



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

**CAMILA CALADO DE VASCONCELOS**

**ESTUDOS BIOELETROQUÍMICOS DE COMPOSTOS**  
**BIOLOGICAMENTE ATIVOS: DERIVADOS DA**  
 **$\beta$ -LAPACHONA E ÁCIDO ÚSNICO**

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

**CAMILA CALADO DE VASCONCELOS**

**ESTUDOS BIOELETROQUÍMICOS DE COMPOSTOS  
BIOLOGICAMENTE ATIVOS: DERIVADOS DA  
 $\beta$ -LAPACHONA E ÁCIDO ÚSNICO**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiane Caxico de Abreu Galdino

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

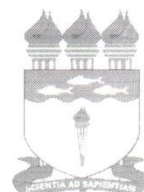
**Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale**

- V331e Vasconcelos, Camila Calado de.  
Estudos bioeletroquímicos de compostos biologicamente ativos: derivados da  $\beta$ -lapachona e ácido úsnico / Camila Calado de Vasconcelos. – 2011.  
98 f. : il. tabs., grafs.
- Orientadora: Fabiane Caxico de Abreu Galdino.  
Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2011.
- Bibliografia: f. 93-98.
1. Eletroquímica. 2.  $\beta$ -lapachona e derivados. 3. Ácido úsnico. 4. Ciclodextrinas.  
I. Título.

CDU: 544.



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



BR 104 Km14, Campus A. C. Simão  
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins  
57072-970, Maceió-AL, Bras  
Fone: (82) 3214-1384, Fax (82) 3214-138  
email: cpgqb@qui.ufal.br

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de **Camila Calado de Vasconcelos**, intitulada: **“Estudos Bioeletroquímicos de Compostos Biologicamente Ativos: Derivados da  $\beta$ -Lapachona e Ácido Úsnico”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 27 de janeiro de 2011, às 9h na Sala de Aulas do PPGQB/UFAL.

**COMISSÃO JULGADORA**

*Fabiane Caxico de Abreu Galdino*

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabiane Caxico de Abreu Galdino  
Orientadora – PPGQB/IQB/UFAL.

*Marília Oliveira Fonseca Goulart*

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marília Oliveira Fonseca Goulart  
PPGQB/IQB/UFAL

*Josué Carinhonha Caldas Santos*

Prof. Dr. Josué Carinhonha Caldas Santos  
IQB/UFAL

*“Ninguém conhece os mistérios da vida nem o seu sentido definitivo, no entanto, para aqueles que desejarem acreditar em seus sonhos e em si mesmo, a vida é uma dádiva preciosa na qual tudo é possível...”*

**(Legrand)**

*Aos meus queridos pais, Benedito  
Carlos e Maria Dolores, pelo carinho e  
apoio sempre concedidos.*

## **Agradecimentos**

*A Deus, pela dádiva da vida, proteção e amor incondicional.*

*Aos meus pais, irmãos, avôs, tios, primos, e amigos, por acreditarem no meu sonho e na minha capacidade.*

*A minha sobrinha, Maria Clara, alegria de cada despertar.*

*Ao meu namorado, Gustavo Correia, pelo carinho, paciência, apoio e compreensão.*

*A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Fabiane Caxico, pelo incentivo, conhecimentos transmitidos e por mostrar que nada é impossível quando se tem dedicação e força de vontade.*

*A Prof<sup>a</sup>. Dra. Marília Goulart, pelo acolhimento no grupo de Eletroquímica, ensinamentos e oportunidades concedidas.*

*Ao Prof. Dr. Vitor Ferreira da Universidade Federal Fluminense, pelo envio das amostras dos derivados sintéticos da  $\beta$ -lapachona.*

*Aos professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, pela execução dos testes de citotoxicidade.*

*Ao doutorando Diogo Lúcio da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco, pelo envio da amostra de ácido úsnico.*

*A todos do laboratório de Eletroquímica que, de forma direta ou indireta, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, em especial ao Antônio, Adilson, Erivaldo, Fabricia, Manu e Waldo pelas frutíferas discussões, amizade e momentos de descontração.*

*Aos colegas do programa de pós-graduação do IQB pelas trocas de experiências vivenciadas durante as disciplinas, em especial a Robertinha, pelas valiosas informações acrescidas ao meu trabalho.*

*A Cibele, Gleide, Michelle, Patrícia, Sol, Theo, Walleska e Willians, pela amizade e incentivo.*

*A CAPES e a FAPEAL, pelos auxílios concedidos.*

## RESUMO

Os derivados sintéticos da  $\beta$ -lapachona e do Ácido Úsnico despertam interesse por serem substâncias biologicamente ativas e, portanto, o presente trabalho teve como objetivo buscar subsídios que permitam sugerir um mecanismo biológico de ação. Ensaios eletroquímicos dos compostos supracitados foram realizados em diferentes meios, aprótico e prótico, bem como com alvos biológicos relevantes, neste caso o DNA, e também ensaios com oxigênio molecular, uma vez que um mecanismo envolvendo ciclagem redox com oxigênio após processo de redução é amplamente relatado para a atividade de quinonas. Uma característica físico-química apresentada pelos compostos referidos é baixa solubilidade em meio aquoso, algo que interfere na ação farmacológica. Assim, foram realizados estudos com ciclodextrina, um oligossacarídeo glicosídico, para averiguar a possibilidade de formação de complexo de inclusão, o que resultaria no aumento da solubilidade dos mesmos. O comportamento voltamétrico dos derivados da  $\beta$ -lapachona foi comparado e observou-se que mudanças de substituinte não afetaram o processo de redução. Os compostos da série LAUSEST apresentaram características semelhantes ao comportamento de quinonas em meio aprótico e prótico, além de demonstrar, assim como seu precursor, a  $\beta$ -lapachona, reatividade com o oxigênio molecular, sugerindo que a atividade citotóxica pode estar relacionada à formação de ERO. A interação dos compostos com  $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD em solução, observada por voltametria cíclica mostrou que na presença dessas moléculas hospedeiras, ocorreram mudanças no perfil voltamétrico de cada substância, sugerindo aumento de solubilidade. Além disso, constatou-se uma possível utilização do eletrodo modificado com SAM mista de  $\beta$ -CD-SH-Au + MUA, como sensor para determinação de  $\beta$ -lapachona em análises clínicas e na etapa de controle de qualidade. Estudos com ssDNA demonstraram a presença de interação das substâncias analisadas com as bases guanina e adenina. No entanto, estudos com biossensor de dsDNA não apresentaram interação, implicando em um provável mecanismo de ação biológico relacionado à alquilação do DNA, destacando-se a importância das técnicas voltamétricas para análises biológicas.

**Palavras chave:**  $\beta$ -lapachona e derivados, Ácido Úsnico, Ciclodextrinas, Eletroquímica.

## ABSTRACT

Synthetic derivatives of  $\beta$ -lapachone and usnic acid are of particular interest as biologically active substances. This study aims to seek information that suggest a biological mechanism of action. Electrochemical experiments of the compounds mentioned above were performed in different conditions, protic and aprotic media, as well as with relevant biological targets. In this case, DNA and experiments with molecular oxygen were performed since a mechanism involving redox cycling with oxygen after the reduction process is widely activity reported for quinones. A physical-chemical characteristic displayed by these compounds is low solubility in water, something very relevant to pharmacological action. Thus, studies were performed with cyclodextrin, an oligosaccharide glycoside to investigate the possibility of formation of inclusion complex, resulting in increased solubility of the same. The voltammetric behavior of the four derivatives of  $\beta$ -lapachone were compared and showed that changes in substituent did not affect the reduction process. The compounds of the series LAUSEST had similar characteristics to the behavior of quinones in protic and aprotic media, and showed, like its precursor,  $\beta$ -lapachone, reactivity with oxygen, suggesting that cytotoxic activity may be related to ROS. The interaction of compounds with  $\beta$ -CD and HP- $\beta$ -CD in solution, observed by cyclic voltammetry showed that the presence of these host molecules, demonstrated changes in the voltammetric profile of each substance, suggesting an increase of solubility. Moreover, there was a possible use of the modified electrode with SAM mixed  $\beta$ -CD-SH-Au + MUA, as a sensor for determination of  $\beta$ -lapachone in clinical analysis and quality control step. Studies with ssDNA showed the presence of interaction of analytes with the bases guanine and adenine. However, studies with dsDNA biosensor showed no interaction, implying a likely biological mechanism of action related to alkylation of DNA, emphasizing the importance of voltammetric techniques for biological analysis.

**Keywords:** derivatives of  $\beta$ -lapachone, Usnic acid, Cyclodextrin, Electrochemistry.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura química da $\beta$ -lapachona e seus derivados sintéticos (LAUSEST-B, LAUSEST-CLB, LAUSEST-FB e LAUSEST-AMe) e Ácido Úsnico. ....	17
<b>Figura 2.</b> Redução de quinonas (Q) via 1 e 2 elétrons, gerando semiquinonas (Q <sup>•</sup> ) e hidroquinonas (QH <sub>2</sub> ), respectivamente. ....	19
<b>Figura 3.</b> Esquema quadrado representativo da oxirredução de quinonas em vários meios [adaptado de JACQ, 1967]. ....	20
<b>Figura 4.</b> Mecanismos gerais de ação biológica de quinonas [adaptado de MONKES <i>et al.</i> , 1992]. ....	21
<b>Figura 5.</b> Atuação de quinonas na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e destoxificação, pelo emprego de catalase e superóxido-dismutase (SOD). ....	22
<b>Figura 6.</b> (a) Estrutura funcional da $\beta$ -ciclodextrina [BUDAL, 2003]. (b) Estrutura química da $\beta$ -ciclodextrina. ....	27
<b>Figura 7.</b> Esquema sintético de per-7-tio- $\beta$ -ciclodextrina. ....	37
<b>Figura 8.</b> Voltamogramas cíclicos dos compostos da série LAUSEST em DMF/TBAP (0,1 mol L <sup>-1</sup> ); [LAUSET] = 1,0 mmol L <sup>-1</sup> ; Eletrodo de CV. $\nu$ = 100 mV s <sup>-1</sup> . ....	42
<b>Figura 9.</b> (a) e (b) Voltamogramas cíclicos de LAUSEST-B em função da velocidade de varredura. (c) e (d) gráfico de $i_{pc}$ vs. $\nu$ ; (e) e (f) gráfico de $i_{pc}$ vs. $\nu^{1/2}$ ; (g) e (h) gráfico de $E_{pc}$ vs. log $\nu$ . [LAUSEST-B] = 1,0 mmol L <sup>-1</sup> em DMF/TPAP (0,1 mol L <sup>-1</sup> ); eletrodo de CV. ....	43
<b>Figura 10.</b> (a) e (b) Voltamogramas cíclicos de LAUSEST-CLB em função da velocidade de varredura. (c) e (d) gráfico de $i_{pc}$ vs. $\nu$ ; (e) e (f) gráfico de $i_{pc}$ vs. $\nu^{1/2}$ ; (g) e (h) gráfico de $E_{pc}$ vs. log $\nu$ . [LAUSEST-CLB] = 1,0 mmol L <sup>-1</sup> em DMF/TPAP (0,1 mol L <sup>-1</sup> ); eletrodo de CV. ....	44
<b>Figura 11.</b> (a) e (b) Voltamogramas cíclicos de LAUSEST-FB em função da velocidade de varredura. (c) e (d) gráfico de $i_{pc}$ vs. $\nu$ ; (e) e (f) gráfico de $i_{pc}$ vs. $\nu^{1/2}$ ; (g) e (h) gráfico de $E_{pc}$ vs. log $\nu$ . [LAUSEST-FB] = 1,0 mmol L <sup>-1</sup> em DMF/TPAP (0,1 mol L <sup>-1</sup> ); eletrodo de CV. ....	45
<b>Figura 12.</b> (a) e (b) Voltamogramas cíclicos de LAUSEST-AMe em função da velocidade de varredura. (c) e (d) gráfico de $i_{pc}$ vs. $\nu$ ; (e) e (f) gráfico de $i_{pc}$ vs. $\nu^{1/2}$ ; (g) e (h) gráfico de $E_{pc}$ vs. log $\nu$ . [LAUSEST-AMe] = 1,0 mmol L <sup>-1</sup> em DMF/TPAP (0,1 mol L <sup>-1</sup> ); eletrodo de CV. ....	46
<b>Figura 13.</b> Voltamogramas de Pulso Diferencial (VPD) dos compostos da série LAUSEST. [LAUSEST] = 1,0 mmol L <sup>-1</sup> em DMF/TPAP (0,1 mol L <sup>-1</sup> ); eletrodo de CV; $\nu$ = 15 mV s <sup>-1</sup> . ....	50
<b>Figura 14.</b> Voltamogramas cíclicos dos compostos da série LAUSEST em tampão fosfato 0,2 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,0, 30% (v/v) de EtOH; [LAUSEST] = 0,05 mmol L <sup>-1</sup> ; Eletrodo de CV. $\nu$ = 50 mV s <sup>-1</sup> . ....	52
<b>Figura 15.</b> (a) Voltamogramas cíclicos de LAUSEST-B. (b) gráfico de $i_{pc}$ vs. $\nu$ ; (c) gráfico de $i_{pc}$ vs. $\nu^{1/2}$ ; (d) gráfico de $E_{pc}$ vs. log $\nu$ . [LAUSEST-B] = 0,05 mmol L <sup>-1</sup> . Tampão fosfato 0,2 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,0, 30% (v/v) de EtOH; eletrodo de CV. ....	53

<b>Figura 16.</b> (a) Voltamogramas cíclicos de LAUSEST-CLB. (b) gráfico de $i_p$ vs. $v$ ; (c) gráfico de $i_p$ vs. $v^{1/2}$ ; (d) gráfico de $E_p$ vs. $\log v$ . [LAUSEST-CLB] = 0,05 mmol L <sup>-1</sup> . Tampão fosfato 0,2 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,0, 30% (v/v) de EtOH; eletrodo de CV.....	54
<b>Figura 17.</b> (a) Voltamogramas cíclicos de LAUSEST-FB. (b) gráfico de $i_p$ vs. $v$ ; (c) gráfico de $i_p$ vs. $v^{1/2}$ ; (d) gráfico de $E_p$ vs. $\log v$ . [LAUSEST-FB] = 0,05 mmol L <sup>-1</sup> . Tampão fosfato 0,2 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,0, 30% (v/v) de EtOH; eletrodo de CV.....	55
<b>Figura 18.</b> (a) Voltamogramas cíclicos de LAUSEST-AMe. (b) gráfico de $i_p$ vs. $v$ ; (c) gráfico de $i_p$ vs. $v^{1/2}$ ; (d) gráfico de $E_p$ vs. $\log v$ . [LAUSEST-AMe] = 0,05 mmol L <sup>-1</sup> . Tampão fosfato 0,2 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,0, 30% (v/v) de EtOH; eletrodo de CV.....	56
<b>Figura 19.</b> (a) Voltamogramas cíclicos de $\beta$ -lapachona na presença de oxigênio. (b) $i_{pc}$ vs. [O <sub>2</sub> ]; (c) $i_p/i_{p0}$ vs. [O <sub>2</sub> ]; (d) $E_{pc}$ vs. [O <sub>2</sub> ]; [ $\beta$ -lapachona] = 0,05 mmol L <sup>-1</sup> . Tampão fosfato 0,2 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,0, 30% (v/v) de EtOH; eletrodo de CV; $v = 0,50$ V s <sup>-1</sup> .....	61
<b>Figura 20.</b> (a) Voltamogramas cíclicos de LAUSEST-B na presença de oxigênio. (b) $i_{pc}$ vs. [O <sub>2</sub> ]; (c) $i_p/i_{p0}$ vs. [O <sub>2</sub> ]; (d) $E_{pc}$ vs. [O <sub>2</sub> ]; [LAUSEST-B] = 0,05 mmol L <sup>-1</sup> . Tampão fosfato 0,2 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,0, 30% (v/v) de EtOH; eletrodo de CV; $v = 0,50$ V s <sup>-1</sup> .....	62
<b>Figura 21.</b> (a) Voltamogramas cíclicos de LAUSEST-CLB na presença de oxigênio. (b) $i_{pc}$ vs. [O <sub>2</sub> ]; (c) $i_p/i_{p0}$ vs. [O <sub>2</sub> ]; (d) $E_{pc}$ vs. [O <sub>2</sub> ]; [LAUSEST-CLB] = 0,05 mmol L <sup>-1</sup> . Tampão fosfato 0,2 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,0, 30% (v/v) de EtOH; eletrodo de CV; $v = 0,50$ V s <sup>-1</sup> .....	63
<b>Figura 22.</b> (a) Voltamogramas cíclicos de LAUSEST-FB na presença de oxigênio. (b) $i_{pc}$ vs. [O <sub>2</sub> ]; (c) $i_p/i_{p0}$ vs. [O <sub>2</sub> ]; (d) $E_{pc}$ vs. [O <sub>2</sub> ]; [LAUSEST-FB] = 0,05 mmol L <sup>-1</sup> . Tampão fosfato 0,2 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,0, 30% (v/v) de EtOH; eletrodo de CV; $v = 0,50$ V s <sup>-1</sup> .....	64
<b>Figura 23.</b> (a) Voltamogramas cíclicos de LAUSEST-AMe na presença de oxigênio. (b) $i_{pc}$ vs. [O <sub>2</sub> ]; (c) $i_p/i_{p0}$ vs. [O <sub>2</sub> ]; (d) $E_{pc}$ vs. [O <sub>2</sub> ]; [LAUSEST-AMe] = 0,05 mmol L <sup>-1</sup> . Tampão fosfato 0,2 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,0, 30% (v/v) de EtOH; eletrodo de CV; $v = 0,50$ V s <sup>-1</sup> .....	65
<b>Figura 24.</b> (a, c, e, g) Voltamogramas cíclicos da série LAUSEST (0,5 mmol L <sup>-1</sup> ) em eletrodo de carbono vítreo e adição de $\beta$ -CD sólida nas concentrações de 0,05 mmol L <sup>-1</sup> , 0,5 mol L <sup>-1</sup> e 5 mmol L <sup>-1</sup> . (b, d, f, h) Gráfico de $-i_{pc}$ vs. [ $\beta$ -CD]. Tampão fosfato pH 7; $v = 0,05$ Vs <sup>-1</sup> .....	70
<b>Figura 25.</b> (a, c, e, g) Voltamogramas cíclicos da série LAUSEST (0,5 mmol L <sup>-1</sup> ) em eletrodo de carbono vítreo e adição de HP- $\beta$ -CD sólida nas concentrações de 0,05 mmol L <sup>-1</sup> , 0,5 mol L <sup>-1</sup> e 5 mmol L <sup>-1</sup> . (b, d, f, h) Gráfico de $-i_{pc}$ vs. [HP- $\beta$ -CD]. Tampão fosfato pH 7; $v = 0,05$ Vs <sup>-1</sup> .....	72
<b>Figura 26.</b> Voltamogramas cíclicos da $\beta$ -lapachona em eletrodo de ouro (Au). Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,2 mol L <sup>-1</sup> e $v = 0,01$ V s <sup>-1</sup> .....	73
<b>Figura 27.</b> (a) Voltamogramas cíclicos para K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ], Fc-CO <sub>2</sub> H e $\beta$ -lapachona em Au modificado com $\beta$ -CDSH + MUA. (b) Voltamogramas cíclicos do efeito da concentração da $\beta$ -lapachona ( $\beta$ -LPC) em SAM de $\beta$ -CDSH + MUA; (c) Efeito catalítico da $\beta$ -lapachona, na presença de oxigênio, em SAM de $\beta$ -CDSH + MUA. Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,2 mol L <sup>-1</sup> ; $v = 0,01$ V s <sup>-1</sup> .....	74

<b>Figura 28.</b> Voltamogramas de Pulso Diferencial (VPD) dos compostos da série LAUSEST em solução etanólica (30% v/v) de ssDNA em tampão acetato pH 4,5. [LAUSEST] = 0,05 mmol L <sup>-1</sup> ; eletrodo de CV; $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$ .	76
<b>Figura 29.</b> Voltamogramas de Pulso Diferencial (VPD) dos compostos da série LAUSEST em solução etanólica (30% v/v) de ssDNA em tampão acetato pH 4,5 após acondicionamento em -0,28 V durante 120 s. [LAUSEST] = 0,05 mmol L <sup>-1</sup> ; eletrodo de CV; $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$ .	77
<b>Figura 30.</b> Voltamogramas de Pulso Diferencial (VPD) dos compostos da série LAUSEST em biossensor de dsDNA em solução etanólica (30% v/v) tamponada (tampão acetato pH 4,5). [LAUSEST] = 0,05 mmol L <sup>-1</sup> ; eletrodo de CV; $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$ .	78
<b>Figura 31.</b> Voltamogramas cíclicos do Ácido Úsnico a 100 mV s <sup>-1</sup> . [AU] = 1,0 mmol L <sup>-1</sup> em DMF/TPAP (0,1 mol L <sup>-1</sup> ); eletrodo de CV.	79
<b>Figura 32.</b> (a) e (b) Voltamogramas cíclicos do Ácido Úsnico em função da velocidade de varredura. (c) gráfico de $i_{p_{cl}}$ vs. $\nu$ ; (d) gráfico de $i_{p_{cl}}$ vs. $\nu^{1/2}$ ; (e) gráfico de $E_{p_{cl}}$ vs. $\log \nu$ . [AU] = 1,0 mmol L <sup>-1</sup> em DMF/TPAP (0,1 mol L <sup>-1</sup> ); eletrodo de CV.	80
<b>Figura 33.</b> (a) e (b) Voltamogramas cíclicos do Ácido Úsnico em função da velocidade de varredura. (c) gráfico de $i_{p_{al}}$ vs. $\nu$ ; (d) gráfico de $i_{p_{al}}$ vs. $\nu^{1/2}$ ; (e) gráfico de $E_{p_{al}}$ vs. $\log \nu$ . [AU] = 1,0 mmol L <sup>-1</sup> em DMF/TPAP (0,1 mol L <sup>-1</sup> ); eletrodo de CV.	82
<b>Figura 34.</b> Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) redutiva (a) e oxidativa (b) do Ácido Úsnico (1,0 mmol L <sup>-1</sup> ) em DMF/TBAP (0,1 mol L <sup>-1</sup> ). Eletrodo de CV; $\nu = 0,01 \text{ V s}^{-1}$ .	83
<b>Figura 35.</b> (a) Voltamogramas cíclicos do Ácido Úsnico em função da velocidade de varredura; (b) gráfico de $i_{pa}$ vs. $\nu$ ; (c) gráfico de $i_{pa}$ vs. $\nu^{1/2}$ ; (d) gráfico de $E_{pa}$ vs. $\log \nu$ . [Ácido Úsnico] = $3,67 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Tampão fosfato 0,2 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,0 (30% de EtOH); eletrodo de CV.	84
<b>Figura 36.</b> (a) Voltamogramas de pulso diferencial da dependência do potencial de oxidação do Ácido Úsnico em função do pH; (b) curva de $E_{pa}$ vs. pH do AU; (c) curva de $i_{pa}$ vs. pH do AU. [AU] = $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , 20% EtOH, eletrodo de CV.	86
<b>Figura 37.</b> (a) Voltamogramas cíclicos do Ácido Úsnico (0,5 mmol L <sup>-1</sup> ) em eletrodo de carbono vítreo e adição de $\beta$ -CD sólida nas concentrações de 0,05 mmol L <sup>-1</sup> , 0,5 mol L <sup>-1</sup> e 5 mmol L <sup>-1</sup> . (b) Gráfico de $i_{pc}$ vs. [ $\beta$ -CD]. Tampão fosfato pH 7; $\nu = 0,05 \text{ Vs}^{-1}$ .	88
<b>Figura 38.</b> (a) Voltamogramas cíclicos do Ácido Úsnico (0,5 mmol L <sup>-1</sup> ) em eletrodo de carbono vítreo e adição de HP- $\beta$ -CD sólida nas concentrações de 0,05 mmol L <sup>-1</sup> , 0,5 mol L <sup>-1</sup> e 5 mmol L <sup>-1</sup> . (b) Gráfico de $i_{pc}$ vs. [HP- $\beta$ -CD]. Tampão fosfato pH 7; $\nu = 0,05 \text{ Vs}^{-1}$ .	88
<b>Figura 39.</b> Voltamogramas de Pulso Diferencial (VPD) do Ácido Úsnico em solução etanólica (30% v/v) de ssDNA em tampão acetato pH 4,5. [Ácido Úsnico] = 0,05 mmol L <sup>-1</sup> ; eletrodo de CV; $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$ .	89

**Figura 40.** Voltamogramas de Pulso Diferencial (VPD) do Ácido Úsnico em biossensor de *dsDNA* em solução etanólica (30% v/v) tamponada (tampão acetato pH 4,5). [Ácido Úsnico] = 0,05 mmol L<sup>-1</sup>; eletrodo de CV;  $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$  .....90

