $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$.



Fonte: Autora, 2017.

Com o objetivo de investigar o número de sítios ativos no PAMAM e da constante de equilíbrio entre a β LP e este dendrímero, avaliou-se os valores de corrente catódica referente as concentrações crescentes da quinona para os eletrodos Au/MUA e Au/MUA/PAMAM-G2 (Figura 21), conforme valores na tabela 3.

Figura 21: Voltamogramas cíclicos obtidos para β LP (5-20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) eletrodo de ouro modificado com MUA e PAMAM G2. Sulfato de sódio 0,2 mol L^{-1} , 5% v/v de etanol, $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$.



Fonte: Autora, 2017

Tabela 3: Parâmetros eletroquímicos obtidos pela interação da β LP com os eletrodos de ouro modificados com MUA/PAMAM e MUA.

[β LP] $\mu\text{mol L}^{-1}$	E_{pc} (V)		I_{pc} (μA)		E_{pa} (V)	I_{pa} (μA)
	MUA/PAMAM	MUA	MUA/PAMAM	MUA	MUA/PAMAM	MUA/PAMAM
5	-0,374	-0,373	-3,943	-1,005	-0,291	-
8	-0,374	-0,373	-5,052	-1,005	-0,291	-
10	-0,374	-0,373	-6,159	-1,005	-0,291	0,1441
12	-0,374	-0,373	-7,039	-1,007	-0,291	0,2806
15	-0,374	-0,373	-8,465	-1,31	-0,291	0,3148
18	-0,374	-0,373	-9,546	-1,31	-0,291	0,7003
20	-0,374	-0,373	-9,435	-1,402	-0,291	1,119

Fonte: Autora, 2017.

Inicialmente, a interação da quinona com o PAMAM pode estar ocorrendo por encapsulamento, por isso sua identificação com este sensor se mostra tão eficiente quando comparado ao eletrodo modificado só com MUA ou sem modificação (Fig. 20).

Isto ocorre devido as já citadas cavidades internas vazias do PAMAM que o tornam capaz encapsular moléculas de β LP.

Analisando o voltamograma da Fig. 21, em que foi realizada modificação do eletrodo de ouro com PAMAM G2, observou-se uma variação de potencial correspondente à (ΔE) 83 mV, menor do que com o eletrodo de carbono vítreo modificado com CNT/PAMAM G2 (105 mV), que pode ser explicada pelo fato da oxidação da quinona semireduzida está sendo dificultada, provavelmente devido a uma estabilização do radical gerado durante a redução da β LP. Isso também explica a menor reversibilidade do processo, que é notável neste mesmo voltamograma. Durante a redução, a estabilidade do radical gerado na semirredução da β LP pode ser atribuída a uma interação eletrostática entre este radical e os grupamentos aminos (aminas primárias e terciárias) que estão protonados em pH 7,0. Vale salientar que há um pico de redução em -0,408 V ainda no branco do voltamograma da Fig. 21, que pode ser atribuída a uma impureza no tampão, porém como o potencial difere do composto analisado, isto não interferiu na compreensão dos resultados.

Estudos utilizando outros agentes encapsulantes, calcularam a constante de formação do complexo da β LP com tais agentes. Nasongkla e colaboradores (2003) avaliaram através da técnica espectroscópica de fluorescência a interação da β LP com os agentes β -CD e HP β -CD em meio aquoso, no qual os valores encontrados foram de $1,23 \times 10^3$ e $0,94 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ respectivamente. Já Abreu e colaboradores (2007) por técnica espectroscópica de UV-vis encontraram um valor bem menor ($K_F = 15 \text{ M}^{-1}$) em meio aquoso-etanólico para interação com β -CD.

A dependência do número de moléculas de ligantes combinadas por 1 mol de receptor e a concentração da substância adicionada no meio possui uma reta de caráter hiperbólico (BOBROVNIK, 2002; BUCZKOWSKI et al, 2011):

$$\frac{1}{\Delta I} = \frac{kn[\beta LP]}{1 + K[\beta LP]} \quad \text{Eq 5}$$

Onde ΔI , é a diferença entre os valores de corrente com eletrodo modificado com MUA/PAMAM e apenas com MUA ($I_P - I_M$), geradas pela redução da β LP em diferentes concentrações, com o eletrodo de ouro modificado com MUA/PAMAM (I_P) e apenas com o eletrodo modificado com MUA (I_M), n é o número de sítios ativos em que o