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Soluções Tampões para eletrólito suporte.....	35
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros eletroquímicos obtidos para LAUSEST-B em meio aprótico. Estudo em função da velocidade de varredura. $E_{pc}$ vs. $Ag AgCl Cl^-$ (sat.).....	47
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros eletroquímicos obtidos para LAUSEST-CLB em meio aprótico. Estudo em função da velocidade de varredura. $E_{pc}$ vs. $Ag AgCl Cl^-$ (sat.).....	47
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros eletroquímicos obtidos para LAUSEST-FB em meio aprótico. Estudo em função da velocidade de varredura. $E_{pc}$ vs. $Ag AgCl Cl^-$ (sat.).....	48
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros eletroquímicos obtidos para LAUSEST-AMe em meio aprótico. Estudo em função da velocidade de varredura. $E_{pc}$ vs. $Ag AgCl Cl^-$ (sat.).....	48
<b>Tabela 6.</b> Coeficiente de difusão da série LAUSEST em meio aprótico.....	51
<b>Tabela 7.</b> Parâmetros eletroquímicos obtidos para LAUSEST-B em meio prótico. Estudo em função da velocidade de varredura. $E_{pc}$ vs. $Ag AgCl Cl^-$ (sat.).....	57
<b>Tabela 8.</b> Parâmetros eletroquímicos obtidos para LAUSEST-CLB em meio prótico. Estudo em função da velocidade de varredura. $E_{pc}$ vs. $Ag AgCl Cl^-$ (sat.).....	57
<b>Tabela 9.</b> Parâmetros eletroquímicos obtidos para LAUSEST-FB em meio prótico. Estudo em função da velocidade de varredura. $E_{pc}$ vs. $Ag AgCl Cl^-$ (sat.).....	58
<b>Tabela 10.</b> Parâmetros eletroquímicos obtidos para LAUSEST-AMe em meio prótico. Estudo em função da velocidade de varredura. $E_{pc}$ vs. $Ag AgCl Cl^-$ (sat.).....	58
<b>Tabela 11.</b> Coeficiente de difusão da série LAUSEST em meio prótico.....	59
<b>Tabela 12.</b> Parâmetros eletroquímicos referentes à reatividade da $\beta$ -lapachona com o oxigênio.....	61
<b>Tabela 13.</b> Parâmetros eletroquímicos referentes à reatividade de LAUSEST-B com o oxigênio.....	62
<b>Tabela 14.</b> Parâmetros eletroquímicos referentes à reatividade de LAUSEST-CLB com o oxigênio.....	63
<b>Tabela 15.</b> Parâmetros eletroquímicos referentes à reatividade de LAUSEST-FB com o oxigênio.....	64
<b>Tabela 16.</b> Parâmetros eletroquímicos referentes à reatividade de LAUSEST-AMe com o oxigênio.....	65
<b>Tabela 17.</b> Constante catalítica da $\beta$ -lapachona e seus análogos ( $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ) na presença de oxigênio em meio prótico. Tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0, 30% (v/v) de EtOH; eletrodo de CV; $\nu = 0,50 \text{ V s}^{-1}$ .....	66
<b>Tabela 18.</b> Atividade citotóxica da série LAUSEST, expressa em $CI_{50}$ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) dos compostos em relação às linhagens de células de câncer.....	67
<b>Tabela 19.</b> Parâmetros eletroquímicos obtidos a partir da VC redutiva do Ácido Úsnico. Estudo em função da velocidade de varredura. $E_{pc}$ vs. $Ag AgCl Cl^-$ (sat.).....	81

<b>Tabela 20.</b> Parâmetros eletroquímicos obtidos a partir da VC oxidativa do Ácido Úsnico. Estudo em função da velocidade de varredura. <i>Epa</i> vs. $\text{Ag} \text{AgCl} \text{Cl}^-$ (sat.).....	83
<b>Tabela 21.</b> Parâmetros eletroquímicos obtidos para o Ácido Úsnico. Estudo em função da velocidade de varredura. <i>Epa</i> vs. $\text{Ag} \text{AgCl} \text{Cl}^-$ (sat.).....	85
<b>Tabela 22.</b> Parâmetros eletroquímicos obtidos para o Ácido Úsnico. Estudo em função da variação do pH. <i>Epa</i> vs. $\text{Ag} \text{AgCl} \text{Cl}^-$ (sat.).....	87

## SIGLAS, ABREVIATURAS E UNIDADES

$\nu$  = Velocidade de varredura de potencial

$\nu^{1/2}$  = Raiz quadrada da velocidade de varredura

$\Delta E$  = Altura do salto de potencial

RMN  $^1\text{H}$  = ressonância magnética nuclear de hidrogênio

A = Ampère

CD = Ciclodextrina

CV = Carbono Vítreo

DNA = Ácido desoxirribonucléico

dsDNA = Ácido desoxirribonucléico em fita dupla (ou dupla hélice)

$E_{\text{redox}}$  = Potencial redox

$E_{1/2}$  = Potencial de meia-onda

EO = Estresse Oxidativo

$E_{\text{p}_a}$  = Potencial de pico anódico

$E_{\text{p}_c}$  = Potencial de pico catódico

ERO = Espécies reativas de oxigênio

ESC = Eletrodo Saturado de Calomelano

$I$  = Corrente

$I_{\text{p}_a}$  = Corrente de pico anódica

$I_{\text{p}_c}$  = Corrente de pico catódica

MM = Massa molecular

$n$  = Número de elétrons

P.A. = Para análise

pH = Potencial hidrogeniônico

$\text{p}K_a$  = O inverso,  $\log 1/K_a$  do logaritmo da constante de acidez,  $K_a$

ssDNA = Ácido desoxirribonucléico em fita simples (ou simples hélice)

TBAP = Perclorato de Tetrabutylamônio

TR = Transferência de elétrons

$v/v$  = Volume por volume

VC = Voltametria cíclica

VPD = Voltametria de Pulso Diferencial

$\mu\text{A}$  = Microampère

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	16
<b>1.1 QUINONAS</b>	18
<b>1.2 QUINONAS COMO CICLADORES REDOX</b>	21
<b>1.3 B-LAPACHONA E SEUS DERIVADOS</b>	24
<b>1.4 ÁCIDO ÚSNICO</b>	25
<b>1.5 CICLODEXTRINAS</b>	26
<b>1.6 BIOSSENSOR DE DNA</b>	28
<b>2 OBJETIVOS</b>	31
<b>2.1 OBJETIVO GERAL</b>	31
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	31
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	32
<b>3.1 PRODUTOS QUÍMICOS E SOLVENTES</b>	32
<b>3.2 ESTUDOS ELETROQUÍMICOS</b>	32
3.2.1 Limpeza Padrão dos Eletrodos de Carbono Vítreo e Ouro	33
3.2.2 Meio Aprótico	33
3.2.3 Meio Prótico	34
3.2.3.1 Reatividade da Série LAUSEST Frente ao Oxigênio	35
3.2.3.2 Interação da Série LAUSEST e do Ácido Úsnico com $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD em Solução	36
3.2.3.3 Determinação da $\beta$ -lapachona em Eletrodo de Ouro Modificado com SAM Mista de $\beta$ -CD-SH + MUA	36
3.2.3.4 Estudo de Interação com ssDNA	38
3.2.3.5 Estudo com Biossensor de dsDNA	38
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	40
<b>4.1 ESTUDOS ELETROQUÍMICOS DOS COMPOSTOS DA SÉRIE LAUSEST</b>	40
4.1.1 Meio Aprótico	40
4.1.2 Meio Prótico	51
4.1.2.1 Reatividade da Série LAUSEST Frente ao Oxigênio	59
4.1.2.2 Comportamento Eletroquímico da Série LAUSEST Frente à $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD	67



4.1.2.3 Comportamento Eletroquímico da $\beta$ -lapachona em SAM Mista de $\beta$ -CD-SH-Au + MUA.....	73
4.1.2.4 Estudo de Interação com ssDNA.....	75
4.1.2.5 Estudo com Biossensor de dsDNA.....	77
<b>4.2 ESTUDO ELETROQUÍMICO DO ÁCIDO ÚSNICO .....</b>	<b>78</b>
4.2.1 Meio Aprótico .....	78
4.2.2 Meio Prótico .....	83
4.2.2.1 Comportamento Eletroquímico do Ácido Úsnico Frente à $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD .....	87
4.2.2.2 Estudo de Interação com ssDNA.....	89
4.2.2.3 Estudo com Biossensor de dsDNA.....	89
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>91</b>
<b>6 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>92</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>93</b>

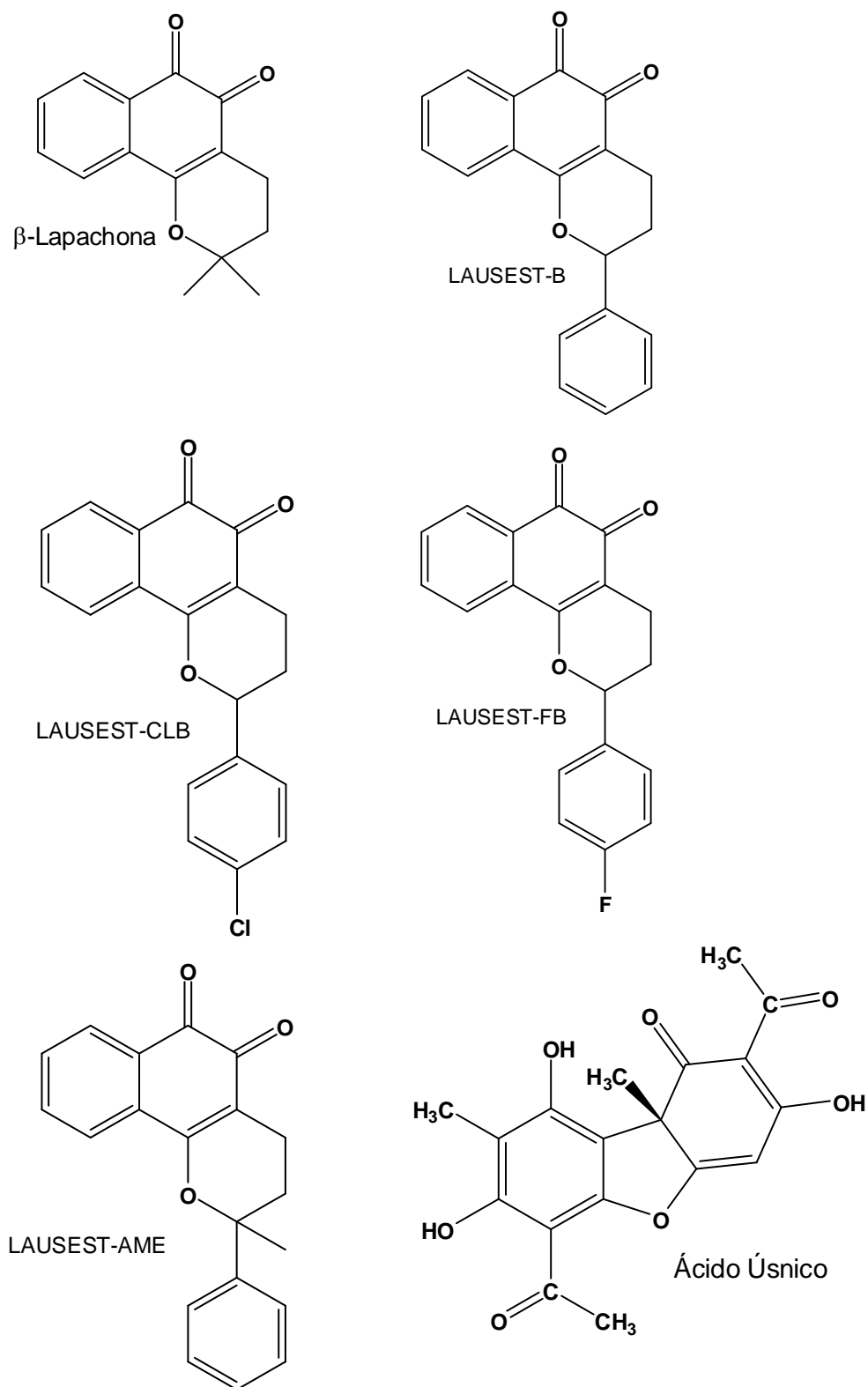
## 1 INTRODUÇÃO

Os avanços da Química, Farmacologia e Biologia Molecular, a partir de meados do século XX, aliados à introdução de novos ensaios bioquímicos, conduziram ao desenvolvimento da Química Medicinal, com o planejamento racional de fármacos baseado na abordagem fisiológica. Gradativamente, os produtos sintéticos ganharam posição de destaque no arsenal terapêutico, no entanto, os produtos naturais continuaram apresentando interesse como fonte de novas substâncias bioativas.

Muitos dos mais importantes processos fisiológicos são baseados em cadeias oxirredutivas, envolvendo numerosas reações catalisadas por enzimas. Existe um conjunto de similaridades entre as reações biológicas e eletroquímicas, em se tratando de processos de transferência eletrônica: a natureza heterogênea (interface solução-eletrodo, enzima-solução); em ambientes de natureza hidrofílica e hidrofóbica à temperatura similar, assim como uma orientação específica dos substratos, sendo a eletroquímica uma técnica padrão para o estudo das reações redox, sendo fornecido pela literatura um farto material sobre o uso de técnicas eletroquímicas com aplicações biológicas [DRYHURST, 1977].

Os potenciais de redução ou oxidação de algumas substâncias, obtidos por meio de técnicas eletroquímicas, podem fornecer informações sobre a viabilidade dos processos de transferência de elétrons (TE) *in vivo* ou *in vitro*. Correlações já divulgadas na literatura entre  $E_{p_c}$  (potencial de pico catódico),  $E_{1/2}$  (potencial a meia altura de onda) ou  $E_{redox}$  (potencial redox) e atividades biológicas [DE ABREU *et al.*, 2002a] demonstram a relevância de estudos eletroquímicos como ferramentas úteis para colaborar com uma possível elucidação do mecanismo de ação de fármacos e no planejamento de compostos biologicamente ativos.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo buscar subsídios nos ensaios eletroquímicos que permitam sugerir um provável mecanismo biológico de ação para os derivados sintéticos da  $\beta$ -lapachona (LAUSEST-B, LAUSEST-FB, LAUSEST-CLB e LAUSEST-AMe) e do Ácido Úsnico (Figura 1), compostos que apresentam potencial farmacológico.



**Figura 1.** Estruturas químicas da  $\beta$ -lapachona e seus derivados sintéticos (LAUSEST-B, LAUSEST-CLB, LAUSEST-FB e LAUSEST-AMe) e Ácido Úsnico.

## 1.1 Quinonas

As quinonas representam uma ampla e variada família de metabólitos secundários de distribuição natural e de grande interesse na área farmacológica não só devido à sua importância nos processos bioquímicos vitais, como também pela variedade de atividades biológicas que a maioria dessas substâncias apresenta [SILVA *et al.*, 2003].

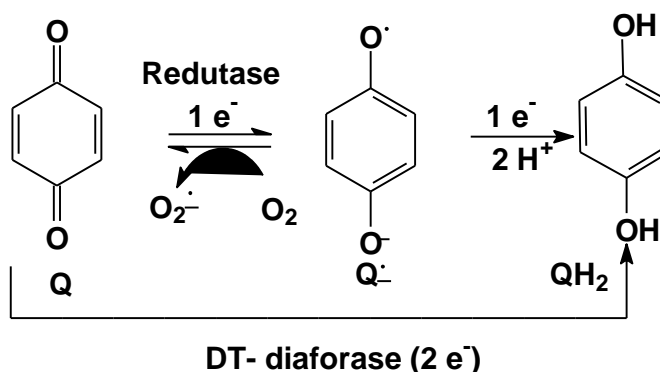
Em estudos farmacológicos as quinonas mostram variadas biodinamicidades, destacando-se, dentre muitas, as propriedades microbicidas, tripanossomicidas, viruscidas, antitumorais e inibidoras de sistemas celulares reparadores, processos nos quais atuam de diferentes formas. Entre as atividades, a mais relevante refere-se ao mecanismo de transferência eletrônica-estresse oxidativo (TE-EO), quando as mesmas, após redução em presença de oxigênio induzem a formação deletéria endógena de espécies bioativas derivadas do oxigênio ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $HO^{\bullet}$ ). Este é o mecanismo de ação aceito no caso da atividade contra *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas [SILVA *et al.*, 2003].

Algumas quinonas são usadas como vitaminas e várias delas, como fármacos. Por exemplo, a coenzima Q funciona como transportadora de elétrons, enquanto a vitamina K é requerida em processos de coagulação sanguínea e participa na carboxilação do glutamato. No entanto, um certo número de xenobióticos forma quinonas tóxicas via metabolismo oxidativo, a partir, por exemplo, de catecolaminas e estrogênio, ou mesmo a partir de medicamentos, como no caso do analgésico acetaminofeno, que em doses maiores, pode causar forte hepatotoxicidade, atribuída à presença de um metabólito, uma benzoquinoneimina, que sofre hidrólise, com geração de quinonas [MONKS & JONES, 2002].

Do ponto de vista biológico, quinonas apresentam duas propriedades químicas principais que lhes conferem reatividade em sistemas biológicos: quinonas são oxidantes e eletrofílicas, porém, como a adição de nucleófilos a uma quinona representa uma redução formal de dois elétrons, suas propriedades oxidantes e eletrofílicas são interligadas. Após o processo de redução, como será visto a seguir, ocorre a inversão de polaridade e o produto resultante se torna um nucleófilo [HILLARD *et al.*, 2008].

Evidências de ocorrência do estresse oxidativo podem ser obtidas via eletroquímica em meio aprótico, em presença de oxigênio. A escolha de solventes apróticos se justifica pelo fato dos mesmos serem melhores modeladores de membrana, em sua porção lipofílica, onde ocorre o processo de peroxidação lipídica, assim como, pela propriedade das espécies oxigenadas reativas geradas serem mais estáveis nesse meio e instáveis em água ou outros solventes próticos [GOULART *et al.*, 2003].

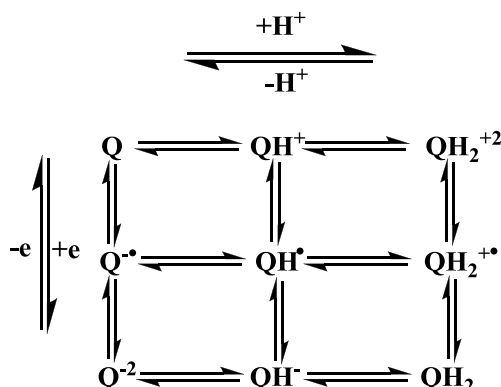
As funções bioquímicas das quinonas referem-se, em grande extensão, a sua habilidade em realizar conversões redox reversíveis. A facilidade de redução explica-se pela formação de sistemas aromáticos (Figura 2). A completa redução de uma quinona à hidroquinona correspondente requer dois elétrons e dois prótons [SCHAFFER & BUETTNER, 2001].



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

Quinonas são espécies neutras e experimentam reações de protonação com dificuldade. No entanto, quando protonadas, são oxidantes mais fortes do que suas formas não protonadas. Semiquinonas ( $Q^{\bullet-}$ ) são geradas por redução envolvendo um elétron. A semiquinona não é suficientemente básica para ser protonada. Conseqüentemente, muitas semiquinonas existem como ânions radicais em pH fisiológico. Por causa da repulsão entre as cargas, um ânion radical semiquinônico é um oxidante muito mais fraco do que a quinona original. Assim, a química redox das quinonas, semiquinonas e hidroquinonas está intimamente relacionada à sua química ácido-base. Adicionalmente, semiquinonas desproporcionam, formando as quinonas e hidroquinonas correspondentes, freqüentemente e com grande facilidade

[JACQ, 1967]. Seu comportamento eletroquímico básico pode ser representado pela Figura 3.



**Figura 3.** Esquema quadrado representativo da oxirredução de quinonas em vários meios [adaptado de JACQ, 1967].

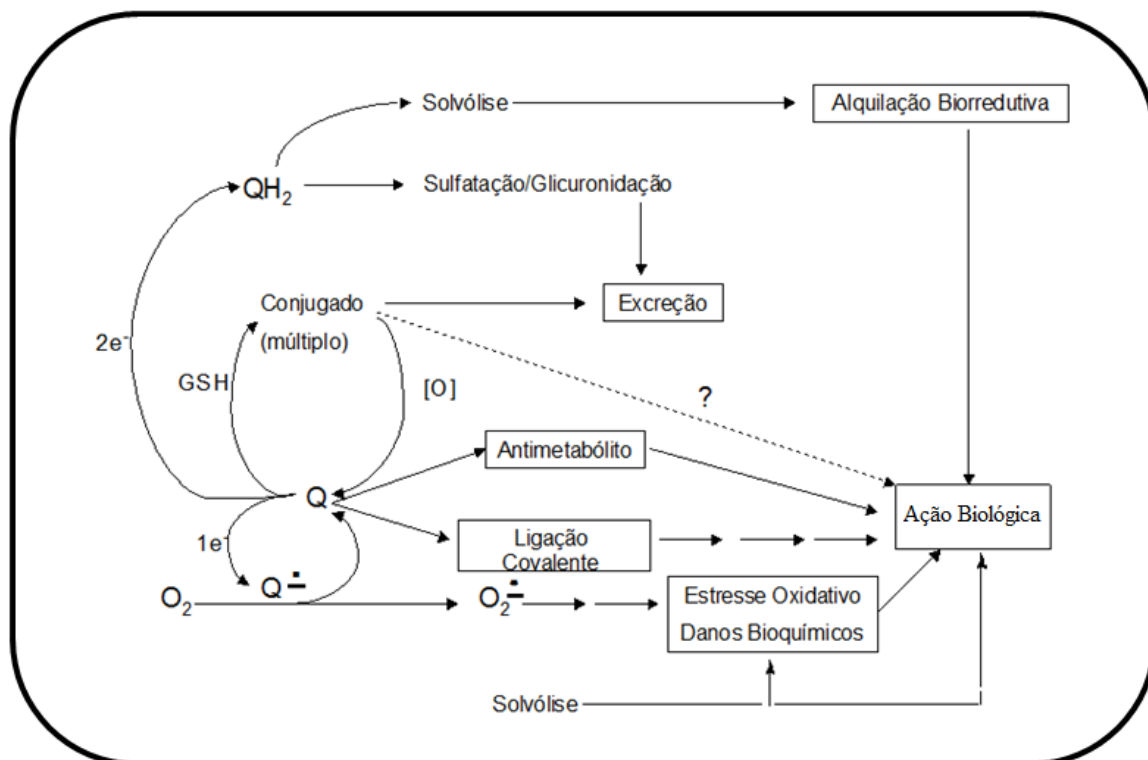
Em termos biológicos, a redução pode ser monoeletrônica, catalisada por enzimas como NADPH:citocromo P450 redutase microssômica, NADPH:citocromo  $b_5$  redutase microssômica e NADPH:ubiquinona oxidoreductase mitocondrial. O sistema enzimático propício à redução bieletrônica é o NAD(P)H:quinona oxidoreductase, também denominada DT-diaforase (Figura 2) e a lipoamida desidrogenase [SCHAFFER & BUETTNER, 2001].

A estabilidade e a reatividade desses intermediários dependem basicamente das propriedades eletrônicas das quinonas, que podem ser microscopicamente descritas pelas energias do LUMO (“Lowest Unoccupied Molecular Orbital” = Orbital Molecular Desocupado de Menor Energia). Essas propriedades podem ser afetadas pela adição de grupos eletroatraentes e eletrodoadores ao sistema quinônico [ZUMAN, 1967]. Quanto maior a energia do LUMO, mais difícil a captura de elétrons, mais negativo o potencial de redução e maior a força nucleofílica das espécies reduzidas.

Quinonas podem ser citotóxicas, com consequências benéficas ou deletérias, por inúmeros mecanismos, incluindo ciclagem redox, arilação, intercalação na dupla hélice do DNA, geração de sítios radiculares específicos e interferência na respiração mitocondrial [MONKES *et al.*, 1992; MONKES & JONES, 2002]. Em todos esses casos, o mecanismo de ação, *in vivo*, requer a biorredução das quinonas como primeira etapa de ativação. Outros mecanismos potenciais das quinonas, não

baseados em transferência de elétron, incluem arilação sulfidrílica [IRONS & SAWAHATA, 1985] ou envolvimento de topoisomerase [FRYDMAN *et al.*, 1997].

Os mecanismos mais aceitos para a atuação biológica das quinonas são esquematizados na Figura 4. Sabe-se que dois ou mais mecanismos podem operar simultaneamente, nesses casos, não é possível avaliar o mais importante [MONKES & JONES, 2002].