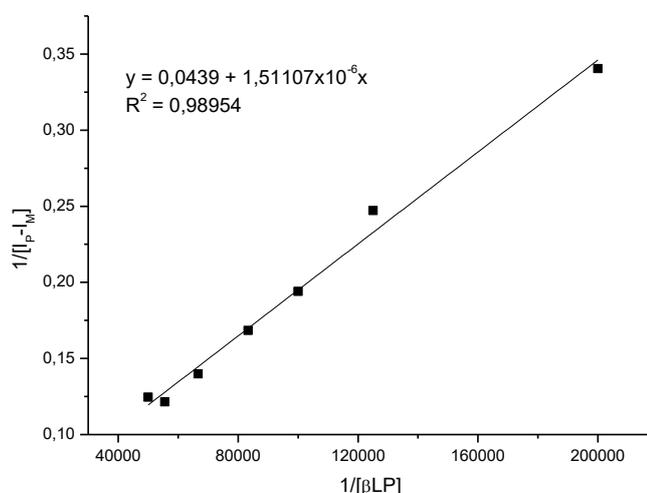
fármaco pode se ligar no dendrímero, K a constante de equilíbrio do complexo formado e $[\beta LP]$, a concentração da βLP .

A linearização da Eq. 5 é chamado de equação de Scatchard-Klotz e que foi adaptada para parâmetros eletroquímicos (BOBROVNIK, 2002; BUCZKOWSKI et al, 2011; STATCHARD, 1949):

$$\frac{1}{\Delta I} = \frac{1}{K[\beta LP]} + \frac{1}{n} \quad \text{Eq 2}$$

Os resultados experimentais obtidos (Tabela 3) foram descritos pela equação de Scatchard-Klotz para avaliar o intervalo de variação em que se deve procurar o número de sítios ativos e a constante de equilíbrio da combinação βLP -PAMAM G2 em solução aquosa. A dependência inversa da corrente (ΔI), pela concentração de βLP adicionada (Fig. 22) é descrita com a equação de linha reta: $Y = (0,0439) X + (1,51107) \times 10^{-6}$ ($R^2 = 0,98954$). O número de sítios ativos n em dendrímeros e a K entre βLP e PAMAM a partir da Equação de Scatchard-Klotz, forneceu os valores de 22,77 e $2,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, respectivamente.

Figura 22: Curva analítica gerada através dos valores de concentração e corrente da βLP com eletrodo de ouro modificado com MUA e PAMAM G2. Sulfato de sódio $0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$, 5% de etanol, $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$.



Fonte: Autora, 2017

A partir da curva analítica gerada através dos valores de concentração ($[\beta LP]$) e corrente da βLP ($[\beta LP]/I$) com PAMAM G2, calculou-se os LD e LQ, pelas Eq. 3 e 4, para este sistema, que apresentaram os valores de 4,98 e 16,62 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

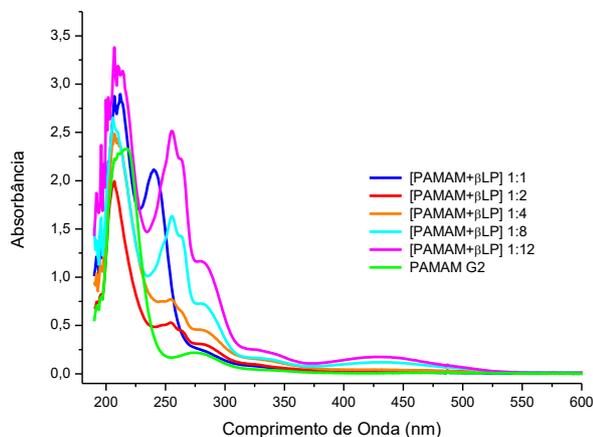
A fim de evidenciar a formação de complexo entre a βLP e o PAMAM G2 foram realizados estudos espectroscópicos visando corroborar com os dados eletroquímicos.

4.2 Estudos espectroscópicos da formação do complexo entre PAMAM G2 e βLP

4.2.1 UV-vis da βLP e dos complexos PAMAM - βLP

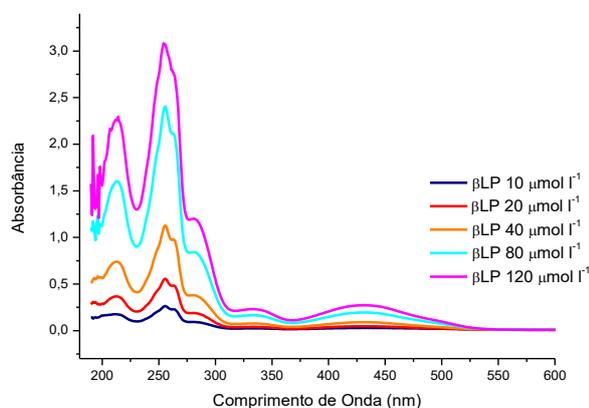
Após a preparação dos complexos da βLP com PAMAM G2, estes foram analisados, em metanol, por espectrofotometria UV-vis (Fig. 23), assim como a βLP livre (Fig. 24) e observou-se mudanças nas bandas de absorção desta quinona, como deslocamentos e supressões, já relatados como evidência de complexação para outras substâncias ativas e os dendrímeros (DEVARAKONDA et al 2007; KLEINMAN et al., 2000; KOLHE et al., 2003; MUSTAFA, 2015). Nota-se que a proporção 1:1 do complexo analisado apresentou comportamento divergente, sugerindo que a formação do complexo nesta proporção foi pouco efetiva