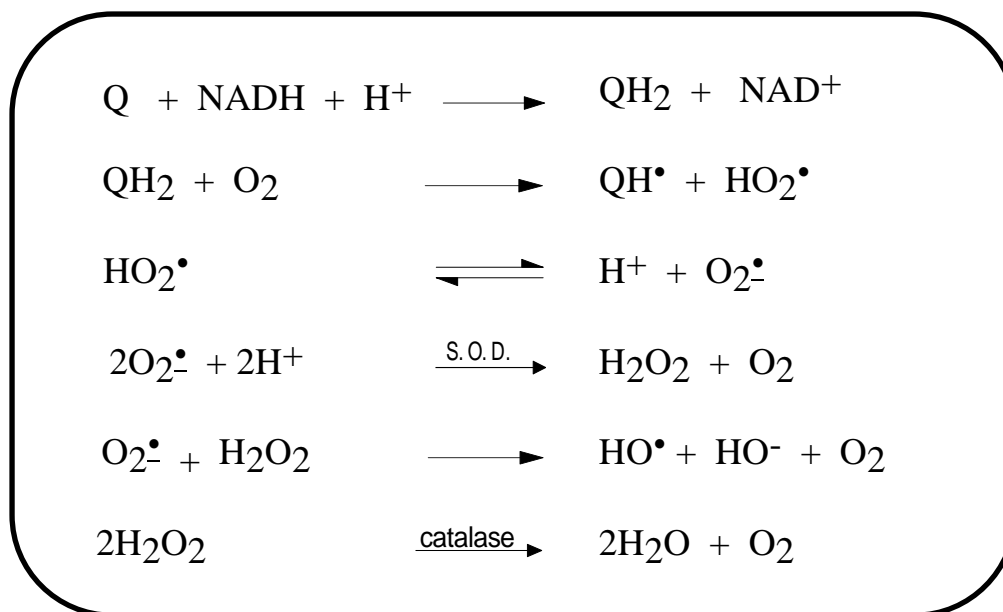


**Figura 4.** Mecanismos gerais de ação biológica de quinonas [adaptado de MONKES *et al.*, 1992].

## 1.2 Quinonas como Cicladores Redox

A redução de um elétron pela ação de redutases resulta na formação da semiquinona, que pode reagir com o oxigênio molecular formando o ânion-radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), que subsequenteemente leva, tanto espontaneamente quanto após catálise enzimática, a desproporcionamento para formar peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). O ânion-radical superóxido também pode reduzir Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>. O peróxido de hidrogênio reage, então, com o Fe<sup>2+</sup> para gerar o radical hidroxila (HO<sup>•</sup>) (Reação de Fenton), que é, provavelmente, a espécie reativa responsável pelo dano oxidativo,

pois ela não é destoxificada por qualquer enzima presente no meio celular (Figura 5).



**Figura 5.** Atuação de quinonas na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e destoxificação, pelo emprego de catalase e superóxido-dismutase (SOD).

Por meio de um mecanismo eficiente de redução da quinona a semiquinona, ocorre um ciclo redox, que tem como consequência o Estresse Oxidativo, mecanismo mais importante de atuação de quinonas, resultante do consumo desproporcionado de equivalentes redutores celulares e a geração das espécies reativas de oxigênio ( $\text{O}_2^{\bullet -}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HO}^\bullet$ ), já mencionadas [FRY & JACOB, 2006].

A redução com transferência de dois elétrons, catalisada pela DT-diaforase, é geralmente considerada como um caminho desintoxicante, desde que a hidroquinona resultante possa ser conjugada e excretada. No entanto, a hidroquinona resultante pode se desproporcionar e gerar espécies oxigenadas ativas (Figura 5), ou levar a reações de rearranjo para formar espécies alquilantes reativas (alquilação biorredutiva). Ambos caminhos podem provocar danos celulares e conseqüente toxicidade [KOVACIC & BECVAR, 2000].

Em termos de técnicas eletroquímicas, o uso de meios específicos permite a obtenção de semiquinonas ou hidroquinonas, o meio aprótico responsável por duas etapas de transferência monoeletrônica enquanto em meio aquoso, há transferência bieletrônica, em uma única etapa [CHAMBERS, 1988].



A verificação da ocorrência de TE-EO é possível, utilizando-se técnicas eletroquímicas. Antraquinonas hidroxiladas (AQOH) e metoxiladas (AQOMe), são utilizadas como compostos-modelo no estudo do mecanismo de processos redox biologicamente importantes, incluindo geração de superóxidos. A interação de semiquinonas formadas a partir da redução de hidroxi-antraquinonas (AQOH) com oxigênio molecular e de antraquinonas com ânion-radical superóxido foi estudada por métodos eletroquímicos e por espectroscopia UV-vis, em DMSO/Perclorato de tetraetilamônio, em eletrodo de platina [OSSOWSKI *et al.*, 2000].

O processo de peroxidação envolve, numa primeira etapa, a redução da quinona à semiquinona. Em seguida, o elétron é transferido homogeneamente para o oxigênio. Ausente o oxigênio, as primeiras ondas de redução de AQOH e de AQOMe são reversíveis. Os voltamogramas em presença de oxigênio de AQOH e AQOMe mostram-se diferentes. Para AQOMe, as curvas voltamétricas constituem-se de superposições das curvas simples do  $O_2$  e da quinona. Por outro lado, a introdução de oxigênio na solução de AQOH causa diferenças marcantes de comportamento, tanto na posição do potencial de pico como no perfil voltamétrico. Em concentrações crescentes de  $O_2$ ,  $I_{p1a}$  decresce até desaparecer completamente. A relação  $O_2/Q$  relativa ao desaparecimento completo de  $I_{p1a}$  é baixa e depende da acidez dos grupos hidroxila presentes. Há desvio positivo de  $E_{p1c}$  em maiores concentrações de oxigênio [OSSOWSKI *et al.*, 2000].

A constante de velocidade para a reação de TE da semiquinona radical para o  $O_2$  (mecanismo EC) pode ser estimada pela dependência das correntes de pico anódico e catódico ou do  $E_{p1c}$  do sistema AQOH/AQOH $^{\bullet}$  em relação à concentração de oxigênio. Verificou-se que as constantes de velocidade de transferência homogênea de elétrons aumentam com a diminuição do pKa [OSSOWSKI *et al.*, 2000].

A alquilação biorredutiva é o segundo mecanismo mais importante de atuação de quinonas, sendo que a maioria dos agentes alquilantes empregados clinicamente comporta-se como armadilhas eletrofílicas para nucleófilos moleculares. Pró-drogas são normalmente empregadas e sua ativação ocorre através de processos redox; dessa forma, elas expressam seu modo de ação somente após redução *in vivo*. A etapa de redução é fundamental e efeitos eletrônicos encontram-se envolvidos [RAJSKI & WILLIAMS, 1998].

### 1.3 $\beta$ -lapachona e seus Derivados

As formas isoméricas das naftoquinonas diferem muito em suas propriedades físico-químicas e quanto à sua atuação biológica. Um exemplo típico é a *orto*-naftoquinona,  $\beta$ -lapachona, do grupo das tabebuias, que é muito mais ativa contra o *Trypanosoma cruzi* que o seu isômero natural,  $\alpha$ -lapachona [MONTANARI & BOLZANI, 2001].

A  $\beta$ -lapachona (3,4-diidro-2,2-dimetil-2*H*-nafto[1,2b]pirano-5,6-diona) tem sido encontrada como constituinte minoritário durante o isolamento de outras naftoquinonas do cerne das árvores de ipês, como por exemplo, *Tabebuia avellanedae* Lorentz ex. Griseb. (Bignoniaceae), nativa das Américas Central e do Sul e mostra uma diversificada ação farmacológica envolvendo principalmente o ciclo redox [FERREIRA, 1993]. Ela tem demonstrado, também, um excelente potencial antineoplásico, agindo por um mecanismo particular de apoptose contra diversos tipos de câncer, em especial algumas linhagens de próstata refratárias ao tratamento convencional [ROLIM NETO *et al.*, 2008].

Há um grande interesse pelo conhecimento da farmacologia e do modo de atuação destas substâncias, como pode ser demonstrado pelo número crescente de publicações sobre o mecanismo de atuação da  $\beta$ -lapachona. O progresso quanto aos conhecimentos da bioquímica das atividades enzimáticas, além dos recentes avanços da química computacional, em muito pode contribuir para o esclarecimento em maior profundidade dos mecanismos de atividade de fármacos e, em consequência, para o planejamento de novos fármacos comerciais [OLIVEIRA & ALVES, 2002].

O contexto de previsibilidade que estes estudos trazem auxiliam na busca de agentes antineoplásicos baseados em planejamentos racionais, resultando na obtenção de substâncias com maior seletividade e eficiência antineoplásica. A citotoxicidade das quinonas leva à especulação de que existe uma propriedade química intrínseca na unidade quinonoídica, associada com outros fatores estruturais, que são responsáveis pela intensidade das atividades antitumorais. Uma possibilidade plausível é a capacidade das quinonas se reduzirem pelas flavoenzimas celulares [MAKIN & DIVE, 2001].

Na busca de novos agentes farmacologicamente ativos, tendo como protótipo a  $\beta$ -lapachona, estudos voltamétricos e de citotoxicidade têm sido realizados com

seus derivados sintéticos LAUSEST-B, LAUSEST-CLB e LAUSEST-FB e LAUSEST-AMe. Assim como a  $\beta$ -lapachona, esses derivados apresentam baixa solubilidade em meio aquoso e alternativas têm sido desenvolvidas para o aumento da solubilidade destes compostos.

#### 1.4 Ácido Úsnico

Os líquens, uma combinação simbiótica de algas e fungos, representam um extraordinário grupo vegetal que produz substâncias, especialmente as de natureza fenólica, que se distinguem entre os produtos naturais devido às propriedades biológicas e farmacológicas que apresentam [OKSANEM, 2006].

O Ácido Úsnico (2,6-diacetil-7,9-diidroxi-8,9b-dimetil-1,3-(2H,9H)-dibenzofurano) é um composto derivado do metabolismo secundário liquênico de várias espécies, tais como *Cladonia* (Caldoniaceae), *Usnea* (Usneaceae), *Lecanora* (Lecanoraceae), *Ramalina* (Ramalinaceae) e *Parmelia* (Parmeliaceae). Desempenha importante papel biológico, conferindo aos líquens proteção contra microrganismos invasores, raios UV e ressecamento [COCCHIETTO *et al.*, 2002].

Esse derivado liquênico apresenta-se, na forma cristalina, com coloração levemente amarelada e existe na natureza em duas formas enantioméricas: (+) e (-)-ácido úsnico, dependendo da posição do grupo metila do carbono quiral 9b. O Ácido Úsnico é praticamente insolúvel em água (0,01 g/100 mL a 25 °C), e solúvel em solventes orgânicos, tais como: dimetilsulfóxido, acetona, clorofórmio, metanol, acetato de etila e diclorometano [COCCHIETTO *et al.*, 2002; INGÓLFSDÓTTIR *et al.*, 1998].

Mesmo apresentando uma variedade de atividades biológicas (antitumoral, antimicrobiana, antiviral, antiproliferativo e antiinflamatória), a utilização do Ácido Úsnico na terapêutica ainda é limitada por apresentar baixa hidrofiliabilidade e elevada hepatotoxicidade. Em particular, as ligações de hidrogênio intramoleculares contribuem para a caracterização lipofílica do Ácido Úsnico, sendo seu efeito citotóxico atribuído aos grupamentos  $\beta$ -tricetona presentes na molécula [COCCHIETTO *et al.*, 2002].

Deste modo, a utilização do Ácido Úsnico na sua forma livre torna-se bastante restrito, sendo necessárias alternativas para contornar suas características físico-químicas indesejáveis e diminuir seus efeitos tóxicos, além de manter suas

atividades biológicas. Entre essas possibilidades, tem-se utilizado o Ácido Úsnico em formulações farmacêuticas tais como, lipossomas e ciclodextrinas [SANTOS-MAGALHÃES *et al.*, 2009; SIQUEIRA-MOURA *et al.*, 2008].

O comportamento eletroquímico do Ácido Úsnico, em meio prótico, foi recentemente publicado por JORGE *et al.* (2010) que, devido à baixa solubilidade desta substância, realizou os estudos com o Ácido Úsnico em sua forma sólida aderido por pressão mecânica à superfície do eletrodo de CV.

### 1.5 Ciclodextrinas

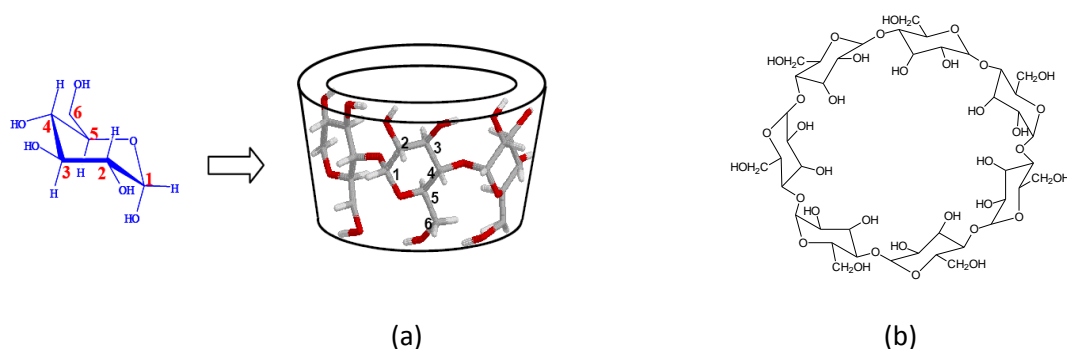
A insolubilidade de compostos biologicamente ativos consiste em um fator que pode acarretar limitações nas aplicações farmacêuticas. Dessa forma, o desenvolvimento de metodologias que possibilitem aumentar a solubilidade de compostos insolúveis, bem como a liberação dos mesmos no alvo de ação é de extremo interesse em aplicações farmacêuticas.

Ciclodextrinas (CD) são conhecidas na química supramolecular como receptores capazes de formar complexos de inclusão, estáveis ou nanoestruturas supramoleculares organizadas, com uma variedade de moléculas, inclusive compostos orgânicos, inorgânicos e organometálicos, em sua cavidade hidrofóbica via interações não covalentes [YANG *et al.*, 2004; VENTURINI *et al.*, 2008].

Essas características possibilitam a aplicação de CD em um grande número de campos, entre eles ambiental, analítico, e em processos industriais, pois mostram alta seletividade molecular (discriminação quiral), aumentam a estabilidade inclusive de radicais eletrogerados, reduzem ou eliminam gostos ou odores desagradáveis de fármacos e alimentos, diminuem a volatilidade de perfumes, aumentam a solubilidade de substratos lipofílicos em meio aquoso e, como consequência sua biodisponibilidade, bem como a diminuição da irritabilidade e toxicidade, e liberação *in loco*, de compostos detentores de atividade biológica [LOFTSSON & MASSON, 2001; SZEJTLI & SZENTE, 2005; BREWSTER & LOFTSSON, 2007].

São conhecidas CD com seis ( $\alpha$ -CD), sete ( $\beta$ -CD), oito ( $\gamma$ -CD), nove ( $\delta$ -CD), dez ( $\epsilon$ -CD) ou mais unidades de  $\alpha$ -D-glicopirranose, todas em ligações  $\alpha$ -1,4; no entanto, as mais importantes são  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, tanto quanto seus derivados [BREWSTER & LOFTSSON, 2007; CHALLA *et al.*, 2005].

Devido à conformação em cadeira das unidades glicopiranosila, as CD apresentam-se na forma de um cone truncado. As funções hidroxila são orientadas para fora do cone, com as hidroxilas primárias do resíduo sacarídico voltadas para extremidade estreita do cone e as hidroxilas secundárias voltadas para a extremidade larga (Figura 6) [LOFTSSON & MASSON, 2001; BREWSTER & LOFTSSON, 2007]. Esse grande número de hidroxilas permite a formação de ligações-de-hidrogênio intramoleculares (entre os grupos hidroxila 2- e 3- da unidade de glicosídica adjacente) ou intermolecular (entre CDs e moléculas hospedeiras) [YANG *et al.*, 2004].



**Figura 6.** (a) Estrutura funcional da  $\beta$ -ciclodextrina [BUDAL, 2003]. (b) Estrutura química da  $\beta$ -ciclodextrina.

Os complexos de inclusão têm sido amplamente estudados porque promovem principalmente, um aumento da solubilidade de substâncias pouco solúveis em água, além de proporcionar uma melhoria na estabilidade, maior disponibilidade e diminuição dos efeitos indesejáveis do princípio ativo [BUDAL, 2003]. Desta forma, as ciclodextrinas são largamente utilizadas em diversas áreas como a farmacêutica, a área têxtil, alimentícia, entre outras.

A formação de complexos por inclusão entre esses carreadores e compostos biologicamente ativos pode aumentar a solubilidade desses compostos, bem como a biodisponibilidade, liberação em loco, de compostos detentores de atividade biológica. Esses compostos de inclusão podem também ser modificados quimicamente com grupos específicos no sentido de aumentar a sensibilidade de sensores na determinação eletroanalítica de diversos analitos [YANG *et al.*, 2004].

Nesse sentido, as monocamadas altamente-organizadas (SAM's) de derivados tiolados do oligossacarídeo foram preparadas com freqüência como

sistemas modelo de receptores de membrana e sensores químicos. As SAM's formadas por adsorção química de compostos organo-tiolados sobre superfície de ouro exibem estruturas moleculares altamente organizadas. Uma importante vantagem apresentada pelas SAM's é a possibilidade de imobilização sobre materiais para aplicações em eletroquímica, bem como medidas em microbalança de cristal de quartzo. A possibilidade de desenhar a arquitetura da interface eletrodo/solução é bastante atrativa para eletroquímica e sensores eletroquímicos. A estrutura química dos derivados de ciclodextrina apresenta grande efeito na organização molecular da monocamada [ENDO *et al.*, 2005; ROJAS *et al.*, 1995].

Deste modo, pretende-se avaliar uma possível interação dos derivados sintéticos da  $\beta$ -lapachona e do Ácido Úsnico com a cavidade da  $\beta$ -CD e da HP- $\beta$ -CD a partir do comportamento voltamétrico observado para esses compostos na ausência e na presença dessas ciclodextrinas, em solução. Além disso, pretende-se avaliar o comportamento da  $\beta$ -lapachona, para fins eletroanalíticos, em eletrodo quimicamente modificado com SAM mista de  $\beta$ -CD-SH ( $\beta$ -ciclodextrina tiolada + MUA (Ácido 11-mercaptoundecanóico)).

## 1.6 Biossensor de DNA

O DNA é constituído de uma dupla hélice, consistindo de duas fitas, cada uma delas formadas por grupos fosfatos, pentoses e bases púricas e pirimídicas ligadas através de ligações de hidrogênio, sendo considerado um dos alvos biológicos de maior relevância para a ação de fármacos. Portanto, os biossensores de DNA são utilizados nos estudos de interação cinética entre os compostos biologicamente ativos e DNA, através de técnicas eletroquímicas, tais como voltametria cíclica (VC), voltametria de pulso diferencial (VPD) e voltametria de onda quadrada (VOQ) [BRETT *et al.*, 1998].

A interação de fármacos com DNA é considerada uma das mais importantes descobertas no desenvolvimento farmacêutico. São três as possibilidades de interação: a primeira delas ocorre pelo controle dos fatores de transcrição e de polimerases, nos quais os fármacos interagem com proteínas que se ligam ao DNA. O segundo faz-se por meio da ligação com RNA, tanto com a dupla hélice do DNA, formando tripla hélice, ou com a fita simples, com a formação de híbridos, que podem interferir com a atividade de transcrição. No último caso, há interação de

pequenas moléculas diretamente na estrutura do DNA. A modificação do DNA por agentes citotóxicos representa uma lesão bioquímica grave. Nesse caso, as interações podem ser eletrostáticas, geralmente inespecíficas, com o envolvimento do arcabouço negativo (açúcar-fosfato), via intercalação entre os pares de base ou interação covalente [RAUF *et al.*, 2005].

Os eletrodos modificados com DNA têm sido aplicado com sucesso tanto como superfícies modificadas para determinação eletroanalítica de fármacos quanto para o estudo com a interação dos mesmos com o DNA. Eles permitem avaliar e prever interações com prejuízos celulares, através de técnicas eletroquímicas (voltametria de pulso diferencial, em eletrodos de carbono vítreo modificados com DNA em fita dupla e simples) baseados na observação da ligação das moléculas em estudo com os ácidos nucleicos [DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ *et al.*, 2004].

Em eletrodos de carbono vítreo, os picos referentes à eletrooxidação do DNA, em meio ácido (pH 4,5), referem-se à oxidação das bases púricas (guanina e adenina), sendo as bases pirimídicas (timina e citosina) eletroinativas nestas condições. De modo geral, os valores de potencial de oxidação ( $E_{oxi}$  vs ESC), em pH 7,2 para a poliguanina e poliadenina em eletrodo de grafite pirolítico são +0,89 V e +1,17 V, respectivamente. Para a 8-oxoguanina, o  $E_{ox}$  é +0,45 V. O *ds*DNA (DNA nativo, fita dupla) sempre apresenta menores correntes de eletrooxidação quando comparado ao *ss*DNA (DNA desnaturado, fita única). Isso ocorre, com o *ds*DNA, não só pelo fato de os sítios de oxidação estarem protegidos, devido ao fato de estarem envolvidos em ligações de hidrogênio, como também por sua menor flexibilidade e maior dificuldade de adsorção. Entretanto, quando o analito entra entre as fitas do *ds*DNA, modifica sua conformação, o que leva a exposição de suas bases, passíveis de oxidação [BRETT *et al.*, 2002].

Em muitos exemplos, a interação com o *ds*DNA é inexistente, evidenciando que este não é o alvo para a ação biológica. Nesse caso não há evidência dos picos de oxidação das bases constituintes do DNA, o que indica conservação da conformação original do DNA. Investigações eletroquímicas indicaram que a  $\beta$ -lapachona não interage com o *ds*DNA, como descrito na literatura. Um provável mecanismo de interação da  $\beta$ -lapachona com topoisomerasas, enzimas essenciais para manter o estado topológico apropriado do DNA durante seus processos de replicação, transcrição e recombinação, foi proposto e novamente, experimentos

eletroquímicos mostraram-se úteis para mimetizar interações com topoisomerasas [BRETT *et al.*, 2002].

Há casos em que fica evidente a necessidade da redução preliminar das substâncias para a interação com o DNA. Essa redução pode ser realizada e acompanhada eletroquimicamente *in situ* ou *ex-situ*, com o DNA em solução ou na superfície eletródica, normalmente, em eletrodo de carbono vítreo ou pasta de carvão [MARIN *et al.*, 1998].



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar o comportamento eletroquímico dos derivados sintéticos da  $\beta$ -lapachona (LAUSEST-B, LAUSEST-FB, LAUSEST-CLB e LAUSEST-AMe) e do Ácido Úsnico com obtenção dos parâmetros eletroquímicos enfatizando a importância de estudos bioeletroquímicos para contribuição de prováveis mecanismos de ação biológica.

### 2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Determinar os parâmetros eletroquímicos em meio aprótico e prótico, a fim de esclarecer relações com a mudança de substituinte e com o mecanismo eletródico;
- ✓ Verificar a reatividade das *orto*-quinonas com o oxigênio molecular e correlacioná-la à atividade antitumoral, investigando a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) como provável mecanismo de ação biológica;
- ✓ Avaliar a influência da presença de  $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD no comportamento voltamétrico das substâncias em análise;
- ✓ Verificar o comportamento eletroquímico da  $\beta$ -lapachona em eletrodo de ouro e, em eletrodo de ouro quimicamente modificado com monocamadas mistas de  $\beta$ -CDSH + MUA, a fim de realizar estudos eletroanalíticos;
- ✓ Analisar possível interação dos compostos da série LAUSEST e do Ácido Úsnico com ssDNA e dsDNA através de biossensor eletroquímico.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Produtos Químicos e Solventes

A  $\beta$ -lapachona ( $MM = 242,09 \text{ g mol}^{-1}$ ) foi anteriormente sintetizada pelo nosso grupo. Os derivados da  $\beta$ -lapachona (LAUSEST-B, LAUSEST-FB, LAUSEST-CLB, LAUSEST-AMe;  $MM = 290,09 \text{ g mol}^{-1}$ ,  $308,09 \text{ g mol}^{-1}$ ,  $324,06 \text{ g mol}^{-1}$ ,  $304,09 \text{ g mol}^{-1}$ , respectivamente) foram cedidos pelo Prof. Dr. Vítor Francisco Ferreira do Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense e o Ácido Úsnico ( $MM = 334,30 \text{ g mol}^{-1}$ ) foi cedido pelo doutorando Diogo Lúcio da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco.

A  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), a Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) e o ácido desoxirribonucleico foram adquiridos da Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Iodo, tiouréia, hidróxido de sódio (NaOH), sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e hidrogenossulfato de potássio ( $\text{KHSO}_4$ ) têm procedência da Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil). Trifenilfosfina ( $\text{PPh}_3$ ) foi adquirida da Fluka. Ácido ferrocenocarboxílico ( $\text{Fc-CO}_2\text{H}$ ) e metóxido de sódio (MeOH) foram obtidos da Alfa Aesar. Ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) foi obtido da Merck. Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas em água ultrapura ( $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) a partir de um sistema de purificação Milli-Q da Millipore Inc.

#### 3.2 Estudos Eletroquímicos

Todos os estudos eletroquímicos foram realizados utilizando-se um sistema de três eletrodos (eletrodos de trabalho, referência e auxiliar). De acordo com o procedimento experimental a ser realizado optou-se entre o eletrodo de carbono vítreo (BAS, diâmetro 1,6 mm) e o eletrodo de ouro (BAS, diâmetro 1,6 mm) como eletrodo de trabalho. Como eletrodo de referência utilizou-se  $\text{Ag|AgCl|Cl}^-$  ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e como eletrodo auxiliar, um fio de platina.

As medidas eletroquímicas foram realizadas através do equipamento PGSTAT (AUT73222) da Autolab® interfaceado a um microcomputador e o tratamento posterior dos dados foi realizado através do programa Origin 6.0. Tais medidas foram realizadas à temperatura ambiente, a medida do pH das soluções

tampão foi realizado empregando pHmetro da Quimis e para quantificação do teor de oxigênio dissolvido em solução foi utilizado o oxímetro da Digimed DM-4.

As técnicas eletroquímicas utilizadas foram Voltametria Cíclica (VC) e Voltametria de Pulso Diferencial (VPD).

### 3.2.1 Limpeza Padrão dos Eletrodos de Carbono Vítreo e Ouro

O eletrodo de carbono vítreo passou por uma limpeza mecânica de polimento após serem deixados *overnight* numa solução de Ácido Nítrico 10% (v/v) para eliminar possíveis impurezas adsorvidas na superfície do eletrodo. Já a limpeza da superfície do eletrodo de ouro deve ser rigorosa para não afetar a cinética de formação das SAMs e, deste modo, os eletrodos de ouro passaram por um pré-tratamento que constituiu uma limpeza mecânica seguida de uma etapa eletroquímica.

Os eletrodos de carbono vítreo (BAS) e de ouro (BAS) foram polidos com alumina (0,3  $\mu\text{m}$ ) e lavados com água; posteriormente os eletrodos foram levados ao ultrassom por 30 s em etanol para remoção das partículas residuais.

Como o pré-tratamento da superfície de ouro é uma das etapas mais importantes na formação de monocamadas auto-organizadas, os eletrodos de ouro foram submetidos ao tratamento eletroquímico, em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ , na faixa de potencial de -0,4 a 1,5 V (0,1 V  $\text{s}^{-1}$ ) durante 10 ciclos.

Após o procedimento de limpeza dos eletrodos de carbono vítreo e de ouro, realizou-se o teste com solução padrão de ferricianeto de potássio ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ )/ferrocianeto de potássio ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )  $1,0 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$  em KCl 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ , para verificar a área eletroativa dos eletrodos. Em seguida, os eletrodos foram utilizados nos estudos eletroquímicos da  $\beta$ -lapachona, LAUSEST-B, LAUSEST-CLB, LAUSEST-FB, LAUSEST-AMe e Ácido Úsnico.

### 3.2.2 Meio Aprótico

Para os estudos em meio aprótico utilizou-se como solvente o N,N-dimetilformamida (DMF), visto que é um bom solvente para compostos orgânicos. Entretanto é um solvente susceptível a hidrólise, produzindo dimetilamina, facilmente oxidável, e ácido fórmico. Como o DMF decompõem-se na

destilação sob pressão atmosférica, este solvente foi submetido à destilação sob pressão reduzida, após tratamento com  $\text{CuSO}_4$  anidro.

O Perclorato de tetrabutilamônio (TBAP), utilizado como eletrólito suporte nos estudos em meio aprótico, foi seco sob pressão reduzida a 40°C.

Para o preparo das soluções em meio aprótico, dissolveu-se a massa das substâncias (equivalente a 1 mmol L<sup>-1</sup>) em DMF, juntamente com a massa de TBAP (equivalente a 0,1 mol L<sup>-1</sup>). As massas dos compostos foram determinadas com precisão de centésimo de mg, em balança analítica, momentos antes de cada execução experimental.

### 3.2.3 Meio Prótico

Para a obtenção dos parâmetros eletroquímicos, em meio prótico, utilizou-se como eletrólito suporte um meio aquoso etanólico tamponado, tampão fosfato pH 7,0.

Soluções-estoque de  $\beta$ -lapachona, LAUSEST-B, LAUSEST-CLB, LAUSEST-FB, LAUSEST-AMe e Ácido Úsnico foram preparadas na concentração de 1 mmol L<sup>-1</sup> em EtOH, imediatamente antes de sua utilização no estudo eletroquímico em meio prótico, para suprir eventuais instabilidades de quinonas.

Os estudos eletroquímicos da  $\beta$ -lapachona em SAM foram realizados utilizando solução de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,2 mol L<sup>-1</sup> como eletrólito suporte.

Para o estudo da dependência do potencial de oxidação do Ácido Úsnico com o pH utilizou-se a técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD). Os tampões usados foram preparados adicionando-se volumes conhecidos de eletrólitos 1 e 2, e completando-se o volume para 100 mL com água deionizada de acordo com a Tabela 1.

As demais soluções tampões foram preparadas ajustando o pH com uma solução de ácido ou base adequada.

**Tabela 1.** Soluções Tampões para eletrólito suporte.

Tampão (diluído para 100 mL)					
Solução do eletrólito 1	C (mol L <sup>-1</sup> )	Solução do eletrólito 2	C (mol L <sup>-1</sup> )	pH	Força iônica
KCl (25 mL)	0,20	HCl (42,5 mL)	0,20	0,60	0,135
KCl (25 mL)	0,20	HCl (6,5 mL)	0,20	1,10	0,063
NaOAc (3,7 mL)	0,20	HOAc (46,3 mL)	0,20	2,93	0,100
NaOAc (13,2 mL)	0,20	HOAc (46,3 mL)	0,20	4,00	0,100
NaOAc (7,2 mL)	1,00	HOAc (12,5 mL)	1,00	4,47	0,197
NaOAc (41,2 mL)	0,20	HOAc (8,8 mL)	0,20	5,10	0,100
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (6,15 mL)	0,20	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (43,85 mL)	0,20	5,90	0,125
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (30,5 mL)	0,20	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (19,5 mL)	0,20	6,82	0,222
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (47,3 mL)	0,20	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (2,65 mL)	0,20	7,80	0,289
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (10 mL)	0,10	NaHCO <sub>3</sub> (90 mL)	0,10	9,11	0,105
NaHCO <sub>3</sub> (50 mL)	0,05	NaOH (12,2 mL)	0,10	10,14	0,037
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (50 mL)	0,05	NaOH (3,3 mL)	0,10	10,91	0,368
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (50 mL)	0,05	NaOH (23 mL)	0,10	11,91	0,061

### 3.2.3.1 Reatividade da Série LAUSEST Frente ao Oxigênio

A solução-trabalho (0,05 mmol L<sup>-1</sup>) foi obtida a partir de simples diluição da solução-estoque etanólica (1 mmol L<sup>-1</sup>) em meio misto (tampão fosfato pH 7,0, em EtOH 30% (v/v) e para quantificar o teor de oxigênio dissolvido em solução utilizou-se um biossensor de oxigênio da Digimed DM-4.

Para determinação da constante catalítica ( $K_{app}$ ) utilizou-se a equação descrita por Bard & Faulkner (1990):

$$\frac{i_c}{i_{p_0}} = \frac{K_{app} \times R \times T \times [O_2]}{n \times F \times \nu} \quad (\text{Equação 1})$$

onde,

$i_c$  = corrente catalítica

$i_{p_0}/i_{p_0}$  = corrente normalizada

$K_{app}$  = constante catalítica aparente (s<sup>-1</sup>)

$\nu$  = velocidade de varredura ( $V s^{-1}$ )

$n$  = número de elétrons

Constante de Faraday =  $96485 C mol^{-1}$

$T$  = temperatura (298 K)

$R$  =  $8,314 J mol^{-1} K^{-1}$

A partir dos valores das constantes de reatividade com o oxigênio molecular obtidos para os compostos da série LAUSEST, é possível propor prováveis correlações entre a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e os ensaios de citotoxicidade *in vitro* (Ensaio do MTT) realizado pelo grupo de pesquisa do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

### 3.2.3.2 Interação da Série LAUSEST e do Ácido Úsnico com $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD em Solução

Para avaliar a interação dos derivados sintéticos da  $\beta$ -lapachona e do Ácido Úsnico, em termos qualitativos, com  $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD, realizou-se um experimento de transferência de fase, de modo que, inicialmente, adicionou-se a massa correspondente a  $0,5 mmol L^{-1}$  de cada substância a ser analisada em uma célula eletroquímica contendo uma solução aquosa de tampão fosfato, pH 7,0 e, promoveu a agitação durante 15 minutos, sendo sua resposta eletroquímica registrada.

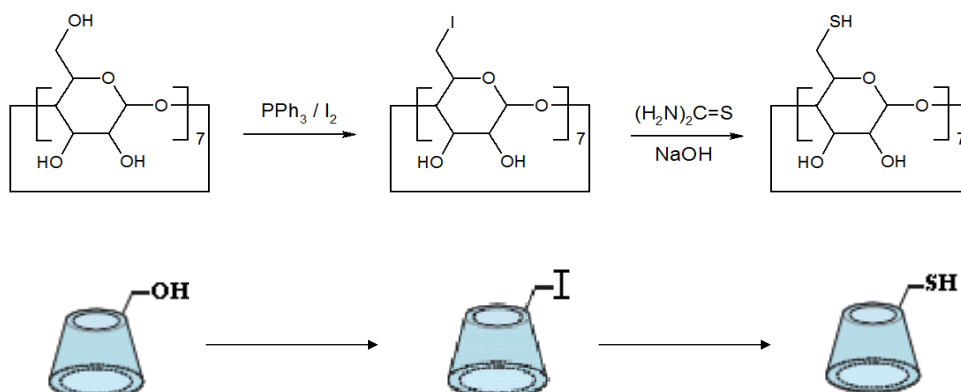
Em seguida, foram adicionadas massas de  $\beta$ -CD correspondentes às concentrações de 0,05, 0,5 e 5  $mmol L^{-1}$ , cabendo a cada adição uma agitação de 15 minutos com posterior varredura. Este procedimento também foi realizado para a HP-  $\beta$ -CD.

As possíveis interações foram avaliadas a partir dos parâmetros eletroquímicos, potencial e corrente de pico, obtidos em cada procedimento.

### 3.2.3.3 Determinação da $\beta$ -lapachona em Eletrodo de Ouro Modificado com SAM Mista de $\beta$ -CD-SH + MUA

A tio- $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CDSH) foi sintetizada de acordo com a metodologia descrita por CHOI *et al.* (2005) e seus produtos foram caracterizados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em DMSO- $d_6$ , a partir de um espectrômetro

BRUKER AVANCE 400, operando na frequência de 400 MHz para  $^1\text{H}$  (9,4 Tesla) e utilizando TMS como padrão interno.



**Figura 7.** Esquema sintético de *per*-7-tio- $\beta$ -ciclodextrina.

Após caracterização, a *per*-7-tio- $\beta$ -ciclodextrina foi utilizada na preparação da monocamada auto-organizada em eletrodo de ouro. Depois de limpos, os eletrodos foram introduzidos em uma solução contendo uma razão apropriada de  $\beta$ -CDSH: $\text{Fe-CO}_2\text{H}$ :MUA (2:2:1 m/m/m) em uma mistura de solventes ( $\text{DMSO}:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$  – 5:3:2 v/v/v). Inicialmente, os eletrodos foram levados a uma solução de  $\beta$ -CDSH dissolvida em DMSO, desaerada com  $\text{N}_2$  e sob agitação, em que se adicionou o  $\text{Fc-CO}_2\text{H}$  solubilizado em EtOH. Os eletrodos permaneceram na solução por 1 hora, para que se formasse o complexo entre  $\text{Fc-CO}_2\text{H}$  e a cavidade da  $\beta$ -CDSH. Depois disso, a MUA e água foram adicionadas à solução e a mistura foi novamente desaerada com  $\text{N}_2$ . Os eletrodos permaneceram em repouso nessa solução por 24 horas. Antes dos experimentos voltamétricos, os eletrodos foram lavados abundantemente com EtOH e água.

A 10,0 mL da solução de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  contidos na célula eletroquímica adicionaram-se alíquotas de solução-estoque de  $\beta$ -lapachona. Depois da adição de cada alíquota e agitação, foram realizadas varreduras na velocidade de  $0,01 \text{ V s}^{-1}$ , na faixa de potencial de +0,7 a -0,7 V. As concentrações escolhidas para a confecção da curva foram: 20; 25; 30; 35; 40; 45;  $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ .

#### 3.2.3.4 Estudo de Interação com ssDNA

Como o ssDNA (*single strand* ou fita única) apresenta, geralmente, correntes de oxidação maiores do que o dsDNA (*double strand* ou dupla-fita), a análise de interação entre substâncias e ssDNA é observada pela diminuição das intensidades de corrente de pico das bases púricas, guanina e adenina.

Para os estudos de interação das substâncias supracitadas com ssDNA utilizou-se, como eletrólito suporte, uma solução de tampão acetato pH 4,5, como recomenda a literatura (BRETT *et al.*, 2002). O tampão utilizado para experimento com DNA foi preparado com água deionizada previamente fervida, assim como toda vidraria envolvida para este experimento foi lavado com a referida água.

Para preparar a solução de ssDNA pesaram-se 3 mg de dsDNA e este foi desnaturado mediante adição de 1 mL de ácido clorídrico ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e aquecimento a  $100^\circ\text{C}$ , por 1 hora, até dissolução. Em seguida, 1 mL de solução de NaOH ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) foi adicionado para neutralização e, por fim, completou-se o volume total de 10 mL com tampão acetato pH 4,5.

A solução-trabalho ( $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ) foi obtida a partir de simples diluição da solução-estoque etanólica ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) de cada substância em solução de ssDNA, apresentou 30% EtOH (v/v) para evitar a precipitação das substâncias.

#### 3.2.3.5 Estudo com Biossensor de dsDNA

A interação de substâncias com o dsDNA ocorre quando o analito penetra entre as fitas do dsDNA, modifica sua conformação e leva a exposição de suas bases, passíveis de oxidação. Em muitos casos, a interação com o dsDNA é inexistente, não havendo evidência dos picos de oxidação das bases constituintes do DNA, o que indica conservação da conformação original do DNA.

Para os estudos em biossensor de dsDNA pesaram-se, inicialmente, 15 mg de dsDNA em um *ependorf* e, em seguida, adicionou-se 1 mL de tampão acetato (pH 4,5), preparado como descrito anteriormente. O gel DNA foi armazenado sob refrigeração por 24 horas, para completa dissolução do DNA e formação do gel (o dsDNA não pode ser submetido ao ultrassom para não comprometer a integridade da dupla hélice).



Antes de preparar o biossensor, deve ser realizado o polimento e condicionamento do eletrodo de carbono vítreo. Após o polimento, o eletrodo foi condicionado em solução etanólica (30% v/v) tamponada (tampão acetato pH 4,5) através da técnica de VPD ( $E_{\text{aplic.}} = 0$  a 1,4 V) a uma velocidade de  $5 \text{ mV s}^{-1}$  em 10 ciclos para obter estabilização da superfície do eletrodo.

Após condicionamento,  $10 \text{ }\mu\text{L}$  do gel de dsDNA foram adicionados na superfície do eletrodo, com posterior secagem em atmosfera de nitrogênio. Em seguida, realizou-se uma varredura em condições similares ao condicionamento a fim de obter o branco.

Para análise dos compostos da série LAUSEST e do Ácido Úsnico, preparou-se uma solução-trabalho ( $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ), em meio etanólico tamponado, obtida a partir de simples diluição de solução-estoque etanólica ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ), resultando em 30% EtOH (v/v), prosseguindo com a eletrooxidação após o tempo de 15 minutos de contato do biossensor de DNA com a solução-trabalho.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A descrição se iniciará com os estudos em meio aprótico, que tem como objetivo simular um comportamento observado no meio celular lipofílico, e em seguida o meio prótico (hidrofílico), detalhando os resultados obtidos da reatividade dos compostos da série LAUSEST frente ao oxigênio molecular, seguindo com os estudos de interação com ciclodextrinas e DNA destes compostos e do Ácido Úsnico.

### 4.1 Estudos Eletroquímicos dos Compostos da Série LAUSEST

#### 4.1.1 Meio Aprótico

Os estudos voltamétricos (VC) da série LAUSEST (Figuras 08, 09a, 10a, 11a e 12a), em meio aprótico (DMF/TBAP 0,1 mol L<sup>-1</sup>), apresentaram, de maneira geral, um comportamento eletroquímico atípico de quinonas, em meio aprótico, nas velocidades de 20 a 100 mV s<sup>-1</sup>, visto que se observou a presença de três ondas catódicas com características reversíveis definidas pela presença de suas respectivas ondas anódicas.

Já o comportamento voltamétrico observado para série LAUSEST (Figuras 09b, 10b, 11b e 12b), em meio aprótico nas velocidades de 200 mV s<sup>-1</sup> a 5 V s<sup>-1</sup>, apresentaram duas ondas de redução (Ic e IIc, respectivamente) correspondentes, no primeiro processo eletródico, à formação da semiquinona e, em seguida, no segundo processo, à formação do diânion, com características de processos reversíveis observados pela presença de ondas anódicas correspondentes à primeira etapa de redução (Ia), sendo a onda IIa, pouco definida.

A primeira onda de redução (Ic) está relacionada à formação da semiquinona, como descrito anteriormente, pois semiquinonas (Q<sup>•-</sup>) são geradas por redução envolvendo um elétron, em meio aprótico (JEFTIC & MANNING, 1970). Já a segunda onda de redução (IIc) está relacionada à formação do diânion e mostrou-se menos reversível, alargada e com uma intensidade de corrente de pico catódico (IIc) correspondente à metade da intensidade de corrente da primeira onda de redução (Ic). Estes resultados podem ser provavelmente, devidos a reações de desproporcionamento catalisadas por água, a partir do ânion radical, e

concomitantemente ou, alternativamente, por redução da água residual, pelo diânion formado (CHAMBERS, 1988). Esses fatos podem justificar o aparecimento de uma terceira onda de redução, também com características de reversibilidade, observada em velocidades mais baixas.

O comportamento eletroquímico, em meio aprótico, observado para os compostos da série LAUSEST difere do perfil voltamétrico de seu precursor,  $\beta$ -lapachona, visto que este apresenta um perfil típico de quinonas, com duas ondas de redução, de mesma intensidade, com características de processos reversíveis. (DE ABREU, 2002).

Os valores de intensidade de corrente em função da raiz quadrada da velocidade de varredura para a primeira onda catódica demonstraram que o transporte de massa através da solução, o qual rege a chegada da substância à superfície do eletrodo, é de natureza difusional. Já para a segunda onda catódica, não foi possível definir o tipo de transporte de massa, pois se trata da mistura de duas ondas.

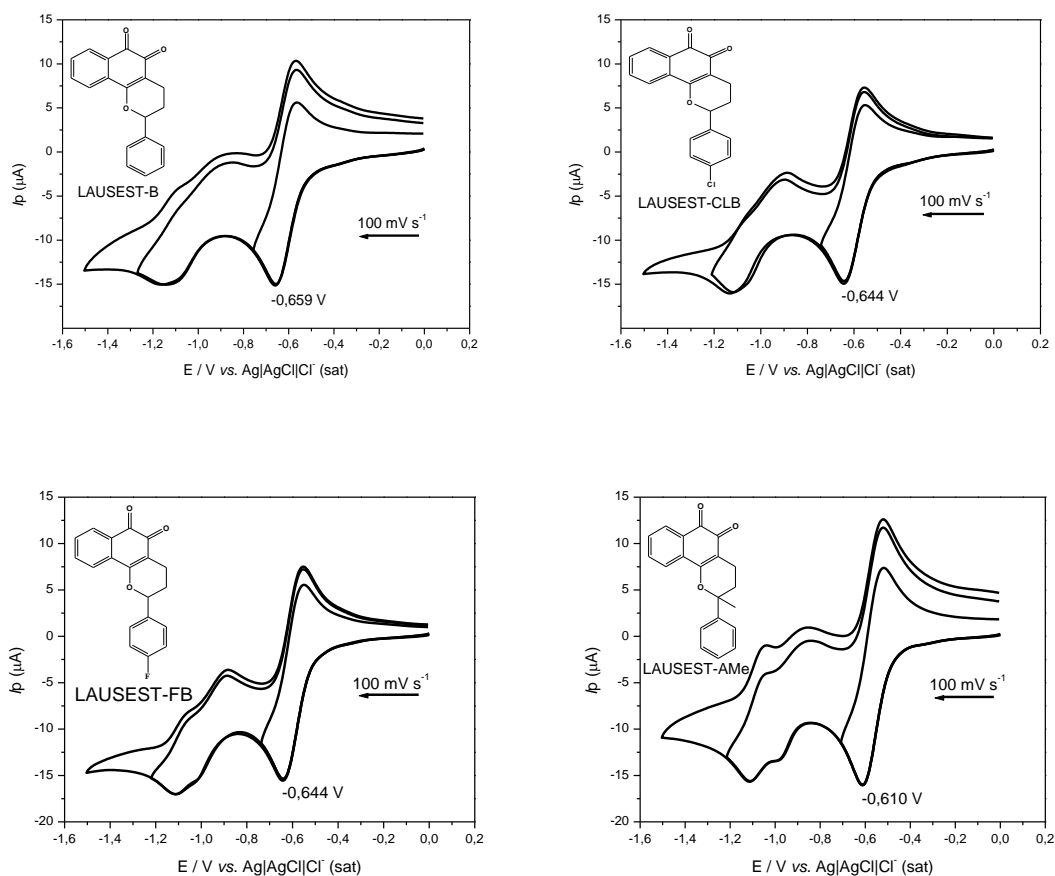
A análise do potencial de redução da primeira onda em função do  $\log$  da velocidade de varredura demonstrou a presença do efeito de queda ôhmica, em velocidades acima de  $1 \text{ V s}^{-1}$ , caracterizado pelo deslocamento do potencial de redução para potenciais mais negativos em função de altas velocidades de varredura.

A Figura 8 mostra os voltamogramas, (meio aprótico, DMF/TBAP  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , eletrodo de carbono vítreo vs Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup>) referentes aos compostos da série LAUSEST e permite sua comparação, visto que mudanças estruturais podem afetar as propriedades redox. O efeito de grupos substituintes em uma série de substâncias derivadas de um mesmo núcleo pode ser relacionado com parâmetros eletroquímicos, pois em termos qualitativos, a presença de grupos eletrodoadores dificulta o processo de redução e grupos eletrorretiradores facilitam este processo (GOULART *et al.*, 1997).

Os estudos, a seguir, foram realizados em função da velocidade de varredura, entretanto, para fins demonstrativos, os voltamogramas estão apresentados na velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$  (Figura 8).

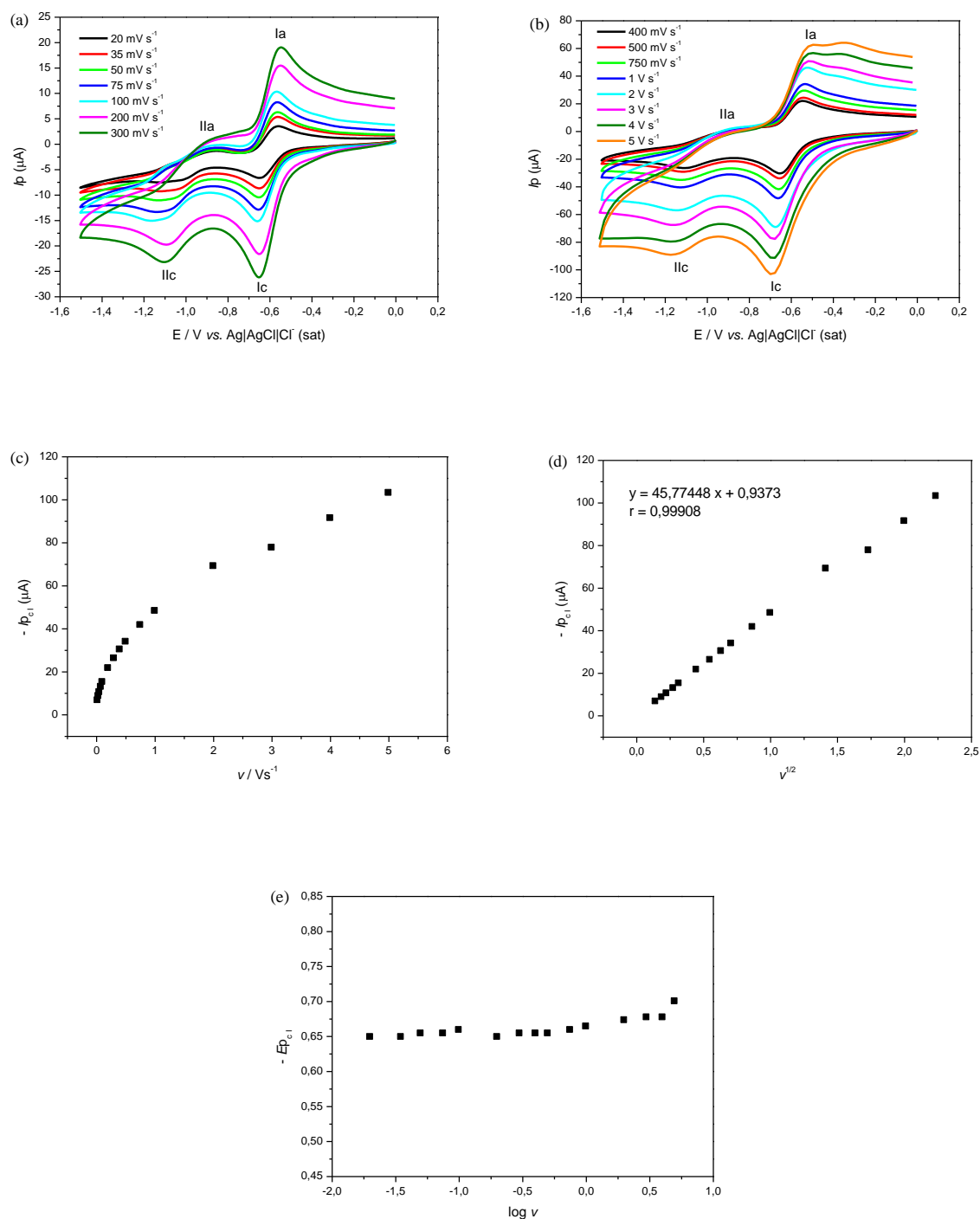
Como os potenciais de redução ou de oxidação de algumas substâncias, obtidos por meio de técnicas eletroquímicas, podem fornecer informações sobre a viabilidade dos processos de transferência eletrônica *in vivo* ou *in vitro*, correlações

entre potencial de pico catódico, potencial redox e atividades biológicas demonstram a relevância de estudos eletroquímicos como ferramentas úteis para colaborar com uma possível elucidação de um mecanismo de ação de fármacos e no planejamento de compostos biologicamente ativos [DE ABREU, 2002a].