Figura 23: Espectros UV-vis dos complexos β LP-PAMAM em metanol na região de 200 a 600 nm, em concentrações de 10 a 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$.



Fonte: Autora, 2017.

Figura 24: Espectros UV-vis da β LP em metanol na região de 200 a 600 nm em concentrações de 10 a 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

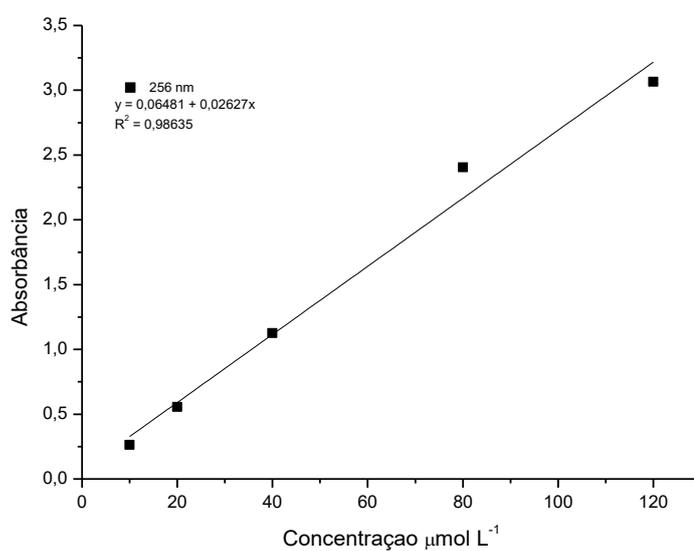


Fonte: Autora, 2017.

A partir da curva analítica com valores de absorbância da β LP em metanol no comprimento de onda de 256 nm (Fig. 25), foi possível realizar a análise de regressão linear que demonstrou um coeficiente de correlação próximo da unidade, $R^2 = 0,98635$, demonstrando que há correlação entre as variáveis X e Y, apresentando coeficiente angular de 0,06481 e coeficiente linear de 0,02627.

A partir da equação da reta gerada calculou-se o número de moléculas incorporadas em cada mol do dendrímero PAMAM nos complexos formados, conforme Tabela 4. Com base no número de moléculas de β LP que foi associado com cada molécula de dendrímero, fica evidente a complexação (DEVARAKONDA et al 2007).

Figura 25: Curva analítica com valores de absorbância da β LP em metanol no comprimento de onda de 256 nm.



Fonte: Autora, 2017.

Tabela 4: Número de moléculas incorporadas pelo PAMAM.

Complexo PAMAM - βLP	Nº de moléculas incorporadas
1:1	2,90
1:2	1,73
1:4	2,66
1:8	5,95
1:12	9,31