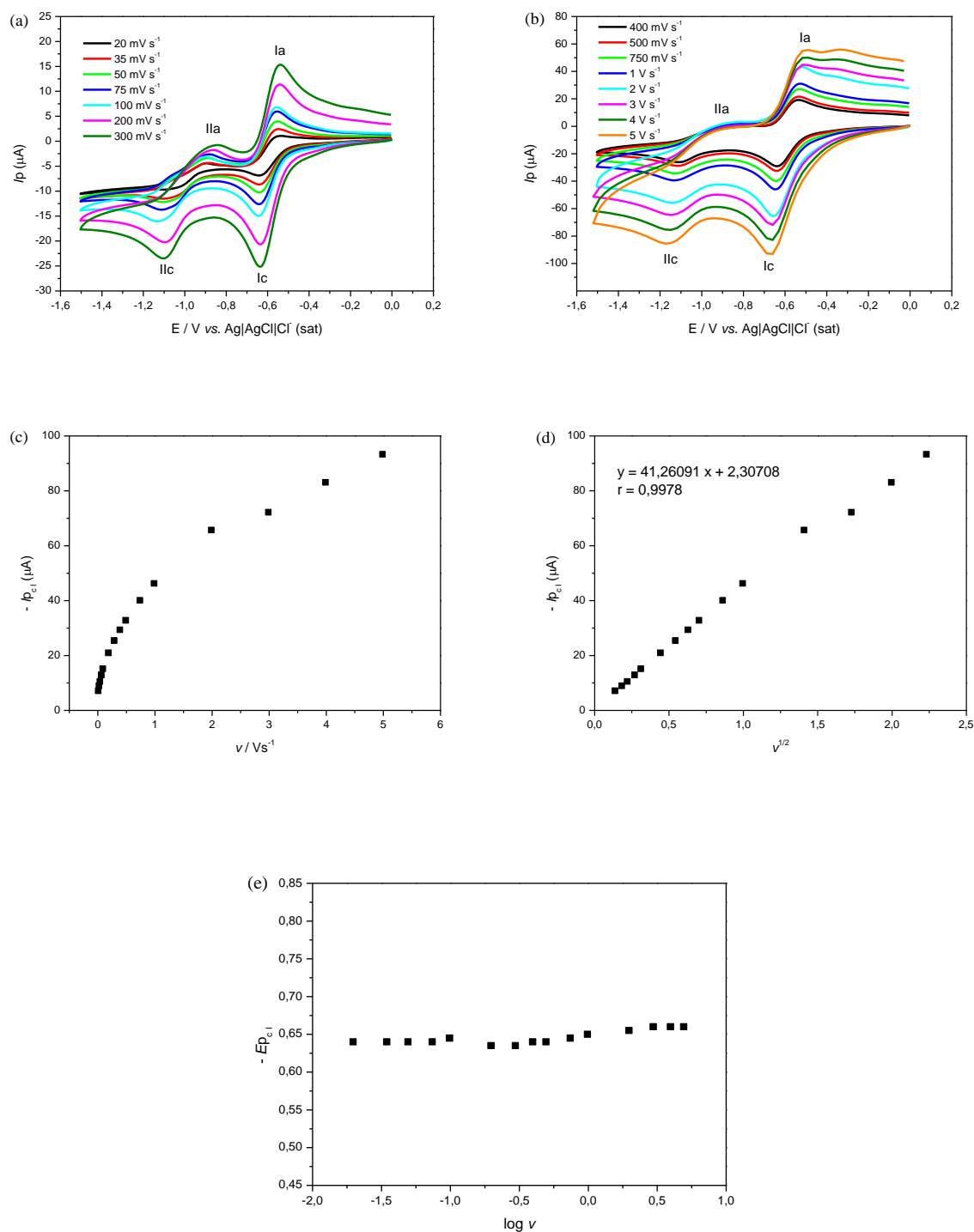


**Figura 8.** Voltamogramas cíclicos dos compostos da série LAUSEST em DMF/TBAP ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ );  $[\text{LAUSET}] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ; Eletrodo de CV.  $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ .

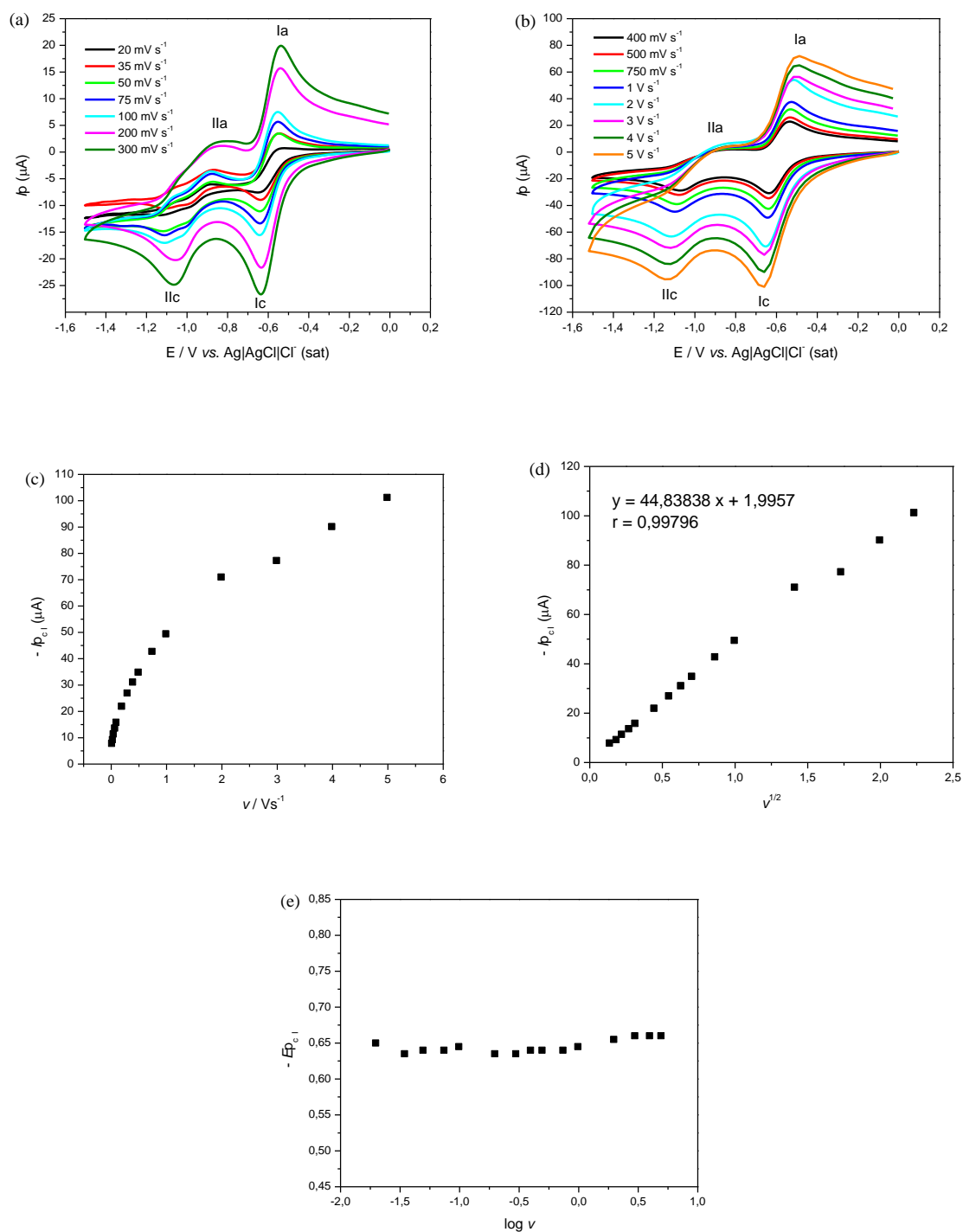
Em seguida encontram-se os gráficos (Figuras 09, 10, 11 e 12): valores de intensidade de corrente em função da velocidade de varredura e também em função da raiz quadrada da velocidade de varredura, da análise do potencial de redução de primeira onda ( $I_c$ ) em função do  $\log$  da velocidade de varredura para cada composto, como também as tabelas (02, 03, 04 e 05) onde estão apresentados os resultados correspondentes aos parâmetros eletroquímicos obtidos do estudo em função da velocidade de varredura ( $\nu$ ) para cada substância, individualmente.



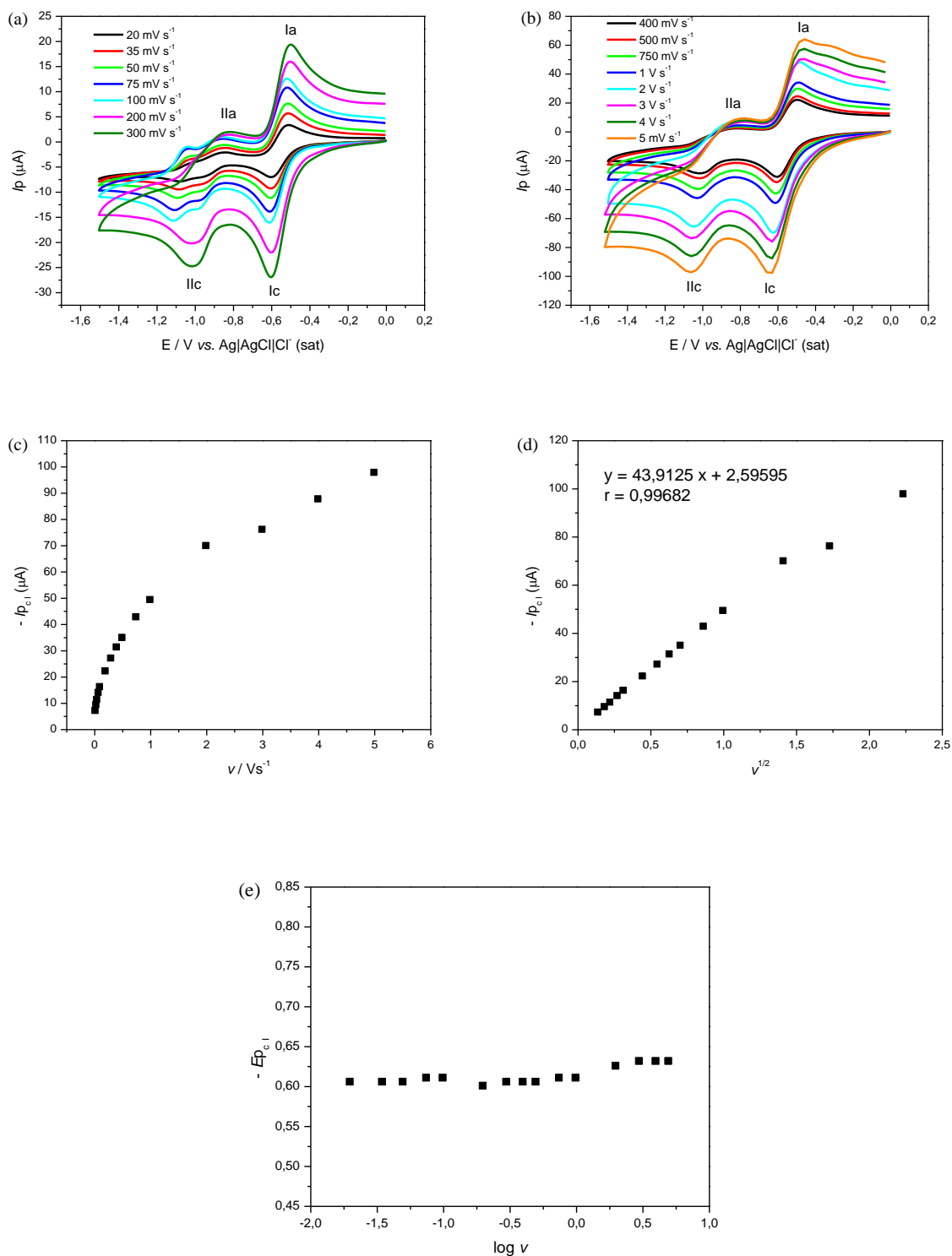
**Figura 9.** (a) e (b) Voltamogramas cíclicos de LAUSEST-B em função da velocidade de varredura; (c) gráfico de  $i_{p_c}$  vs.  $\nu$ ; (d) gráfico de  $i_{p_c}$  vs.  $\nu^{1/2}$ ; (e) gráfico de  $E_{p_c}$  vs.  $\log \nu$ . [LAUSEST-B] = 1,0 mmol L<sup>-1</sup> em DMF/TPAP (0,1 mol L<sup>-1</sup>); eletrodo de CV.



**Figura 10.** (a) e (b) Voltamogramas cíclicos de LAUSEST-CLB em função da velocidade de varredura; (c) gráfico de  $i_{p_c}$  vs.  $v$ ; (d) gráfico de  $i_{p_c}$  vs.  $v^{1/2}$ ; (e) gráfico de  $E_{p_c}$  vs.  $\log v$ . [LAUSEST-CLB] = 1,0  $\text{mmol L}^{-1}$  em DMF/TPAP (0,1  $\text{mol L}^{-1}$ ); eletrodo de CV.



**Figura 11.** (a) e (b) Voltamogramas cíclicos de LAUSEST-FB em função da velocidade de varredura; (c) gráfico de  $i_{p_c}$  vs.  $\nu$ ; (d) gráfico de  $i_{p_c}$  vs.  $\nu^{1/2}$ ; (e) gráfico de  $E_{p_c}$  vs.  $\log \nu$ . [LAUSEST-FB] =  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em DMF/TPAP ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ); eletrodo de CV.



**Figura 12.** (a) e (b) Voltamogramas cíclicos de LAUSEST-AMe em função da velocidade de varredura; (c) gráfico de  $i_{p_c}$  vs.  $v$ ; (d) gráfico de  $i_{p_c}$  vs.  $v^{1/2}$ ; (e) gráfico de  $E_{p_c}$  vs.  $\log v$ . [LAUSEST-AMe] = 1,0  $\text{mmol L}^{-1}$  em DMF/TPAP (0,1  $\text{mol L}^{-1}$ ); eletrodo de CV.



**Tabela 2.** Parâmetros eletroquímicos obtidos para LAUSEST-B em meio aprótico. Estudo em função da velocidade de varredura.  $E_{pc}$  vs.  $Ag|AgCl|Cl^-$  (sat.).

$\nu$ (V s <sup>-1</sup> )	- $E_{pc_1}$ (V)	$E_{pc_1} - E_{pc_1 1/2}$ (V)	- $i_{pc_1}$ ( $\mu A$ )	- $E_{pa_1}$ (V)
0,020	0,649	0,072	6,619	0,561
0,035	0,649	0,074	8,654	0,561
0,050	0,654	0,071	10,433	0,561
0,075	0,654	0,071	12,857	0,566
0,100	0,659	0,071	15,148	0,566
0,200	0,649	0,073	21,582	0,546
0,300	0,654	0,071	26,165	0,546
0,400	0,654	0,071	30,255	0,546
0,500	0,654	0,084	33,865	0,541
0,750	0,659	0,083	41,668	0,537
1,000	0,664	0,088	48,214	0,532
2,000	0,673	0,103	69,002	0,522
3,000	0,677	0,099	77,636	0,519
4,000	0,677	0,097	91,339	0,496
5,000	0,700	0,119	103,057	0,496

**Tabela 3.** Parâmetros eletroquímicos obtidos para LAUSEST-CLB em meio aprótico. Estudo em função da velocidade de varredura.  $E_{pc}$  vs.  $Ag|AgCl|Cl^-$  (sat.).

$\nu$ (V s <sup>-1</sup> )	- $E_{pc_1}$ (V)	$E_{pc_1} - E_{pc_1 1/2}$ (V)	- $i_{pc_1}$ ( $\mu A$ )	- $E_{pa_1}$ (V)
0,020	0,639	0,073	6,863	0,537
0,035	0,639	0,068	8,663	0,546
0,050	0,639	0,079	10,250	0,551
0,075	0,639	0,079	12,609	0,556
0,100	0,644	0,068	14,947	0,556
0,200	0,634	0,068	20,645	0,541
0,300	0,634	0,068	25,146	0,537
0,400	0,639	0,073	29,061	0,537
0,500	0,639	0,068	32,501	0,532
0,750	0,644	0,078	39,840	0,532
1,000	0,649	0,089	45,977	0,527
2,000	0,654	0,083	65,429	0,522
3,000	0,659	0,088	71,868	0,516
4,000	0,659	0,103	82,794	0,516
5,000	0,659	0,081	93,017	0,487

**Tabela 4.** Parâmetros eletroquímicos obtidos para LAUSEST-FB em meio aprótico. Estudo em função da velocidade de varredura.  $E_{pc}$  vs.  $Ag|AgCl|Cl^-$  (sat.).

$\nu$ ( $V s^{-1}$ )	$-E_{pc_1}$ (V)	$E_{pc_1} - E_{pc_1/2}$ (V)	$-I_{pc_1}$ ( $\mu A$ )	$-E_{pa_1}$ (V)
0,020	0,649	0,086	7,559	0,522
0,035	0,634	0,081	8,953	0,541
0,050	0,639	0,080	11,093	0,546
0,075	0,639	0,077	13,360	0,551
0,100	0,644	0,076	15,554	0,551
0,200	0,634	0,075	21,655	0,537
0,300	0,634	0,071	26,666	0,537
0,400	0,639	0,080	30,804	0,537
0,500	0,639	0,071	34,579	0,537
0,750	0,639	0,080	42,504	0,532
1,000	0,644	0,076	49,172	0,527
2,000	0,654	0,095	70,739	0,517
3,000	0,659	0,091	76,995	0,516
4,000	0,659	0,091	89,874	0,487
5,000	0,659	0,080	100,952	0,487

**Tabela 5.** Parâmetros eletroquímicos obtidos para LAUSEST-AMe em meio aprótico. Estudo em função da velocidade de varredura.  $E_{pc}$  vs.  $Ag|AgCl|Cl^-$  (sat.).

$\nu$ ( $V s^{-1}$ )	$-E_{pc_1}$ (V)	$E_{pc_1} - E_{pc_1/2}$ (V)	$-I_{pc_1}$ ( $\mu A$ )	$-E_{pa_1}$ (V)
0,020	0,605	0,071	6,988	0,512
0,035	0,605	0,081	9,249	0,512
0,050	0,605	0,065	11,154	0,512
0,075	0,610	0,067	13,861	0,517
0,100	0,610	0,063	16,055	0,512
0,200	0,600	0,056	21,997	0,502
0,300	0,605	0,066	26,919	0,498
0,400	0,605	0,062	31,124	0,498
0,500	0,605	0,069	34,750	0,498
0,750	0,610	0,070	42,639	0,493
1,000	0,610	0,067	49,179	0,488
2,000	0,625	0,069	69,763	0,483
3,000	0,631	0,067	75,958	0,458
4,000	0,631	0,063	87,554	0,458
5,000	0,631	0,059	97,625	0,458

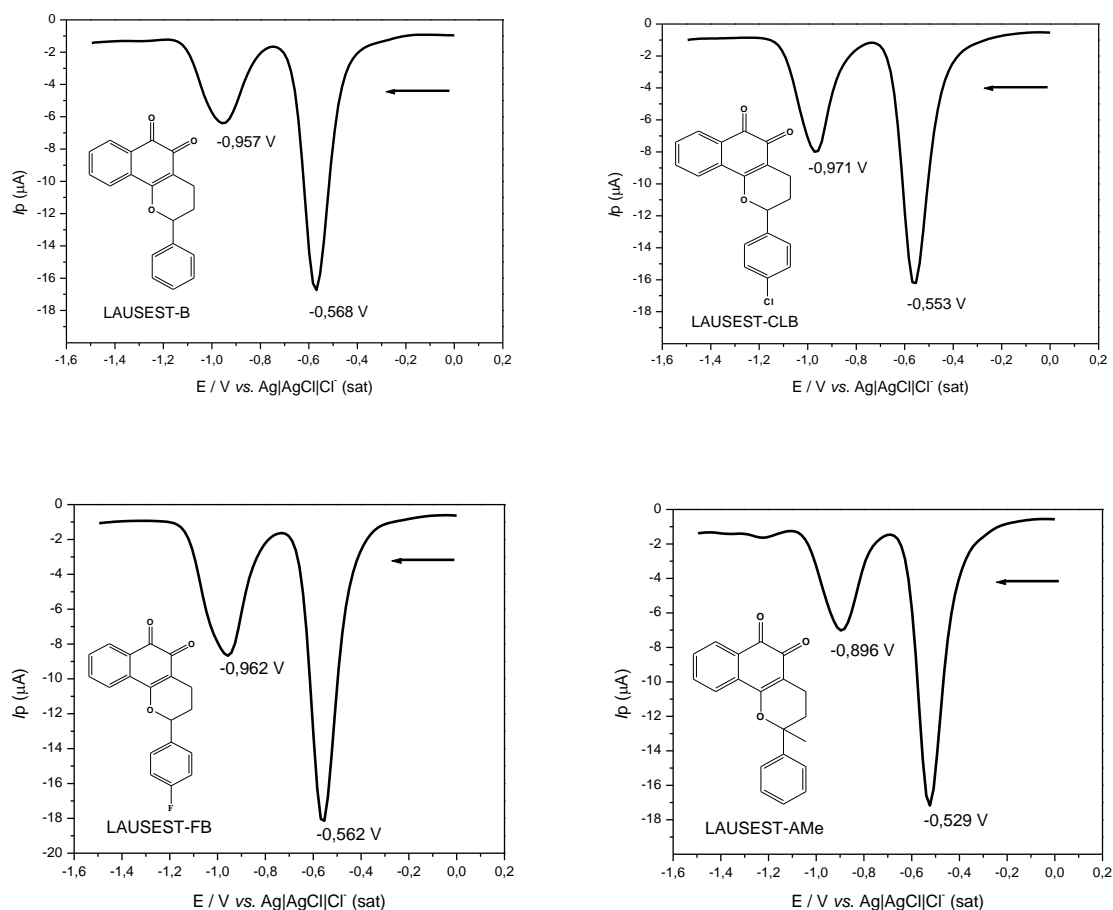
Em suma, observou-se que os compostos da série LAUSEST apresentaram um comportamento voltamétrico diferente de seu precursor,  $\beta$ -lapachona, evidenciando que apesar do substituinte não ter influência direta no centro redox da molécula (potenciais de redução semelhantes), este pode atuar na estabilidade das espécies eletrogeradas.

Na Figura 13 estão dispostos os voltamogramas de Pulso Diferencial (VPD) dos compostos da série LAUSEST, apresentando duas ondas de redução, conforme descrito anteriormente. Ao comparar a ordem de facilidade de redução, em meio aprótico, observa-se que LAUSEST-B apresenta um potencial de pico de redução de primeira onda ( $E_{p_{lc}}$ ) em -0,568V, enquanto seus análogos, LAUSEST-CLB e LAUSEST-FB, reduzem mais facilmente em -0,553 V e -0,562 V, respectivamente, devido ao efeito indutivo *para* retirador dos substituintes halogenados.

Já, ao comparar a facilidade de redução de LAUSEST-B ( $E_{p_{lc}} = -0,568V$ ) com LAUSEST-AMe ( $E_{p_{lc}} = -0,529 V$ ), observa-se uma diferença de 39 mV, de modo que o processo de redução de LAUSEST-AMe é facilitado, provavelmente, devido ao efeito estérico da metila ( $-CH_3$ ) no C-2 do anel piranosílico.