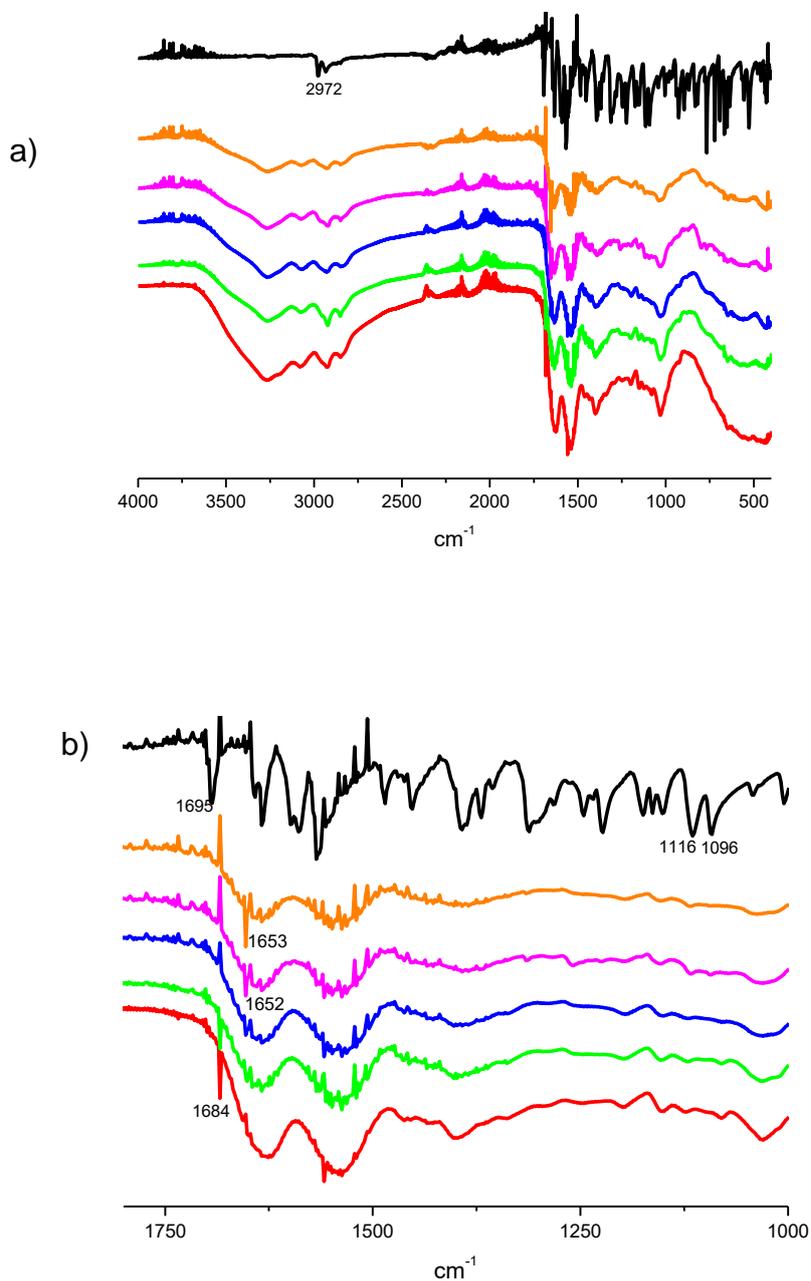
Fonte: Autora, 2017.

4.2.2 Espectros de infravermelho da β LP e dos complexos PAMAM - β LP obtidos por ATR FTIR

A utilização da técnica de espectroscopia de FTIR permite não só evidenciar a formação de complexos de inclusão, como avaliar quais os grupos funcionais do fármaco ou do dendrímero de PAMAM que estão envolvidos no processo de complexação no estado sólido. Além de ser considerada uma identificação importante na caracterização de ativos e excipientes, esta técnica é vastamente utilizada na verificação da formação de complexos de inclusão utilizando ciclodextrinas e dendrímeros com fármacos hidrofóbicos (DEVARAKONDA et al, 2007; LYRA et al., 2010).

O espectro de absorção da β LP na região do infravermelho médio, representado na Figura 26a e foi registrado no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} e de 1800 a 1000 cm^{-1} (Fig. 26b) com a finalidade de observar possíveis mudanças no perfil do espectro. A presença das bandas de absorção de média intensidade em 2972 cm^{-1} são características das deformações axiais assimétricas e simétricas, da ligação C (sp^3)-H da metila desta quinona. A região entre 2000 e 1800 cm^{-1} correspondem às bandas fracas de combinação harmônicas, características das estruturas aromáticas. A presença da banda de forte intensidade na região de 1695 cm^{-1} refere-se à vibração do estiramento da carbonila. Já a ligação C-O-C apresenta bandas de deformação axial assimétrica e simétrica, respectivamente, nas regiões de 1115 e 1092 cm^{-1} . Os dados espectrais observados no espectro FTIR são concordantes com os descritos na literatura (ALVES et al., 2008; NETO et al, 2012).

Figura 26: Espectros ATR FT-IR na região de a) 4000-500 cm^{-1} e b) 1800-1000 cm^{-1} da βLP (•) e dos complexos 1:1 (•), 1:2 (•), 1:4 (•), 1:8 (•) e 1:12 (•) de PAMAM- βLP .



Fonte: Autora, 2017.

Conforme relatado na literatura para o PAMAM G2, as bandas de absorção média presentes nos espectros obtidos para os complexos βLP -PAMAM, em diferentes proporções, próximos à 3256, 3066, 2962, 2831, 1654, 1552, 1458, 1128 e

1033 cm^{-1} são características deste dendrímero (CENTURION, 2015; MUSTAFA et al, 2015; PAN, 2013; ROVEDA Jr et al, 2014).

Nos espectros dos complexos estudados ocorreu desaparecimento das bandas de absorção da β LP em 2972 cm^{-1} e do PAMAM G2 em 2962 cm^{-1} , que corresponde ao estiramento simétrico CH_2 deste dendrímero. Houve também uma diminuição da intensidade e o deslocamento da banda referente a carbonila da β LP próximo a 1685 cm^{-1} , bem como supressão da banda em 1458 cm^{-1} atribuída a *scissoring* da ligação H-C-H do PAMAM G2 (ALVES et al., 2008; CENTURION, 2015).