A comparação dos perfis voltamétricos dos compostos da série LAUSEST apresentou comportamento similar, pois a natureza reversível dos dois processos de redução, verificada entre outras características pelo  $\Delta E_p$  ( $E_{p_{lc}} - E_{p_{la}}$ ) e pela proporção de intensidade das correntes catódicas e anódicas, são explicadas pelas possíveis reações químicas acopladas, que no caso de quinonas estão, na maioria das vezes, relacionadas às reações de desproporcionamento ou à possibilidade de protonação ou formação de ligação de hidrogênio do diânion da quinona (espécie básica), com água residual ou outras fontes de prótons (CHAMBERS *et al.*, 1974).

As mudanças estruturais podem afetar curvas voltamétricas de diferentes maneiras. Elas podem causar deslocamentos em potenciais redox, afetar os coeficientes de difusão, com reflexos em correntes-limite e, além disso, podem ocasionar mudanças no mecanismo eletródico, na reversibilidade e na cinética de reações. No entanto, para a série LAUSEST, não se observou mudanças no comportamento voltamétrico dos compostos.



**Figura 13.** Voltamogramas de Pulso Diferencial (VPD) dos compostos da série LAUSEST.  $[LAUSEST] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em DMF/TPAP ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ); eletrodo de CV;  $\nu = 15 \text{ mV s}^{-1}$ .

O coeficiente de difusão ( $D_o$ ) dos compostos da série LAUSEST foi determinado em meio aprótico, na concentração de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em DMF/TPAP ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e eletrodo de CV com área de  $0,02 \text{ cm}^2$ , de acordo com a equação de Randles Sevcik (Equação 2), descrita na literatura para processos reversíveis controlados por difusão (BARD & FAULKNER, 1990).

$$I_p = 2,69 \times 10^5 \times n^{3/2} \times A \times D_o^{1/2} \times C \times \nu^{1/2} \quad (\text{Equação 2}),$$

onde:

$C$  = concentração ( $\text{mol/cm}^3$ )

$A$  = área do eletrodo ( $\text{cm}^2$ )

$D_o$  = coeficiente de difusão ( $\text{cm}^2/\text{s}$ )

$\nu$  = velocidade de varredura (V/s)

$n$  = número de elétrons envolvidos na etapa de redução

$I_p$  = intensidade de pico de corrente (A)

**Tabela 6.** Coeficiente de difusão ( $D_o$ ) da série LAUSEST em meio aprótico.

LAUSEST	$D_{lc} \text{ (cm}^2 \text{ s}^{-1}\text{)}$
B	0,092
CLB	0,087
FB	0,091
AMe	0,090

Como mostra a Tabela 6, o coeficiente de difusão obtido para cada composto da série LAUSEST são similares, demonstrando que a mudança de substituinte não afetou o processo de difusão das espécies eletrogeradas.

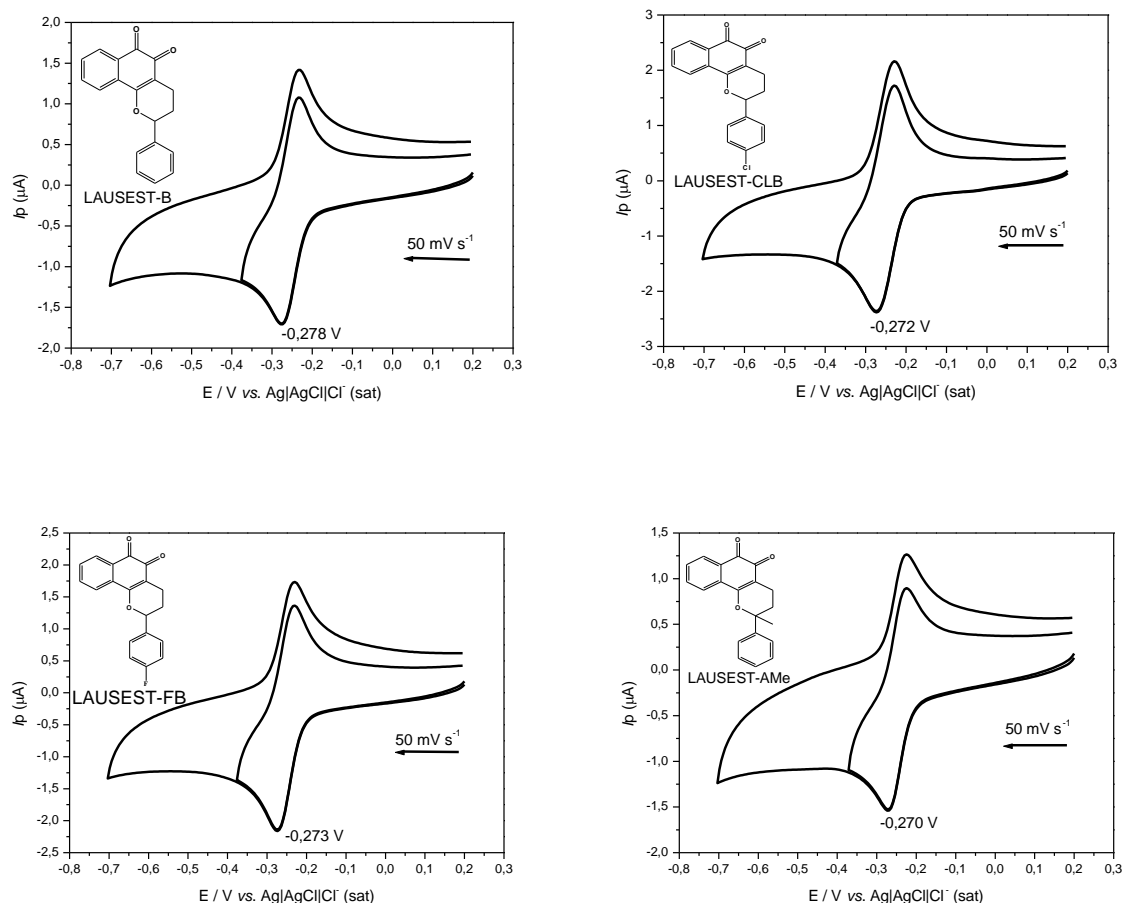
#### 4.1.2 Meio Prótico

Com o objetivo de simular um ambiente hidrofílico, assim como a maioria dos fluidos biológicos, os estudos voltamétricos também foram realizados em meio aquoso etanólico tamponado, tampão fosfato pH 7,0.

Os voltamogramas cíclicos dos compostos da série LAUSEST, em meio prótico, conforme as Figuras 14, 15, 16, 17 e 18, apresentaram, para cada um dos compostos, uma única onda catódica, com característica de reversibilidade, observada pela presença de correspondente onda anódica e pela pequena variação dos potenciais de pico catódico, com o aumento da velocidade de varredura.

Esses resultados estão condizentes com os dados da literatura onde a redução de quinonas em meio prótico ocorre em uma etapa de redução, reversível, sendo esta redução bieletrônica, com participação de dois prótons, havendo, desta forma, a formação da hidroquinona em uma etapa eletroquímica única [CHAMBERS *et al.*, 1974; DE ABREU, 2007].

Os estudos, a seguir, foram realizados em função da velocidade de varredura, entretanto, para fins demonstrativos, os voltamogramas estão apresentados na velocidade de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , como mostra a Figura 14.



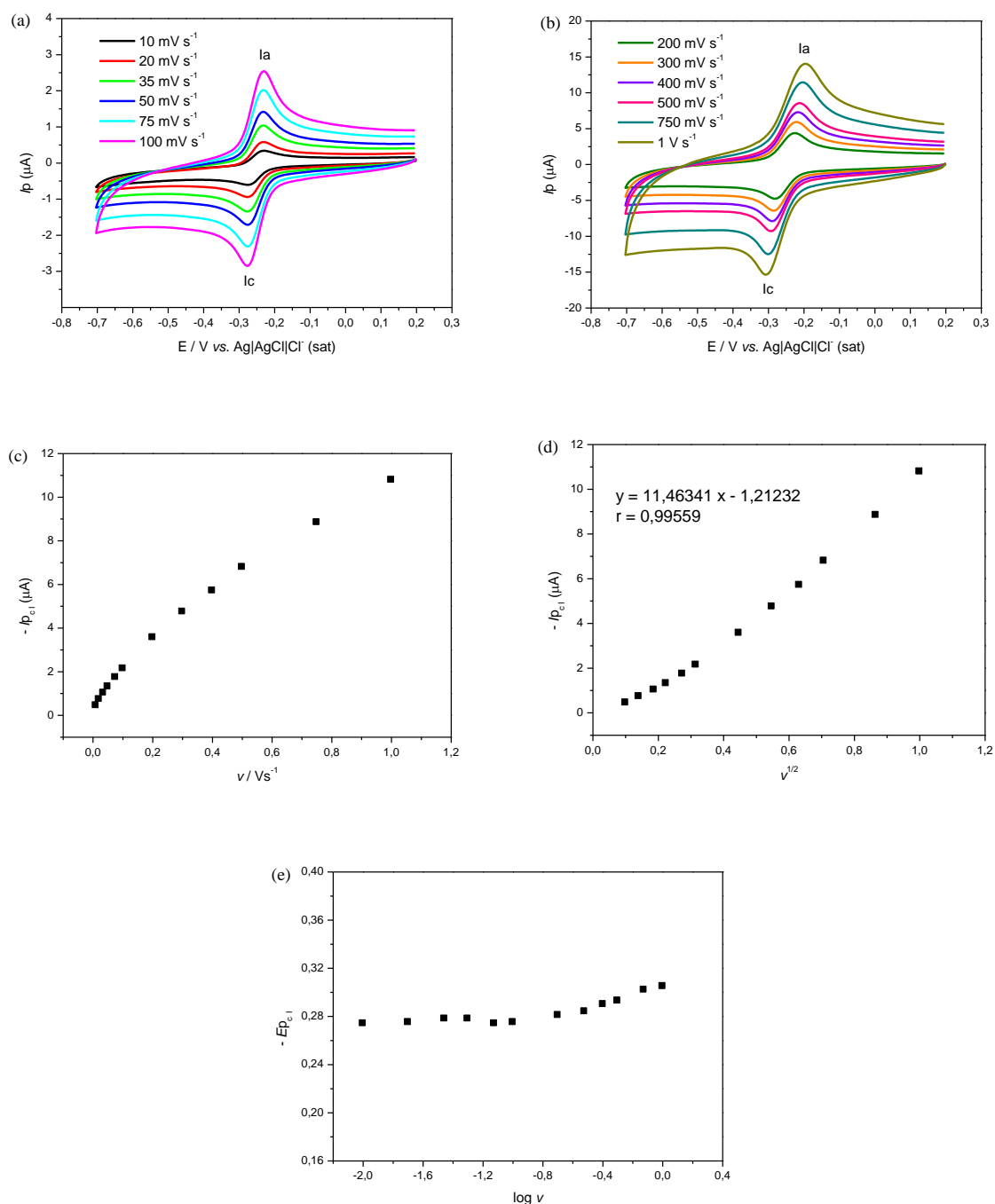
**Figura 14.** Voltamogramas cíclicos dos compostos da série LAUSEST em tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0, 30% (v/v) de EtOH; [LAUSEST] = 0,05 mmol L<sup>-1</sup>; Eletrodo de CV.  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

De posse dos valores de intensidade de corrente, para a onda catódica, obtidos a partir do estudo voltamétrico em função da velocidade de varredura, foi possível analisar o transporte de massas através do sistema, sendo este, caracterizado como difusional.

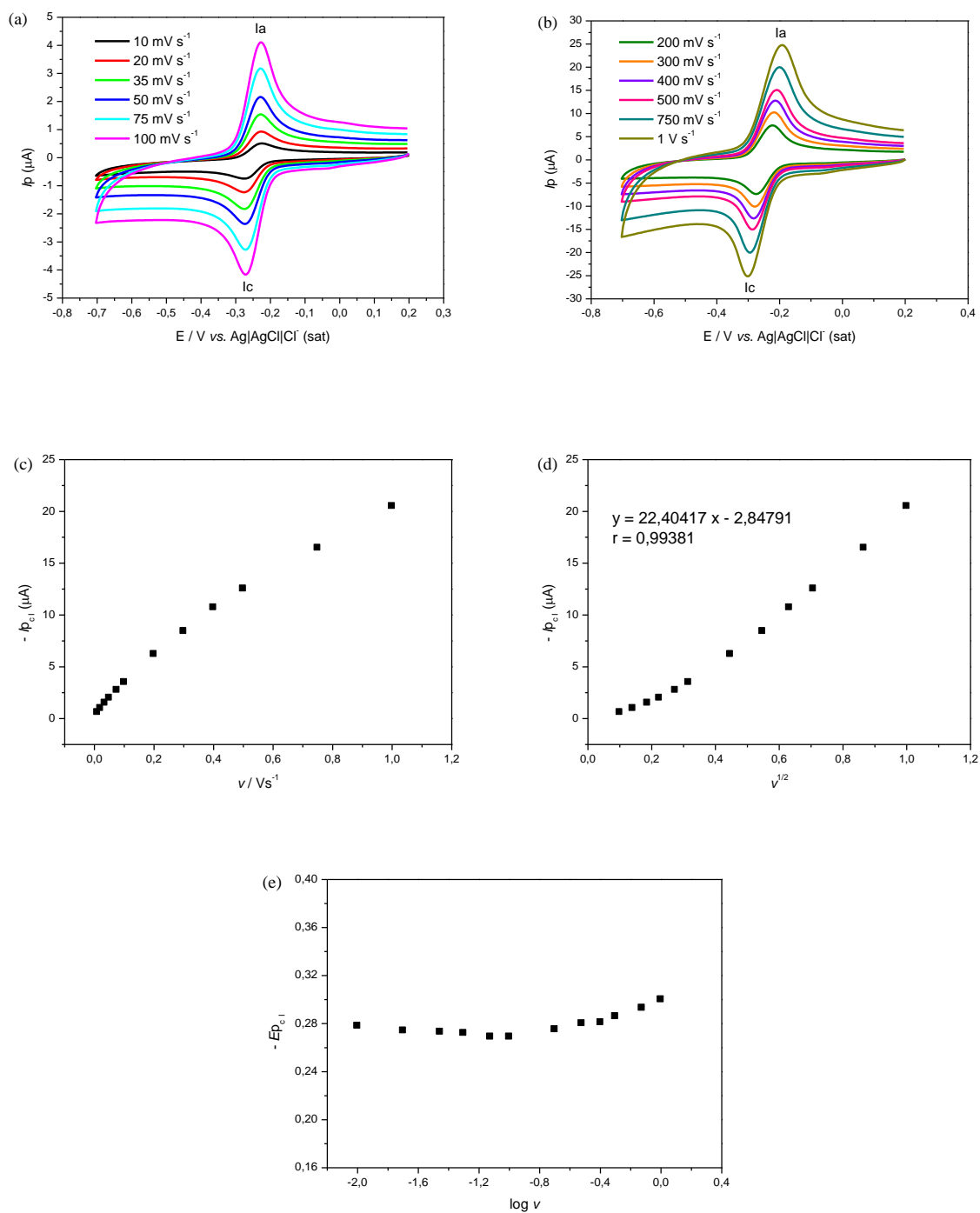
Outro aspecto observado, assim como em meio aprótico, foi à presença de queda ôhmica em velocidades acima de 100 mV s<sup>-1</sup>. Este efeito está relacionado ao aumento da resistividade que, geralmente, ocorre em altas velocidades de varredura devido ao aumento da concentração da espécie eletrogerada.

Em seguida encontram-se os gráficos (Figuras 15, 16, 17 e 18): valores de intensidade de corrente em função da velocidade de varredura e também em função da raiz quadrada da velocidade de varredura, da análise do potencial de redução ( $I_c$ ) em função do  $\log$  da velocidade de varredura para cada composto, como também as tabelas (07, 08, 09 e 10) onde estão apresentados os resultados correspondentes

aos parâmetros eletroquímicos obtidos do estudo em função da velocidade de varredura ( $\nu$ ) para cada composto, individualmente.

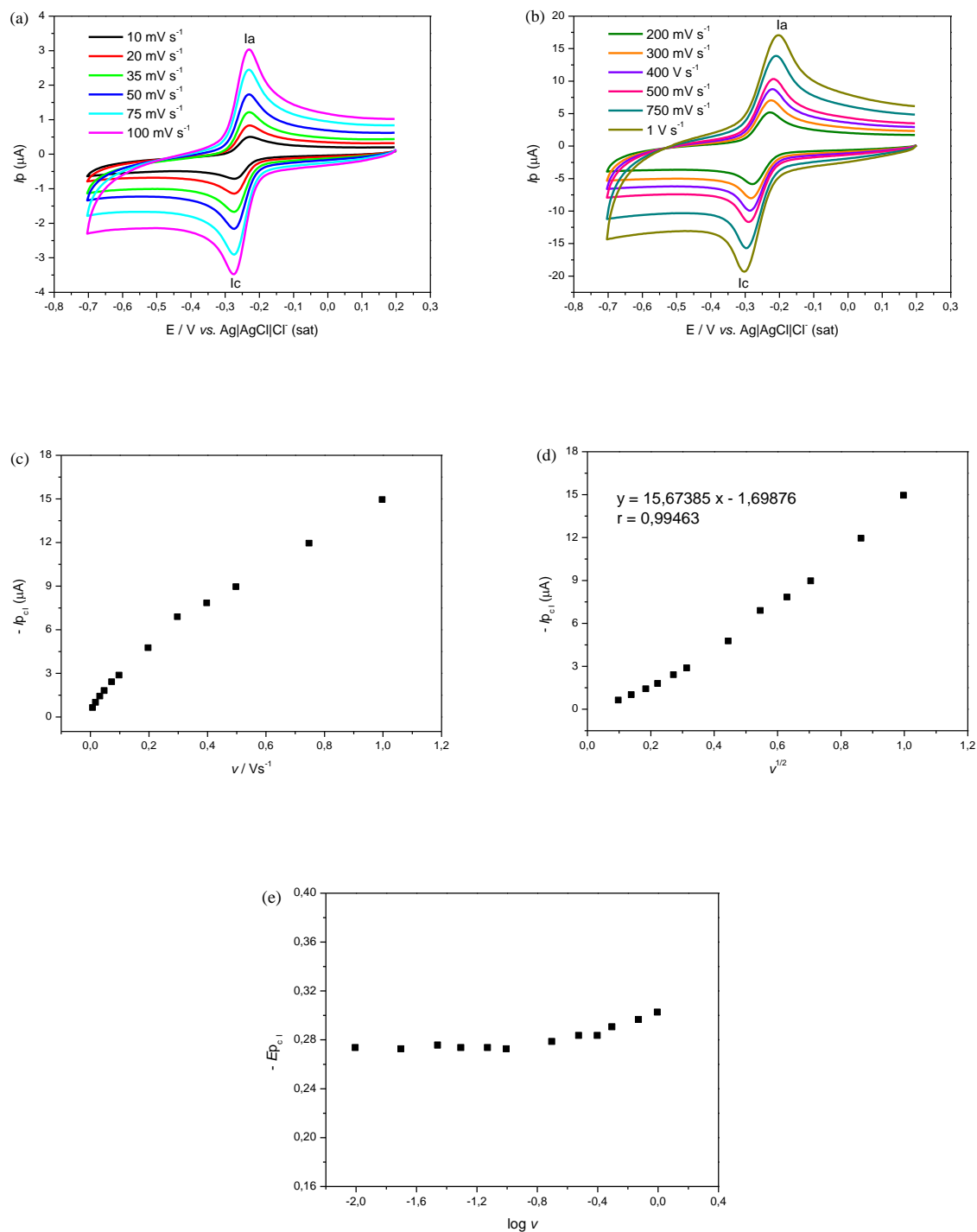


**Figura 15.** (a) Voltamogramas cíclicos de LAUSEST-B. (b) gráfico de  $i_p$  vs.  $\nu$ ; (c) gráfico de  $i_p$  vs.  $\nu^{1/2}$ ; (d) gráfico de  $E_p$  vs.  $\log \nu$ . [LAUSEST-B] = 0,05  $\text{mmol L}^{-1}$ . Tampão fosfato 0,2  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 7,0, 30% (v/v) de EtOH; eletrodo de CV

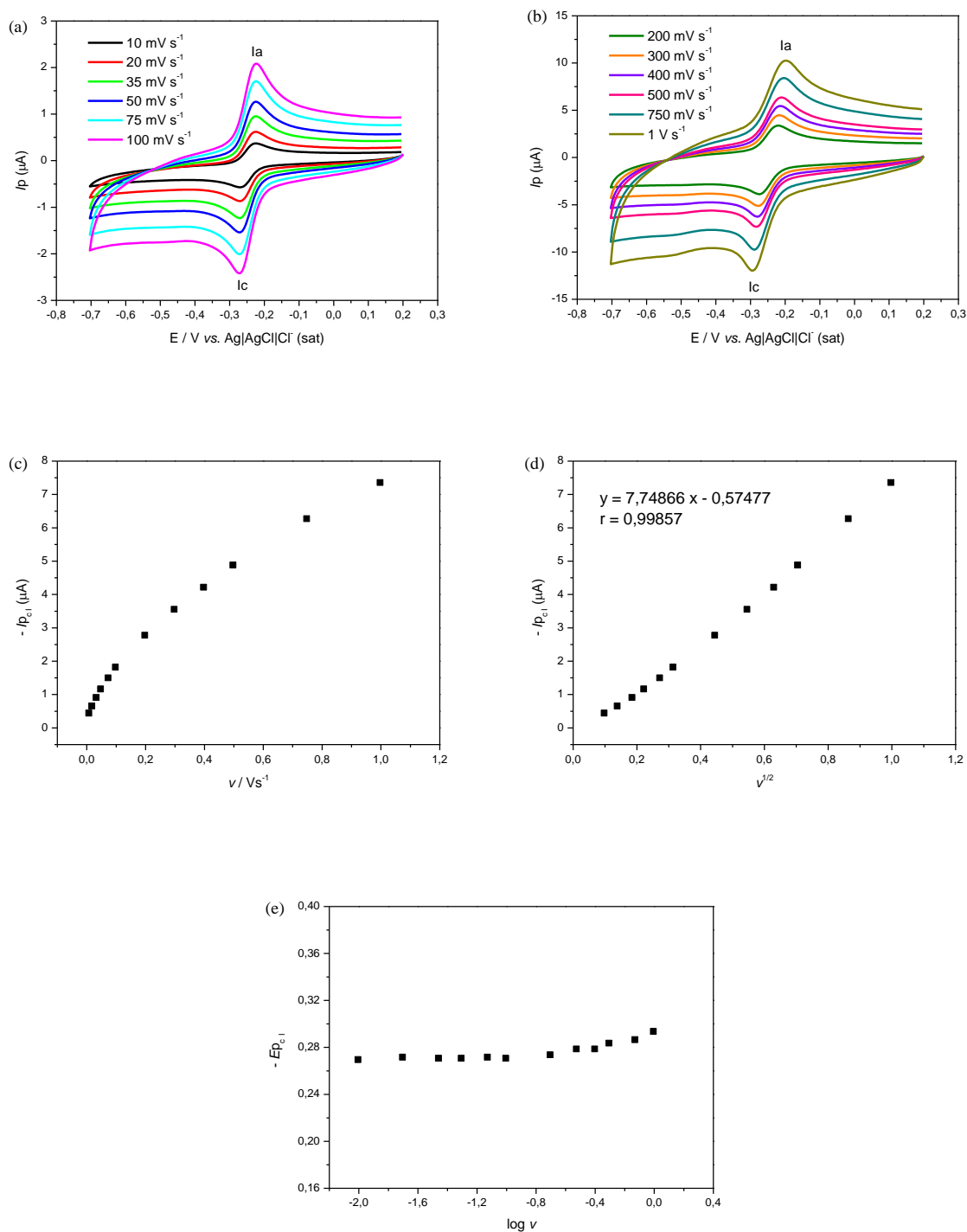


**Figura16.** (a) Voltamogramas cíclicos de LAUSEST-CLB. (b) gráfico de  $I_{p_c}$  vs.  $\nu$ ; (c) gráfico de  $I_{p_c}$  vs.  $\nu^{1/2}$ ; (d) gráfico de  $E_{p_c}$  vs.  $\log \nu$ . [LAUSEST-CLB] = 0,05 mmol L<sup>-1</sup>. Tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0, 30% (v/v) de EtOH; eletrodo de CV.





**Figura 17.** (a) Voltamogramas cíclicos de LAUSEST-FB. (b) gráfico de  $i_p$  vs.  $\nu$ ; (c) gráfico de  $i_p$  vs.  $\nu^{1/2}$ ; (d) gráfico de  $E_{p_c}$  vs.  $\log \nu$ . [LAUSEST-FB] = 0,05  $\text{mmol L}^{-1}$ . Tampão fosfato 0,2  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 7,0, 30% (v/v) de EtOH; eletrodo de CV.



**Figura 18.** (a) Voltamogramas cíclicos de LAUSEST-AMe. (b) gráfico de  $I_{p_c}$  vs.  $\nu$ ; (c) gráfico de  $I_{p_c}$  vs.  $\nu^{1/2}$ ; (d) gráfico de  $E_{p_c}$  vs.  $\log \nu$ . [LAUSEST-AMe] = 0,05 mmol L<sup>-1</sup>. Tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0, 30% (v/v) de EtOH; eletrodo de CV.