Mudanças nas bandas de absorção amida I para valores mais baixos no dendrímero PAMAM (1633 cm^{-1}), bem como na carbonila da β LP, (1684 cm^{-1}), indica que as moléculas de β LP estão incorporadas no dendrímero através de interações que envolvem as amidas no interior do dendrímero e o grupo carbonila da quinona (DEVARAKONDA et al, 2007; KOLHE et al., 2003).

Observou-se também um surgimento de bandas próximas a 1196 e 1152 cm^{-1} nos espectros obtidos para complexos. Todos os deslocamentos, surgimentos e supressões das bandas nos espectros ATR-FTIR estão descritos na tabela 5.

Apesar da variação de mudanças entre as diferentes proporções dos complexos, ao analisar as bandas dos espectros observa-se principalmente na proporção 1:1 um menor comprometimento da carbonila na interação com o PAMAM. Nas demais proporções houve um desaparecimento na banda de absorção da carbonila nas proporções 1:4, 1:8 e 1:12 e um deslocamento para a proporção 1:2. Esta menor interação explica o fato do complexo, preparado pela primeira proporção, ter tido comportamento diferente dos demais nos espectros UV-vis, indicando que nesta concentração a formação do complexo β LP-PAMAM G2 não foi favorecida. Sendo assim os nas proporções 1:4, 1:8 e 1:12 são os mais relevantes para avaliar a interação entre a β LP e PAMAM e os mais indicados para futuros estudos de solubilidade e análises *in vitro* e *in vivo*.

Tabela 5: Atribuições das bandas (em cm^{-1}) para a βLP e os complexos com PAMAM G2.

Atribuição	PAMAM G2 (cm^{-1})	βLP (cm^{-1})	Complexo 1:1 (cm^{-1})	Complexo 1:2 (cm^{-1})	Complexo 1:4 (cm^{-1})	Complexo 1:8(cm^{-1})	Complexo 1:12 (cm^{-1})
Estiramento N-H em amina primária, H ligado ¹	3256 ¹		3268	3263	3263	3268	3265
Harmônica de amida secundária e ressonância de Fermi da vibração N-H ¹	3066 ¹		3079	3071	3069	3071	3067
Estiramento simétrico CH_2 ¹	2962 ¹						
Deformações axiais assimétricas da ligação C (sp ³)-H da metila. ²		2971					
Deformações axiais simétricas da ligação C (sp ³)-H da metila. ²		2932	2924	2922	2927	2922	2927
Estiramento assimétrico CH_2 ¹	2831 ¹		2850	2850	2843	2846	2849
Estiramento da carbonila ²		1695	1684	1684	1687	1683	1684
Estiramento C=O em amida I ^{1,3}	1654 ¹				1653	1650	1633/1653
Amida secundária HNC=O ¹	1552 ¹		1557		1557/1533	1559/1535	
Scissoring H-C-H ¹	1458 ¹						
Deformações axiais simétricas da ligação C (sp ³)-H da metila ²		1116	1122	1118	1120	1116	1117
Deformações axiais assimétricas da ligação C (sp ³)-H da metila ²		1096	1081	1078		1093	

Fonte: Autora, 2017.¹ CENTURION, 2015; ² NETO, 2012;³ ROVEDA JÚNIOR et al, 2014

5 CONCLUSÃO

O estudo da interação da quinona β LP com o dendrímero PAMAM, através da técnica de voltametria cíclica, mostrou-se bem significativo, pois pode-se observar um maior valor de corrente quando comparado ao mesmo eletrodo modificado apenas com nanotubos de carbono, mostrando também a sensibilidade deste sistema, já que ele não altera significativamente o potencial de redução da β LP.

Através da imobilização do PAMAM G2 e G3 no eletrodo de carbono vítreo, com CNT, foi possível calcular as constantes de interação com β LP, obtendo valores de $6,63 \times 10^2$ e $2,59 \times 10^2$, respectivamente. A constante de interação obtida para β LP em eletrodo de ouro modificado com PAMAM também foi obtida ($K = 2,9 \times 10^4$).

O sistema apresentado para o PAMAM G2 mostrou-se uma boa metodologia para avaliar a interação da β LP com este dendrímero, prevendo que a β LP poderia está sendo encapsulada em seu interior, assim como pode ser bastante útil para a eletroanálise desta quinona.