**Tabela 7.** Parâmetros eletroquímicos obtidos para LAUSEST-B em meio prótico. Estudo em função da velocidade de varredura.  $E_{pc}$  vs.  $Ag|AgCl|Cl^-$  (sat.).

$\nu$ (V s <sup>-1</sup> )	$\nu^{1/2}$ (V s <sup>-1</sup> )	$\log \nu$	$-E_{pc_1}$ (V)	$E_{pc_1} - E_{pc_{1/2}}$ (V)	$-I_{pc_1}$ ( $\mu A$ )	$-E_{pa_1}$ (V)	$I_{pa}/I_{pc}$
0,010	0,100	-2,000	0,274	0,034	0,453	0,232	0,820
0,020	0,141	-1,699	0,275	0,034	0,733	0,231	0,926
0,035	0,187	-1,456	0,278	0,040	1,025	0,231	1,014
0,050	0,224	-1,301	0,278	0,040	1,308	0,231	1,039
0,075	0,274	-1,125	0,274	0,039	1,739	0,231	1,082
0,100	0,316	-1,000	0,275	0,037	2,144	0,228	1,088
0,200	0,447	-0,699	0,281	0,040	3,570	0,226	0,995
0,300	0,548	-0,522	0,284	0,037	4,747	0,219	0,941
0,400	0,632	-0,398	0,290	0,040	5,708	0,216	1,024
0,500	0,707	-0,301	0,293	0,041	6,784	0,210	1,030
0,750	0,866	-0,125	0,302	0,043	8,840	0,200	1,017
1,000	1,000	0,000	0,305	0,049	10,785	0,195	1,001

**Tabela 8.** Parâmetros eletroquímicos obtidos para LAUSEST-CLB em meio prótico. Estudo em função da velocidade de varredura.  $E_{pc}$  vs.  $Ag|AgCl|Cl^-$  (sat.).

$\nu$ (V s <sup>-1</sup> )	$\nu^{1/2}$ (V s <sup>-1</sup> )	$\log \nu$	$-E_{pc_1}$ (V)	$E_{pc_1} - E_{pc_{1/2}}$ (V)	$-I_{pc_1}$ ( $\mu A$ )	$-E_{pa_1}$ (V)	$I_{pa}/I_{pc}$
0,010	0,100	-2,000	0,278	0,044	0,596	0,222	0,921
0,020	0,141	-1,699	0,274	0,037	0,993	0,226	0,994
0,035	0,187	-1,456	0,273	0,042	1,512	0,228	1,077
0,050	0,224	-1,301	0,272	0,040	1,988	0,228	1,103
0,075	0,274	-1,125	0,269	0,039	2,746	0,227	1,151
0,100	0,316	-1,000	0,269	0,039	3,495	0,228	1,147
0,200	0,447	-0,699	0,275	0,040	6,197	0,223	1,157
0,300	0,548	-0,522	0,280	0,044	8,413	0,218	1,150
0,400	0,632	-0,398	0,281	0,043	10,717	0,214	1,143
0,500	0,707	-0,301	0,286	0,046	12,512	0,209	1,130
0,750	0,866	-0,125	0,293	0,049	16,466	0,199	1,123
1,000	1,000	0,000	0,300	0,053	20,481	0,191	1,115

**Tabela 9.** Parâmetros eletroquímicos obtidos para LAUSEST-FB em meio prótico. Estudo em função da velocidade de varredura.  $E_{pc}$  vs.  $Ag|AgCl|Cl^-$  (sat.).

$\nu$ (V s <sup>-1</sup> )	$\nu^{1/2}$ (V s <sup>-1</sup> )	$\log \nu$	$-E_{pc_1}$ (V)	$E_{pc_1} - E_{pc_{1/2}}$ (V)	$-I_{pc_1}$ ( $\mu A$ )	$-E_{pa_1}$ (V)	$I_{pa}/I_{pc}$
0,010	0,100	-2,000	0,273	0,038	0,588	0,224	0,935
0,020	0,141	-1,699	0,272	0,037	0,959	0,225	0,956
0,035	0,187	-1,456	0,275	0,040	1,376	0,228	1,000
0,050	0,224	-1,301	0,273	0,041	1,750	0,228	1,030
0,075	0,274	-1,125	0,273	0,041	2,363	0,228	1,050
0,100	0,316	-1,000	0,272	0,040	2,828	0,228	1,059
0,200	0,447	-0,699	0,278	0,040	4,712	0,226	1,068
0,300	0,548	-0,522	0,283	0,046	6,843	0,220	1,089
0,400	0,632	-0,398	0,283	0,040	7,788	0,220	1,079
0,500	0,707	-0,301	0,290	0,044	8,911	0,216	1,086
0,750	0,866	-0,125	0,296	0,050	11,898	0,209	1,083
1,000	1,000	0,000	0,302	0,051	14,896	0,202	1,086

**Tabela 10.** Parâmetros eletroquímicos obtidos para LAUSEST-AMe em meio prótico. Estudo em função da velocidade de varredura.  $E_{pc}$  vs.  $Ag|AgCl|Cl^-$  (sat.).

$\nu$ (V s <sup>-1</sup> )	$\nu^{1/2}$ (V s <sup>-1</sup> )	$\log \nu$	$-E_{pc_1}$ (V)	$E_{pc_1} - E_{pc_{1/2}}$ (V)	$-I_{pc_1}$ ( $\mu A$ )	$-E_{pa_1}$ (V)	$I_{pa}/I_{pc}$
0,010	0,100	-2,000	0,269	0,037	0,420	0,224	0,915
0,020	0,141	-1,699	0,271	0,037	0,629	0,224	0,958
0,035	0,187	-1,456	0,270	0,038	0,889	0,224	0,996
0,050	0,224	-1,301	0,270	0,036	1,140	0,224	1,020
0,075	0,274	-1,125	0,271	0,035	1,475	0,221	1,034
0,100	0,316	-1,000	0,270	0,035	1,795	0,221	1,047
0,200	0,447	-0,699	0,273	0,039	2,754	0,220	1,058
0,300	0,548	-0,522	0,278	0,042	3,530	0,213	1,057
0,400	0,632	-0,398	0,278	0,039	4,196	0,211	1,052
0,500	0,707	-0,301	0,283	0,042	4,862	0,209	1,050
0,750	0,866	-0,125	0,286	0,044	6,249	0,204	1,051
1,000	1,000	0,000	0,293	0,041	7,332	0,197	1,046

Como descrito anteriormente, um dos parâmetros que pode ser afetado com mudanças estruturais é o coeficiente de difusão ( $D_o$ ) e, portanto, como mostra a Tabela 11, os coeficientes de difusão obtidos para os compostos da série LAUDEST, em meio prótico (solução etanólica tamponada, tampão fosfato, pH 7,0 e eletrodo de CV com área de  $0,02 \text{ cm}^2$ ), apresentaram valores similares, assim como em meio aprótico.

**Tabela 11.** Coeficiente de difusão ( $D_o$ ) da série LAUDEST em meio prótico.

LAUDEST	$D_{lc} (\text{cm}^2 \text{ s}^{-1})$
B	0,183
CLB	0,257
FB	0,215
AMe	0,151

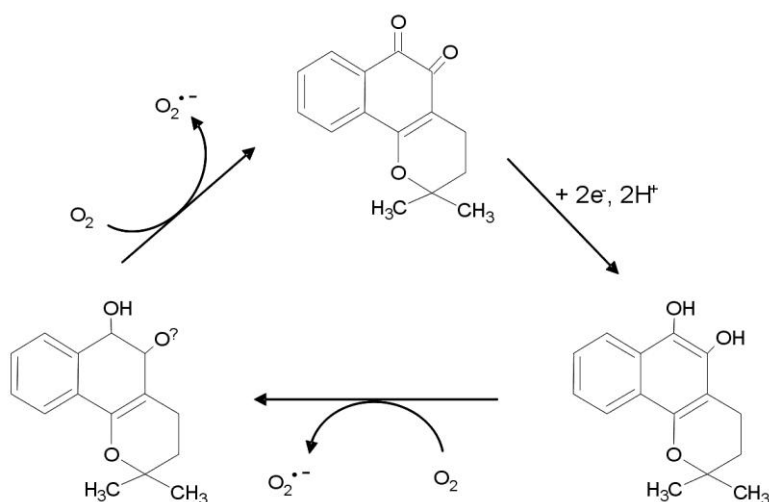
Comparando os valores dos coeficientes de difusão dos derivados da  $\beta$ -lapachona em meio aprótico e meio prótico, observou-se que, neste último, as quinonas em análise apresentaram coeficientes de difusão maiores que em meio aprótico, correspondendo, aproximadamente, ao dobro dos valores obtidos em meio aprótico.

#### 4.1.2.1 Reatividade da Série LAUDEST Frente ao Oxigênio

As quinonas podem ser citotóxicas, com conseqüências benéficas ou deletérias, por inúmeros mecanismos, incluindo ciclagem redox. Assim como a  $\beta$ -lapachona, já descrita na literatura [DE ABREU *et al.*, 2007], seus derivados sintéticos, em sua forma reduzida, apresentaram reatividade, frente ao oxigênio molecular, evidenciada a partir da catálise observada nos experimentos de voltametria cíclica em meio aquoso etanólico tamponado, tampão fosfato pH 7,0, na presença de oxigênio.

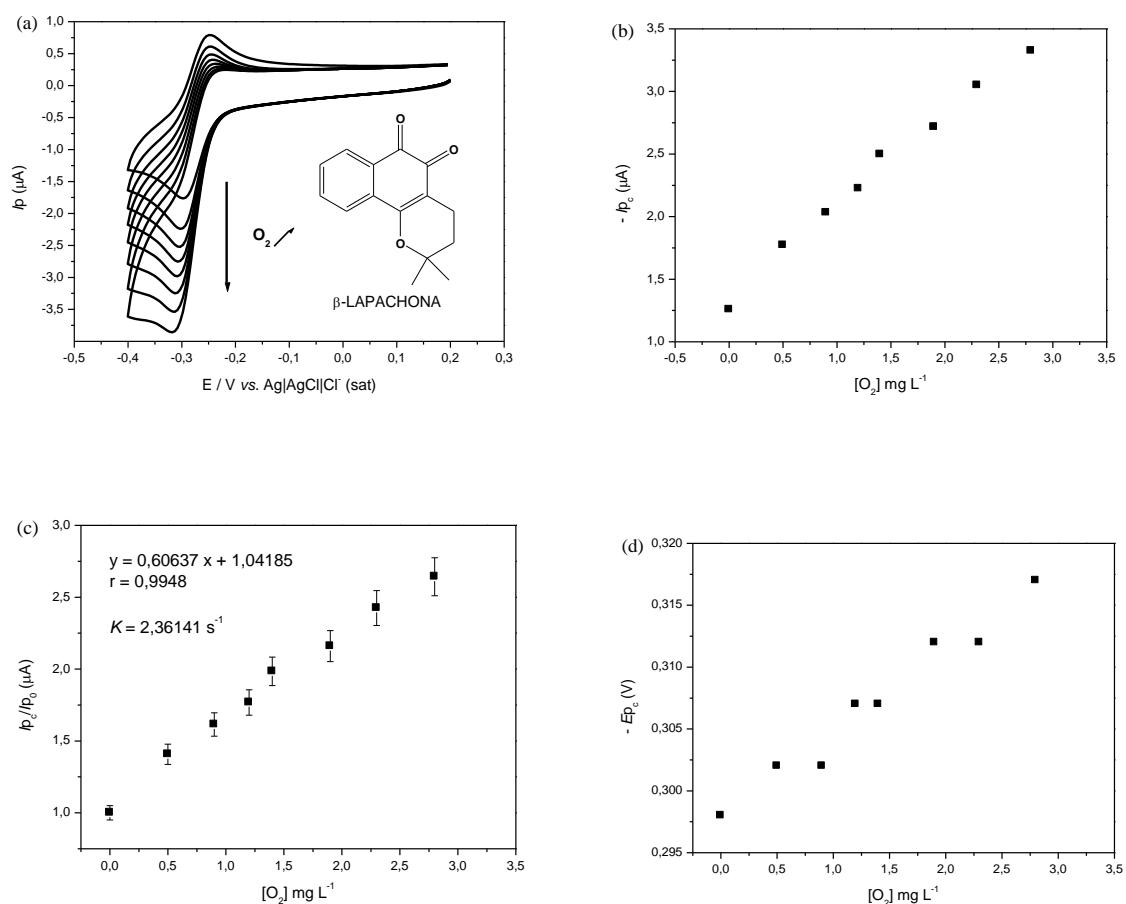
Contudo, como demonstrado nas Figuras 19, 20, 21, 22 e 23 e nas Tabelas 12, 13, 14, 15 e 16, na presença de oxigênio, a corrente de pico de redução dos compostos da série LAUDEST, assim como a  $\beta$ -lapachona, aumenta proporcionalmente à adição de oxigênio no meio e, em contrapartida, a corrente

anódica tende a desaparecer, indicativo de processo catalítico. Isto ocorre devido à reconversão da quinona à hidroquinona, em presença de oxigênio (Equação 3), ocorrendo um ciclo redox que resulta no estresse oxidativo, pois a semiquinona pode reagir com o oxigênio molecular formando o ânion-radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), que subsequente mente leva a um desproporcionamento para formar peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ) [FRY *et al.*, 2006].



Equação 3

Ao comparar a intensidade de corrente catódica e anódica, na presença de oxigênio, entre a  $\beta$ -lapachona e seus análogos observa-se um comportamento diferenciado, visto que, provavelmente a reatividade com o oxigênio da espécie reduzida é influenciada pelo substituinte do anel naftalênico. Este fato pode ser evidenciado a partir dos valores da constante de reatividade com o oxigênio molecular da  $\beta$ -lapachona e seus análogos expressos na Tabela 17.

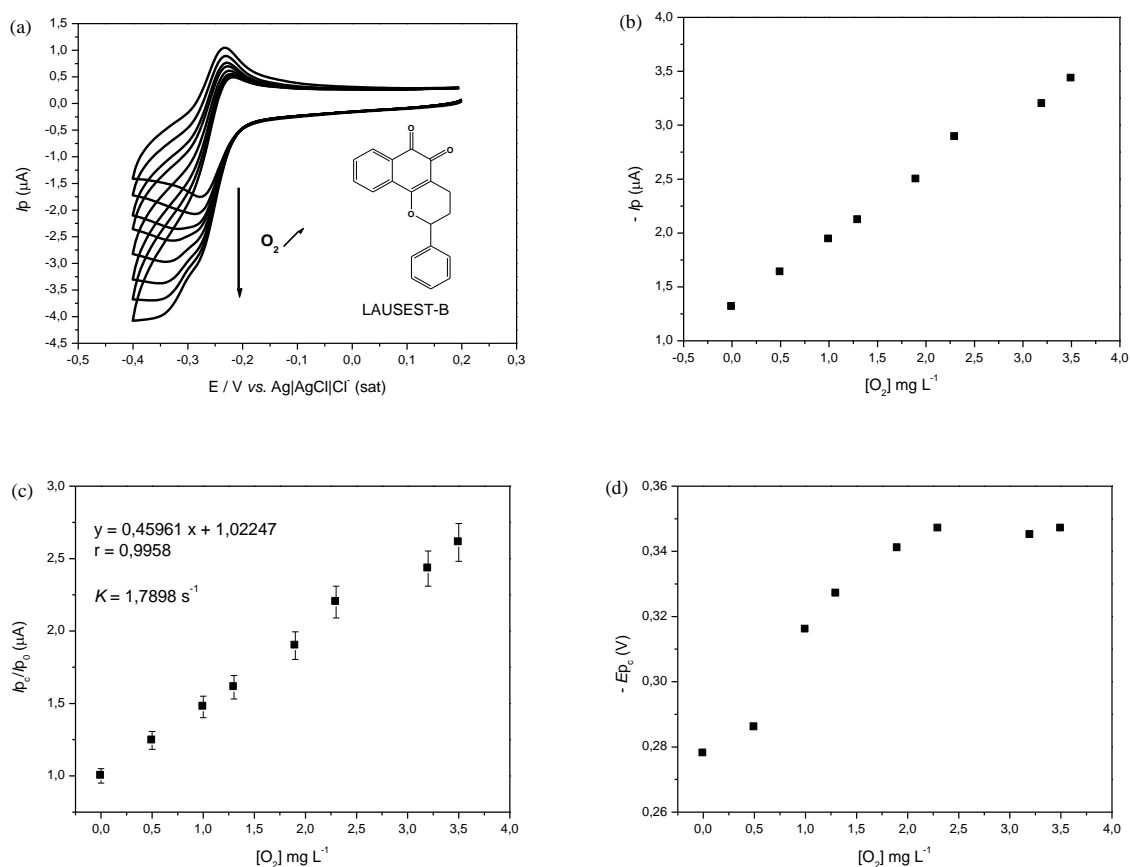


**Figura 19.** (a) Voltamogramas cíclicos de  $\beta$ -lapachona na presença de oxigênio. (b)  $i_{pc}$  vs.  $[O_2]$ ; (c)  $i_{pc}/i_{p0}$  vs.  $[O_2]$ ; (d)  $E_{pc}$  vs.  $[O_2]$ ;  $[\beta\text{-lapachona}] = 0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ . Tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0, 30% (v/v) de EtOH; eletrodo de CV;  $v = 0,50 \text{ V s}^{-1}$ .

**Tabela 12.** Parâmetros eletroquímicos referentes à reatividade da  $\beta$ -lapachona com o oxigênio.

$[O_2] \text{ mg L}^{-1}$	$-i_{pc} (\mu A)$	$i_{pc}/i_{p0} (\mu A)$	$-E_{pc} (V)$
0,00	1,258	1,000	0,298
0,50	1,771	1,407	0,302
0,90	2,031	1,614	0,302
1,20	2,224	1,767	0,307
1,40	2,496	1,984	0,307
1,90	2,717	2,159	0,312
2,30	3,050	2,424	0,312
2,80	3,324	2,642	0,317

\*  $i_{p0}$ : concentração de  $O_2 = 0$



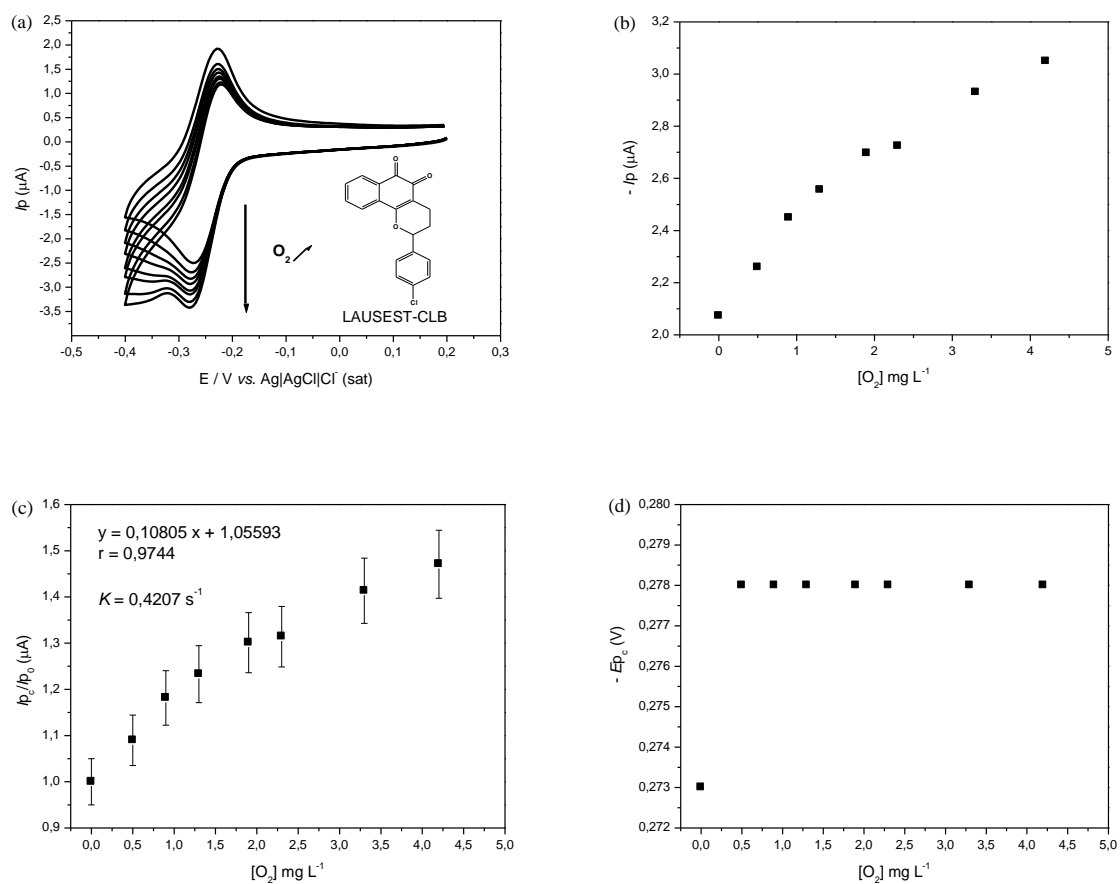
**Figura 20.** (a) Voltamogramas cíclicos de LAUSEST-B na presença de oxigênio. (b)  $I_{pc}$  vs.  $[O_2]$ ; (c)  $I_{pc}/I_{p0}$  vs.  $[O_2]$ ; (d)  $E_{pc}$  vs.  $[O_2]$ ;  $[LAUSEST-B] = 0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ . Tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0, 30% (v/v) de EtOH; eletrodo de CV;  $v = 0,50 \text{ V s}^{-1}$ .

**Tabela 13.** Parâmetros eletroquímicos referentes à reatividade de LAUSEST-B com o oxigênio.

$[O_2] \text{ mg L}^{-1}$	$-I_{pc} (\mu A)$	$I_{pc}/I_{p0} (\mu A)$	$-E_{pc} (V)$
0,00	1,314	1,000	0,278
0,50	1,636	1,245	0,286
1,00	1,94	1,476	0,316
1,30	2,118	1,611	0,327
1,90	2,496	1,899	0,341
2,30	2,891	2,200	0,347
3,20	3,195	2,431	0,345
3,50	3,432	2,611	0,347

\*  $I_{p0}$ : concentração de  $O_2 = 0$



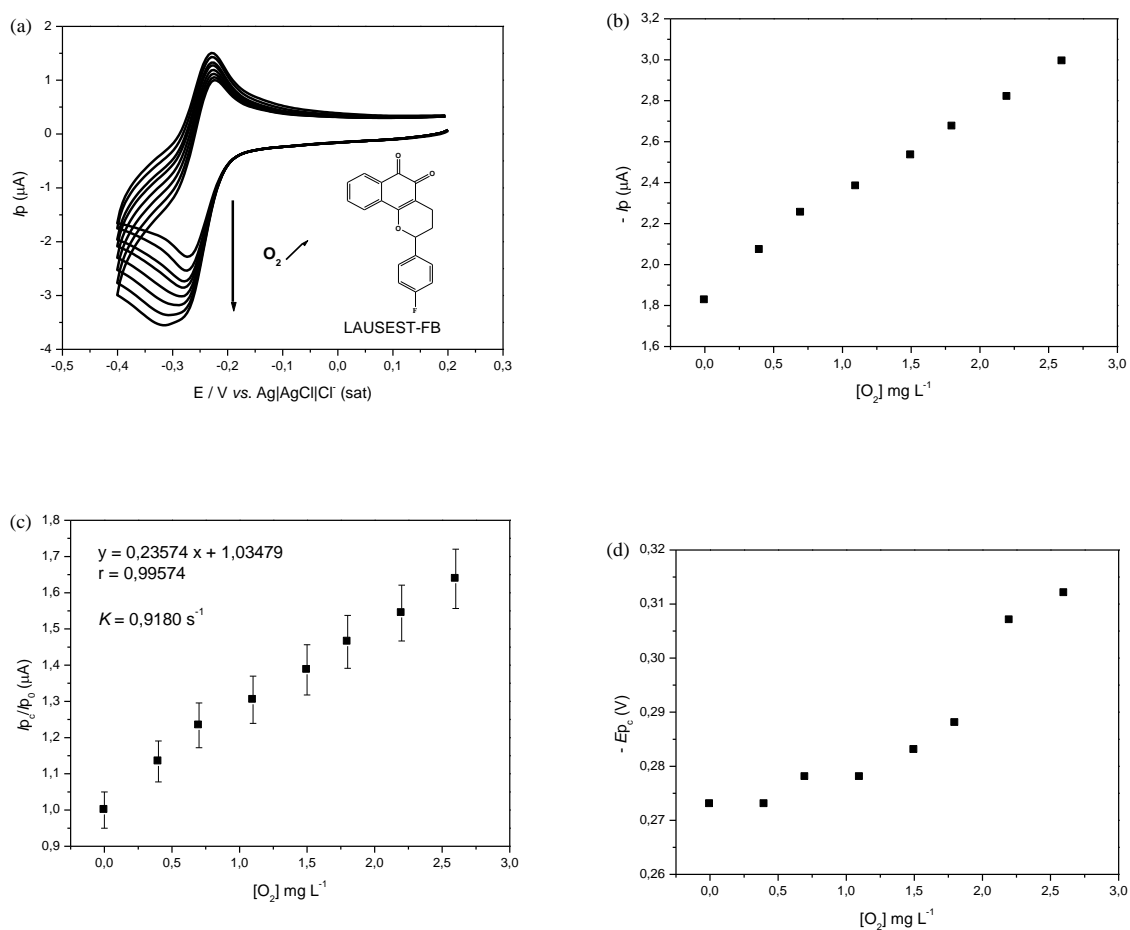


**Figura 21.** (a) Voltamogramas cíclicos de LAUDEST-CLB na presença de oxigênio. (b)  $i_{pc}$  vs.  $[O_2]$ ; (c)  $i_{pc}/i_{p0}$  vs.  $[O_2]$ ; (d)  $E_{pc}$  vs.  $[O_2]$ ; [LAUDEST-CLB] = 0,05 mmol  $L^{-1}$ . Tampão fosfato 0,2 mol  $L^{-1}$ , pH 7,0, 30% (v/v) de EtOH; eletrodo de CV;  $v = 0,50 V s^{-1}$ .