Os estudos espectroscópicos de UV-vis e FTIR corroboraram para demonstrar a encapsulação desta quinona no dendrímero PAMAM G2 através da interação da carbonila da β LP com os grupos amida na cavidade do dendrímero.

REFERÊNCIAS

- ABASSI, E. et al. Dendrimers: synthesis, applications, and properties. **Nanoscale Research Letters**, v 9:247, 2014.
- ABREU, F. C.; GOULART, M. O. F.; BRETT, A. M. O. Reduction of Lapachones in Aqueous Media at a Glassy Carbon Electrode, **Electroanalysis**, v 14, nº. 1, p. 29-34 2002
- ABREU, F. C. et al. Electrochemical activation of β -lapachone in β -cyclodextrin inclusion complexes and reactivity of its reduced form towards oxygen in aqueous solutions. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 608, p. 125-132, 2007.
- ALEIXO, L.M. Voltametria: Conceitos e técnicas. **Chemkeys**. Disponível em < <http://chemkeys.com/br/wpcontent/themes/chemkeysbr/article1.php?u=dm9sdGFtZX RyaWEtY29uY2VpdG9zLWUtdGVjbmljYXM =>>, 2003. Acesso em 23 de agosto de 2016.
- ALVES, G.M.C. et al. Purificação e caracterização da β -lapachona e estudo de estabilidade dos cristais em diferentes condições de armazenamento, **Química Nova**, v 31, nº 2, p. 413-416, 2008
- ANDRADE, M. N. S. da C. Desenvolvimento de um biossensor para ácido láctico a base de nanomateriais eletródicos. **Dissertação de mestrado**, Maceió, 2013, 70 p.
- BAHADIR, E.B.; SEZGINTÜRK, M.K. Poly(amidoamine) (PAMAM): An emerging material for electrochemical bio(sensing) applications, **Talanta**, v 148, p. 427–438, 2016.
- BLANCO, E. et al. β -Lapachone-containing PEG–PLA polymer micelles as novel nanotherapeutics against NQO1-overexpressing tumor cells, **Journal of Controlled Release**, v 122, p. 365–374, 2007.
- BOBROVNIK, S.A. Ligand–receptor interaction Klotz–Hunston problem for two classes of binding sites and its solution, **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v 52, p. 135–143, 2002.
- BOUFFIER, L. et al. Electrochemistry and bioactivity relationship of 6-substituted-4H-Pyrido[4,3,2-k] acridin-4-one antitumor drug candidates, **Bioelectrochemistry**, v 88, p. 103–109, 2012.
- BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica Princípios, Métodos e Aplicações**. Livraria Almedina, Reimpressão 1996, p. 298-299.
- BRITO, C. L. Antichagásicos Potenciais: Síntese e estudo do comportamento voltamétrico de bioisómeros do Nitrofural. **Dissertação de mestrado**, São Paulo, 2011, 114 p.
- BUCZKOWSKI, A. et al. Interaction between PAMAM-NH₂ G4 dendrimer and 5-fluorouracil in aqueous solution, **International Journal of Pharmaceutics**, v 408, p. 266–270, 2011.

BUSTOS, E. et al. Electrochemical Study of β -Cyclodextrin Binding with Ferrocene Tethered onto a Gold Surface via PAMAM Dendrimers, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v 19, p. 1010-1016, 2008.

CAMINADE, A-M.; TURRIN, C-O. Dendrimers for drug delivery. **Journal of Materials Chemistry B**, v 2, p. 4055, 2014.

CARNEIRO, P.F. et al. New oxirane derivatives of 1,4-naphthoquinones and their evaluation against *T. cruzi* epimastigote forms. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v 20, p. 4995–5000, 2012.

CAVALCANTI, B. C. Avaliação *in vitro* do potencial citotóxico de derivados arilaminados *nor*- β -lapachônicos: estudos de mecanismo de ação. **Tese de Doutorado**, Fortaleza, 2010.

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

CENTURION, L.M.P.C. Interação de nanotubos de carbono com sistemas nanométricos e biológicos: estudos experimentais e computacionais. **Tese de Doutorado**, São Paulo, 2015.

CHAKRABARTI, G. et al. Tumor-selective use of DNA base excision repair inhibition in pancreatic cancer using the NQO1 bioactivatable drug, β -lapachone. **Scientific Reports**, v 5:17066, 2015.

CRUZ, E.H.G. et al. 1,2,3-Triazole-, arylamino- and thio-substituted 1,4-naphthoquinones: Potent antitumor activity, electrochemical aspects, and bioisosteric replacement of C-ring-modified lapachones, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v 22, p. 1608–1619, 2014.

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

DONG, Y. et al. Intratumoral Delivery of β -Lapachone via Polymer Implants for Prostate Cancer Therapy. **Clinical Cancer Research**, v 15, p. 131-139, 2009.

FERREIRA, F. R. et al. Electrochemical investigations into host–guest interactions of a natural antioxidant compound with β -cyclodextrin. **Electrochimica Acta**, v. 56, p. 797-803, 2010.

FERREIRA, S. B. et al. β -Lapachona: sua importância em química medicinal e modificações estruturais. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 2, p. 140-160, 2010.

FERREIRA, S. B. et al. Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of β -lapachone analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 3071-3077, 2011.

- FRANCISCO, A.I. et al. Theoretical studies of the tautomerism in 3-(2-R-Phenylhydrazono)-naphthalene-1,2,4-triones: synthesis of copper(II) complexes and studies of antibacterial and antitumor activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v 21, 1293–1302, 2010.
- FREIRE, C. P. V., et al. Synthesis and biological evaluation of substituted α - and β -2,3-dihydrofuran naphthoquinones as potent anticandidal agentes. **Medical Chemical Communication**, 229(1), 2010.
- FREITAS-NETO, J.L. et al. Caracterização físico-química do potencial agente antineoplásico β -lapachona, **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v 33 (4), p. 545-553, 2012.
- GONZALO, T.; FERNÁNDEZ, M. A. M. Dendrímeros y sus aplicaciones biomédicas, **Monografía XXVIII: Nanotecnología farmacêutica**, p. 169-200, 2009.
- HERRERO, M.A. Gold Dendrimer Encapsulated Nanoparticles as Labeling Agents for Multiwalled Carbon Nanotubes, **ACS Nano**, v. 4, nº 2, p. 905–912, 2010.
- JIMÉNEZ-ALONSO, S. Electronic and Cytotoxic Properties of 2-Amino-naphtho[2,3-b]furan-4,9-diones. **Journal Organic Chemistry**, v. 76, p. 1634-1643, 2011.
- KADAR, M. et al. Spectrophotometric determination of the dissociation constants of crown ethers with grafted acridone unit in methanol based on Benesi-Hildebrand evaluation, **Spectrochimica Acta Part A**, v 62, p. 1032–1038, 2005.
- KE, W. et al. Enhanced Oral Bioavailability of Doxorubicin in a Dendrimer Drug Delivery System, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v 97, p. 2208-2216, 2008.
- KLEINMAN, M.H. et al. Effect of Protonation and PAMAM Dendrimer Size on the Complexation and Dynamic Mobility of 2-Naphthol, **Journal of Physical Chemistry B**, v 104, p. 11472-11479, 2000.
- KOLHE, P. et al. Drug complexation, in vitro release and cellular entry of dendrimers and hyperbranched polymers, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 259, 143–160, 2003.
- LAMBERTI, M.J. et al. Synergistic enhancement of antitumor effect of β -Lapachone by photodynamic induction of quinone oxidoreductase (NQO1). **Phytomedicine**, v 20, p. 1007– 1012, 2013.
- LEUNER, C.; DRESSMAN, J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.50, p. 47-60, 2000.
- LYRA, M.A.M. et al. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina, **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v 31 (2), p.117-124, 2010.
- MA, W. et al. In situ spectroelectrochemistry and cytotoxic activities of natural ubiquinone analogues. **Tetrahedron**, v. 67, p. 5990-6000, 2011.

- MADAAN, K. et al. Dendrimers in drug delivery and targeting: Drug-dendrimer interactions and toxicity issues, **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v 6, p. 139-150.
- MAEDA, Y. et al. Regio- and Stereoselective Complexation by a Self-Assembled Monolayer of Thiolated Cyclodextrin on a Gold Electrode, **Langmuir**, v. 13, nº 16, p. 4187-4189, 1997.
- MOLFETA, F. A. Planejamento de quinonas com atividade tripanossomicida. **Tese de Doutorado**, São Paulo, 2007.
- MOORE, Z. et al. NAMPT inhibition sensitizes pancreatic adenocarcinoma cells to tumor-selective, PAR-independent metabolic catastrophe and cell death induced by β -lapachone, **Cell Death and Disease**, v 6, e1599, 2015.
- MORENO, E. et al. 1,4-Di-N-oxide quinoxaline-2-carboxamide: Cyclic voltammetry and relationship between electrochemical behavior, structure and anti-tuberculosis activity, **Electrochimica Acta**, v. 56, p. 3270–3275, v. 2011.
- MOURA, M. A. B. F. **Atividade antitumoral de nitroquinona derivada da *nor*- β -lapachona**. Tese de Doutorado, Maceió, 2008.
- MUSTAFA, R. et al. Dendrimer-Functionalized Laponite Nanodisks as a Platform for Anticancer Drug Delivery, **Nanomaterials**, v. 5, p. 1716-1731, 2015.
- NA, M. et al. Dendrimers as potential drug carriers. Part II. Prolonged delivery of ketoprofen by in vitro and in vivo studies, **European Journal of Medicinal Chemistry**, v 41, p. 670–674, 2006.
- PAN, S. et al. Cellular uptake and transfection activity of DNA complexes based on poly(ethylene glycol)-poly-(L-glutamine) copolymer with PAMAM G2. **Journal of Materials Chemistry B**, v 1, p. 5114–5127, 2013.
- PAPAGIANNAROS, A. et al. Doxorubicin–PAMAM dendrimer complex attached to liposomes: Cytotoxic studies against human cancer cell lines, **International Journal of Pharmaceutics**, v 302, p. 29–38, 2005.
- PARK, E.J. et al. β -Lapachone induces programmed necrosis through the RIP1-PARP-AIF-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma SK-Hep1 cells, **Cell Death and Disease**, v 5, e1230, 2014.
- PARK, J.H. et al. Polymeric nanomedicine for cancer therapy. **Progress in Polymer Science**, v 33, p. 113-137, 2008
- POURIANAZAR, N.T.; MUTLU, P.; GUNDUZ, U. Bioapplications of poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers in nanomedicine. **Journal of Nanoparticle Research**, v 16:2342, 2014.
- SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, p. 407-416, 2003.

ROVEDA JÚNIOR, A.C. et al. PAMAM dendrimers functionalized with ruthenium nitrosyl as nitric oxide carriers, **Inorganica Chimica Acta**, v 409, p. 147–155, 2014.

SHARMA, A. et al. Addition of thiols to o-quinone methide: New 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl[1,4]naphthoquinones and their activity against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* (3D7). **European Journal of Medicinal Chemistry**, v 59, p.48–53, 2013.

SILVA, A. M. Síntese de novos naftoimidazóis derivados de β -lapachona e compostos relacionados, empregando irradiação na região de microondas e reagentes suportados, e outras sínteses. **Tese de Doutorado**, 2008.

SIEGEL, D.; YAN, C.; ROSS, D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones, **Biochemical Pharmacology**, v 83 1033–1040, 2012.

SOUZA, A. A. Estudos bioeletroquímicos de nitroquinonas derivadas da *nor*- β -lapachona. **Tese de doutorado**, Maceió, 2011.

Scatchard, G. The attractions of proteins for small molecules and ions. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v 51, p. 660–672, 1949.

TOMALIA, D.A. In quest of a systematic framework for unifying and defining nanoscience, **Journal of Nanoparticle Research**, v 11, p. 1251–1310, 2009.

VASUMATHI, V. et al. Structure of a carbon nanotube–dendrimer composite. **Soft Matter**, v. 9, p. 1372–1380, 2013.

VIJAYARAGHAVAN, G.; STEVENSON, K. J. Synergistic Assembly of Dendrimer-Templated Platinum Catalysts on Nitrogen-Doped Carbon Nanotube Electrodes for Oxygen Reduction, **Langmuir**, v 23, p. 5279-5282, 2007.

WANG, F. et al. Modulating β -Lapachone Release from Polymer Millirods through Cyclodextrin Complexation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v 95, p. 2309-2319, 2006

WANG, R.; YU, Z. Validity and Reliability of BenesiHildebrand Method, **Acta PhysicoChimica Sinica**, v 23, p. 1353-1359, 2007.

WANG, Y. et al. The electrochemical reduction of 1,4-benzoquinone in 1-ethyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethane-sulfonyl)-imide, [C₂mim][NTf₂]: A voltammetric study of the comproportionation between benzoquinone and the benzoquinone dianion. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 648, p. 134-142, 2010.

WU, M-S. et al. Novel “signal-on” electrochemiluminescence biosensor for the detection of PSA based on resonance energy transfer, **Talanta**, v 161, p. 271–277, 2016.

XU, L. et al. Biosensor Based on Self-Assembling Glucose Oxidase and Dendrimer-Encapsulated Pt Nanoparticles on Carbon Nanotubes for Glucose Detection, **Electroanalysis**, v 19, n^o. 6, p. 717 – 722, 2007.

ZHANG, Y. et al. An electrochemical paracetamol sensor based on layer-by-layer covalent attachment of MWCNTs and a G4.0 PAMAM modified GCE, **Analtical. Methods**, v 8, p. 2218-225, 2016

ZHU, X. et al. Label-free electrochemical detection of Avian Influenza Virus genotype utilizing multi-walled carbon nanotubes–cobalt phthalocyanine–PAMAM nanocomposite modified glassy carbon electrode. **Electrochemistry Communications**, v 11, 1543–1546, 2009.