**Tabela 14.** Parâmetros eletroquímicos referentes à reatividade de LAUDEST-CLB com o oxigênio.

$[O_2]$ mg $L^{-1}$	$-i_{pc}$ ( $\mu A$ )	$i_{pc}/i_{p0}$ ( $\mu A$ )	$-E_{pc}$ (V)
0,00	2,073	1,000	0,273
0,50	2,259	1,089	0,278
0,90	2,449	1,181	0,278
1,30	2,556	1,233	0,278
1,90	2,697	1,301	0,278
2,30	2,724	1,314	0,278
3,30	2,93	1,413	0,278
4,20	3,049	1,470	0,278

\*  $i_{p0}$ : concentração de  $O_2 = 0$

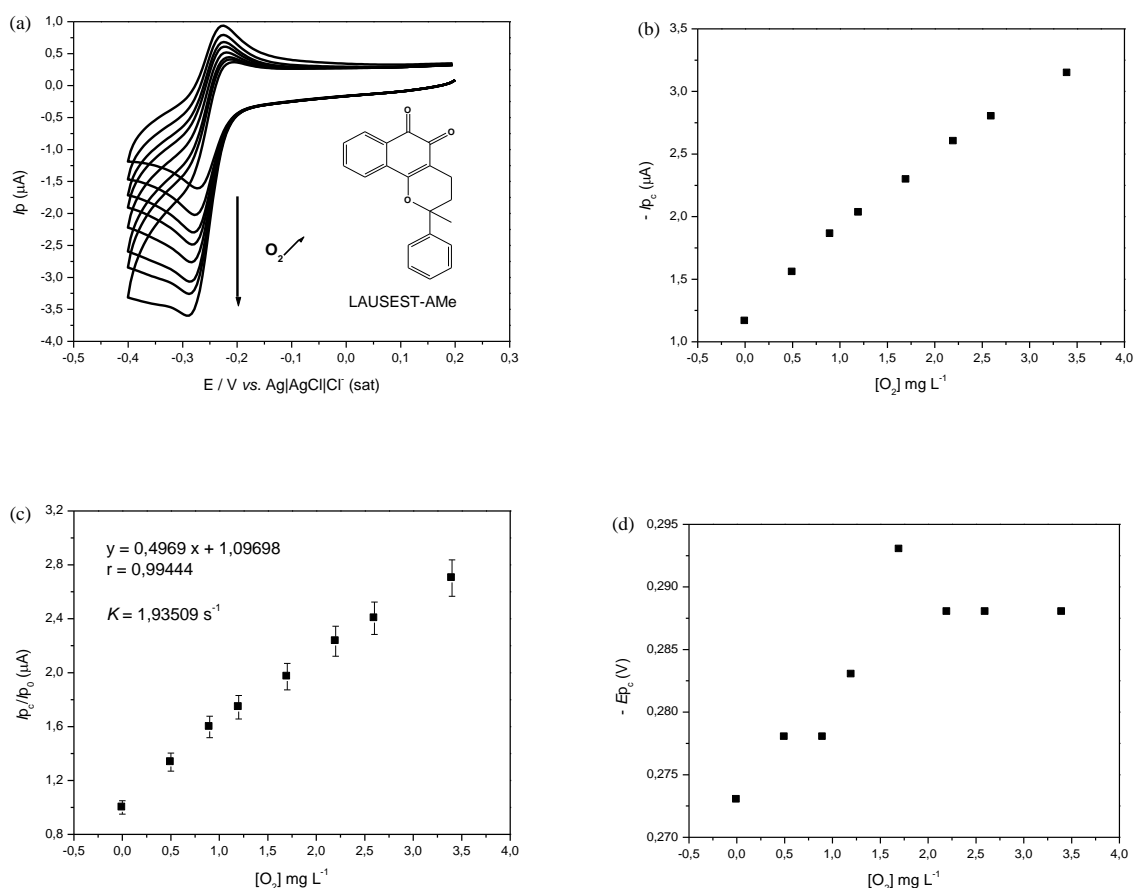


**Figura 22.** (a) Voltamogramas cíclicos de LAUSEST-FB na presença de oxigênio. (b)  $I_{p_c}$  vs.  $[O_2]$ ; (c)  $I_{p_c}/I_{p_0}$  vs.  $[O_2]$ ; (d)  $E_{pc}$  vs.  $[O_2]$ ; [LAUSEST-FB] = 0,05 mmol L<sup>-1</sup>. Tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0, 30% (v/v) de EtOH; eletrodo de CV;  $\nu = 0,50 \text{ V s}^{-1}$ .

**Tabela 15.** Parâmetros eletroquímicos referentes à reatividade de LAUSEST-FB com o oxigênio.

$[O_2]$ mg L <sup>-1</sup>	$-I_{p_c}$ (μA)	$I_{p_c}/I_{p_0}$ (μA)	$-E_{pc}$ (V)
0,0	1,826	1,000	0,273
0,4	2,071	1,134	0,273
0,7	2,253	1,233	0,278
1,1	2,382	1,304	0,278
1,5	2,533	1,387	0,283
1,8	2,674	1,464	0,288
2,2	2,819	1,543	0,307
2,6	2,992	1,638	0,312

\*  $I_{p_0}$ : concentração de  $O_2 = 0$



**Figura 23.** (a) Voltamogramas cíclicos de LAUSEST-AMe na presença de oxigênio. (b)  $I_{pc}$  vs.  $[O_2]$ ; (c)  $I_{pc}/I_{p_0}$  vs.  $[O_2]$ ; (d)  $E_{pc}$  vs.  $[O_2]$ ; [LAUSEST-AMe] = 0,05 mmol L<sup>-1</sup>. Tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0, 30% (v/v) de EtOH; eletrodo de CV;  $\nu$  = 0,50 V s<sup>-1</sup>.

**Tabela 16.** Parâmetros eletroquímicos referentes à reatividade de LAUSEST-AMe com o oxigênio.

$[O_2]$ mg L <sup>-1</sup>	$-I_{pc}$ (μA)	$I_{pc}/I_{p_0}$ (μA)	$-E_{pc}$ (V)
0,00	1,164	1,000	0,273
0,50	1,555	1,335	0,278
0,90	1,859	1,597	0,278
1,20	2,030	1,743	0,283
1,70	2,294	1,970	0,293
2,20	2,600	2,233	0,288
2,60	2,798	2,403	0,288
3,40	3,145	2,701	0,288

\*  $I_{p_0}$ : concentração de  $O_2$  = 0

A Tabela 17 demonstra os valores obtidos para a constante catalítica aparente ( $K_{app}$ ) dos compostos em estudo frente ao oxigênio, em meio prótico, e observa-se que LAUSEST-AMe apresentou uma constante catalítica mais próxima a

da  $\beta$ -lapachona, assim como seu comportamento voltamétrico na presença de oxigênio molecular. Em contrapartida, LAUDEST-B, LAUDEST-CLB e LAUDEST-FB apresentaram valores de constante inferior ao da  $\beta$ -lapachona e de LAUDEST-AMe, possivelmente devido à estabilidade do carbono quaternário.

**Tabela 17.** Constante catalítica da  $\beta$ -lapachona e seus análogos ( $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ) na presença de oxigênio em meio prótico. Tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0, 30% (v/v) de EtOH; eletrodo de CV;  $v = 0,50 \text{ V s}^{-1}$ .

COMPOSTO	$K_{app} (\text{s}^{-1})$
$\beta$ -LAPACHONA	2,3614
LAUDEST-B	1,7998
LAUDEST-CLB	0,4207
LAUDEST-FB	0,9818
LAUDEST-AMe	1,9350

Os compostos da série LAUDEST demonstraram, provavelmente, estar envolvidos com a capacidade de gerar espécies oxigenadas tóxicas ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^{\bullet}$ ), fenômeno responsável pelo estresse oxidativo, que pode estar correlacionado com a atividade antitumoral relevante observada nos ensaios de citotoxicidade *in vitro* - Ensaio do MTT (Tabela 18), ainda não publicados, realizados pelo grupo de pesquisa do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

Desta forma, os resultados obtidos no ensaio do MTT, podem determinar uma possível correlação dessa reatividade frente ao oxigênio e os potenciais de redução dos compostos com os ensaios de citotoxicidade *in vitro*.

Os testes de citotoxicidade *in vitro*, ensaio do MTT, consistiu de uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) para formazan, pela atividade da enzima succinildesidrogenase presente na mitocôndria de várias células viáveis, permitindo dessa forma quantificar a percentagem de células vivas. As linhagens de células de câncer utilizadas foram: HL-60 (leucemia promielocítica humana), MDA-MB435 (melanoma humano), HCT-8 (carcinoma de cólon humano) e SF-295 (glioblastoma humano) e, como controle positivo, utilizou-se a doxorrubicina. A citotoxicidade foi

expressa em  $CI_{50}$  ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), concentração inibitória mínima capaz de provocar 50% do efeito máximo dos compostos em relação às linhagens de células de câncer.

De acordo com a Tabela 18, os compostos da série LAUSEST em comparação com a  $\beta$ -lapachona apresentaram citotoxicidade, no entanto não foi possível demonstrar uma correlação entre o potencial de redução e essa atividade antitumoral. Contudo, sugere-se um possível envolvimento da geração de ERO com a atividade antitumoral destas *orto*-naftoquinonas, assim como descrito na literatura como uma das vias relacionadas à citotoxicidade de quinonas [BOLTON *et al.*, 2000].

**Tabela 18.** Atividade citotóxica da série LAUSEST, expressa em  $CI_{50}$  ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) dos compostos em relação às linhagens de células de câncer.

Amostra	HL-60	MDA-MB435	HCT-8	SF-295
$\beta$ -LAPACHONA	0,40	0,06	0,20	0,22
LAUSEST-B	0,28	0,15	1,24	0,65
LAUSEST-CLB	0,22	0,42	1,09	1,08
LAUSEST-FB	0,70	0,86	2,11	1,50
LAUSEST-AMe	0,97	0,32	1,12	0,75

#### 4.1.2.2 Comportamento Eletroquímico da Série LAUSEST Frente à $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD

As ciclodextrinas (CD) têm sido bastante utilizadas no desenvolvimento de produtos farmacêuticos, particularmente devido às suas propriedades complexantes, a qual promove incremento na solubilidade de fármacos poucos solúveis. O ambiente lipofílico da cavidade interna das CD propicia condições favoráveis para a formação de complexos de inclusão com compostos hidrófobos [ROLIM-NETO *et al.*, 2008].

Variações nas propriedades físico-químicas das moléculas hóspedes podem ser identificadas, qualitativamente, através do comportamento eletroquímico dessas substâncias na ausência e na presença de ciclodextrinas. Partindo desse pressuposto, avaliou-se o comportamento dos compostos da série LAUSEST na presença de  $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD.

As Figuras 24 e 25 mostram os voltamogramas cíclicos obtidos para os compostos da série LAUSEST parcialmente solúveis em tampão fosfato pH 7,0, na ausência e na presença de  $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD solúveis no meio.

O comportamento eletroquímico (voltametria cíclica, VC) de LAUSEST-B, parcialmente solúvel, mostrou duas ondas catódicas, uma em -0,274 V e outra em -0,373 V vs. Ag|AgCl|Cl<sup>-</sup> (sat.) (Figuras 24a e 25a). Esse comportamento não é esperado para quinonas, no entanto, sugere-se a presença de alguma impureza capaz de reduzir em potencial próximo ao dessa quinona.

Observou-se, ainda, que ao adicionar  $\beta$ -CD em uma proporção 10 vezes menor que LAUSEST-B, ocorreu um aumento na intensidade da corrente de pico catódica devido ao aumento da solubilidade do substrato; no entanto, nas adições seguintes (1:1 e 1:10, LAUSEST:  $\beta$ -CD), a corrente de pico catódica diminui, enquanto o potencial de pico catódico é mantido, sugerindo que a interação com a cavidade da molécula hospedeira ocorre em uma região da molécula, anel benzênico, que não influencia o processo de redução dessa quinona.

Já o comportamento eletroquímico observado para LAUSEST-CLB, LAUSEST-FB e LAUSEST-AMe, parcialmente sólidos, em eletrodo de carbono vítreo demonstraram um comportamento típico de quinonas em meio aquoso, conforme descrito anteriormente.

Com relação à interação de LAUSEST-CLB com  $\beta$ -CD, observou-se um aumento da intensidade de corrente de pico catódico com as sucessivas adições de  $\beta$ -CD, ou seja, nas proporções de 10:1, 1:1 e 1:10 (LAUSEST-CLB:  $\beta$ -CD), indicando aumento da solubilidade. Outro aspecto observado é o potencial de pico catódico, que é mantido em -0,215 V tanto na ausência quanto na presença de  $\beta$ -CD.

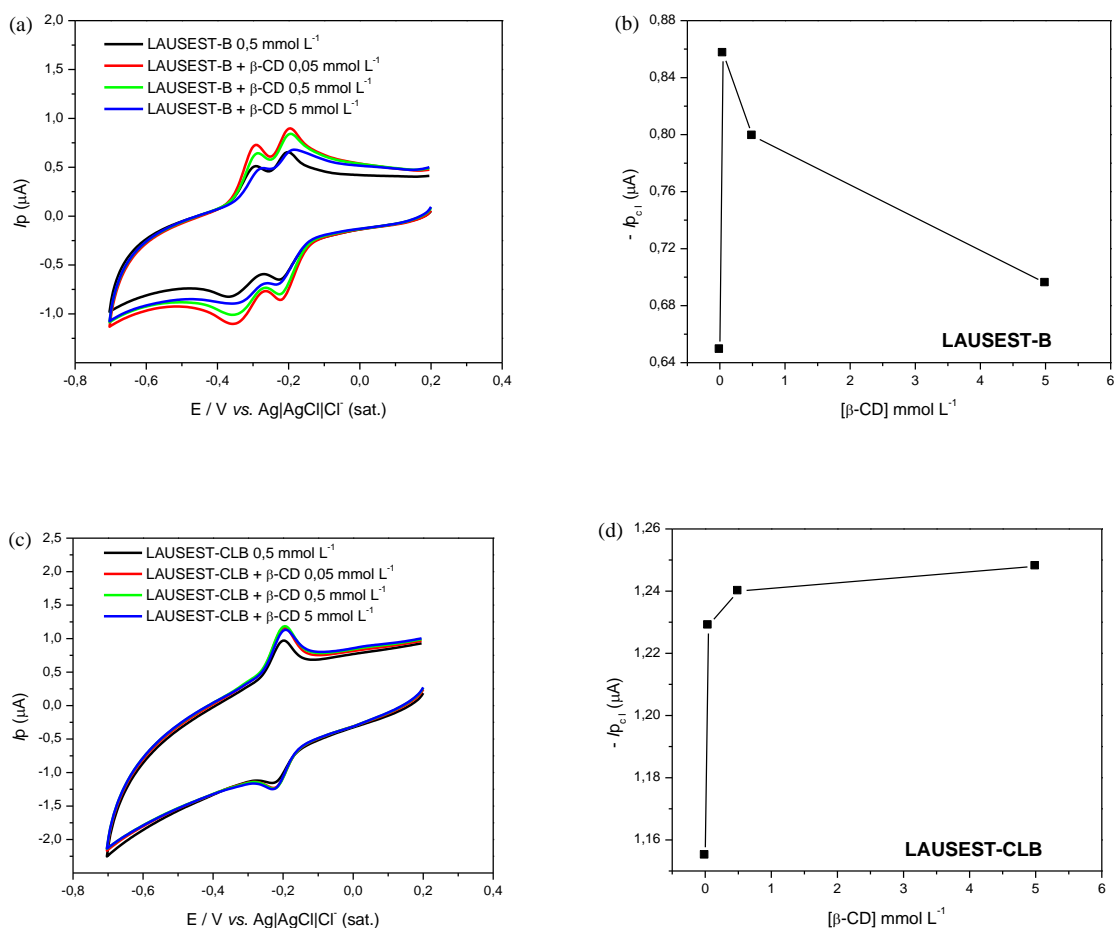
Analisando a interação de LAUSEST-FB com  $\beta$ -CD observou-se que ao adicionar  $\beta$ -CD em uma proporção 10 vezes menor e 10 vezes maior que LAUSEST-FB, ocorreu um aumento na corrente de pico catódico devido ao aumento da solubilidade do substrato; no entanto, na adição de 1:1 a corrente de pico catódico diminui quando comparada a proporção 10:1. Já o potencial de pico catódico sofre um discreto deslocamento na presença de  $\beta$ -CD, indo de -0,223 V, na ausência de  $\beta$ -CD, para -0,215 V, dando uma diferença de 8 mV para potencial menos negativo, facilitando o processo redox.

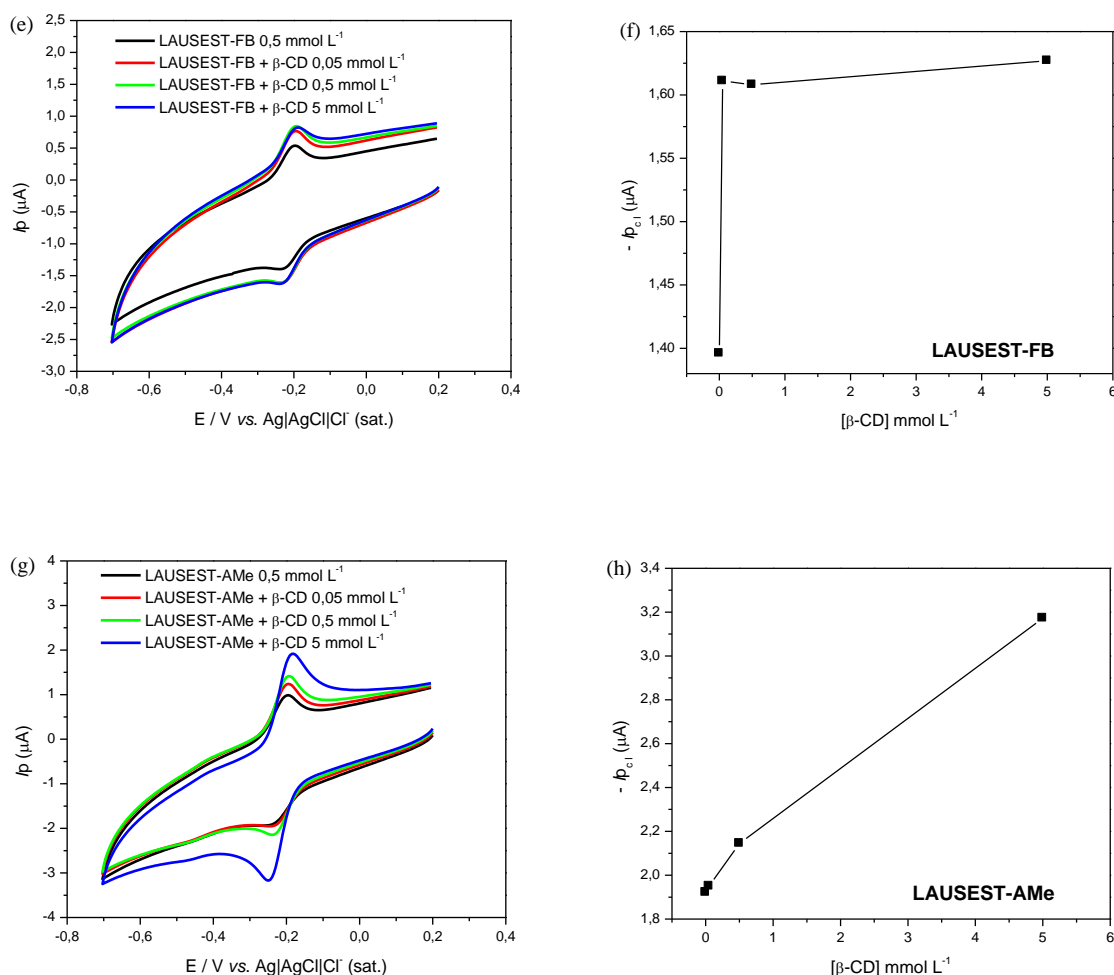
O comportamento voltamétrico observado para LAUSEST-AMe na presença de  $\beta$ -CD nas proporções 10:1, 1:1 e 1:10 (LAUSEST-AMe:  $\beta$ -CD) mostrou um

aumento da intensidade de corrente de pico catódico, indicando aumento da solubilidade, enquanto que para a proporção 1:10, se observou um deslocamento no potencial de pico catódico para potencial mais negativo, ocasionado pelo encapsulamento do substrato com, conseqüente, desfavorecimento do processo de redução.

Em suma, ao compararmos o comportamento eletroquímico dos compostos da série LAUDEST na presença de  $\beta$ -CD observou-se que todos apresentaram, de certo modo, uma interação com a cavidade da  $\beta$ -CD em solução, assim como a  $\beta$ -lapachona já reportada na literatura [DE ABREU *et al.*, 2007].

Como mostra a Figura 24g e 24h, o composto LAUDEST-AMe apresentou maior aumento de intensidade corrente de pico catódico, quando comparado aos outros compostos da série, indicando uma interação mais efetiva com a cavidade da  $\beta$ -CD e, conseqüentemente uma transferência de fase, da fase sólida para fase líquida, em maior proporção.





**Figura 24.** (a, c, e, g) Voltamogramas cíclicos da série LAUSEST (0,5 mmol L<sup>-1</sup>) em eletrodo de carbono vítreo e adição de  $\beta$ -CD sólida nas concentrações de 0,05 mmol L<sup>-1</sup>, 0,5 mol L<sup>-1</sup> e 5 mmol L<sup>-1</sup>. (b, d, f, h) Gráfico de  $-i_{p_{cl}}$  vs.  $[\beta-CD]$ . Tampão fosfato pH 7;  $\nu = 0,05$  Vs<sup>-1</sup>.

O comportamento eletroquímico observado para os compostos da série LAUSEST na presença de HP- $\beta$ -CD apresentou características semelhantes à interação com  $\beta$ -CD, como mostra a Figura 25.

O comportamento eletroquímico de LAUSEST-B, parcialmente solúvel, mostrou que ao adicionar HP- $\beta$ -CD em uma proporção 10 vezes menor que LAUSEST-B (10:1), ocorreu um aumento na intensidade da corrente de pico catódica devido ao aumento da solubilidade do substrato; no entanto, nas adições seguintes (1:1 e 1:10, LAUSEST-B: HP- $\beta$ -CD), a corrente de pico catódica diminuiu, enquanto o potencial de pico catódico é mantido em -0,228 V. Além disso, na

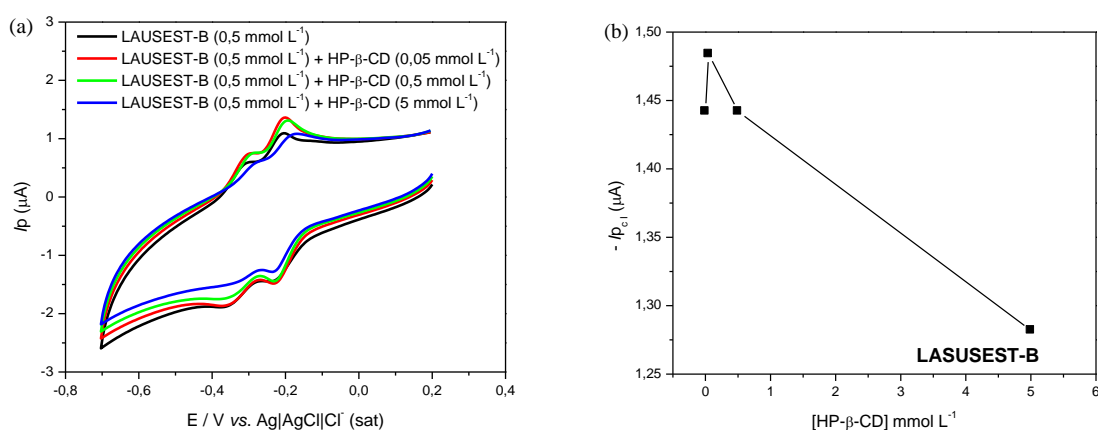


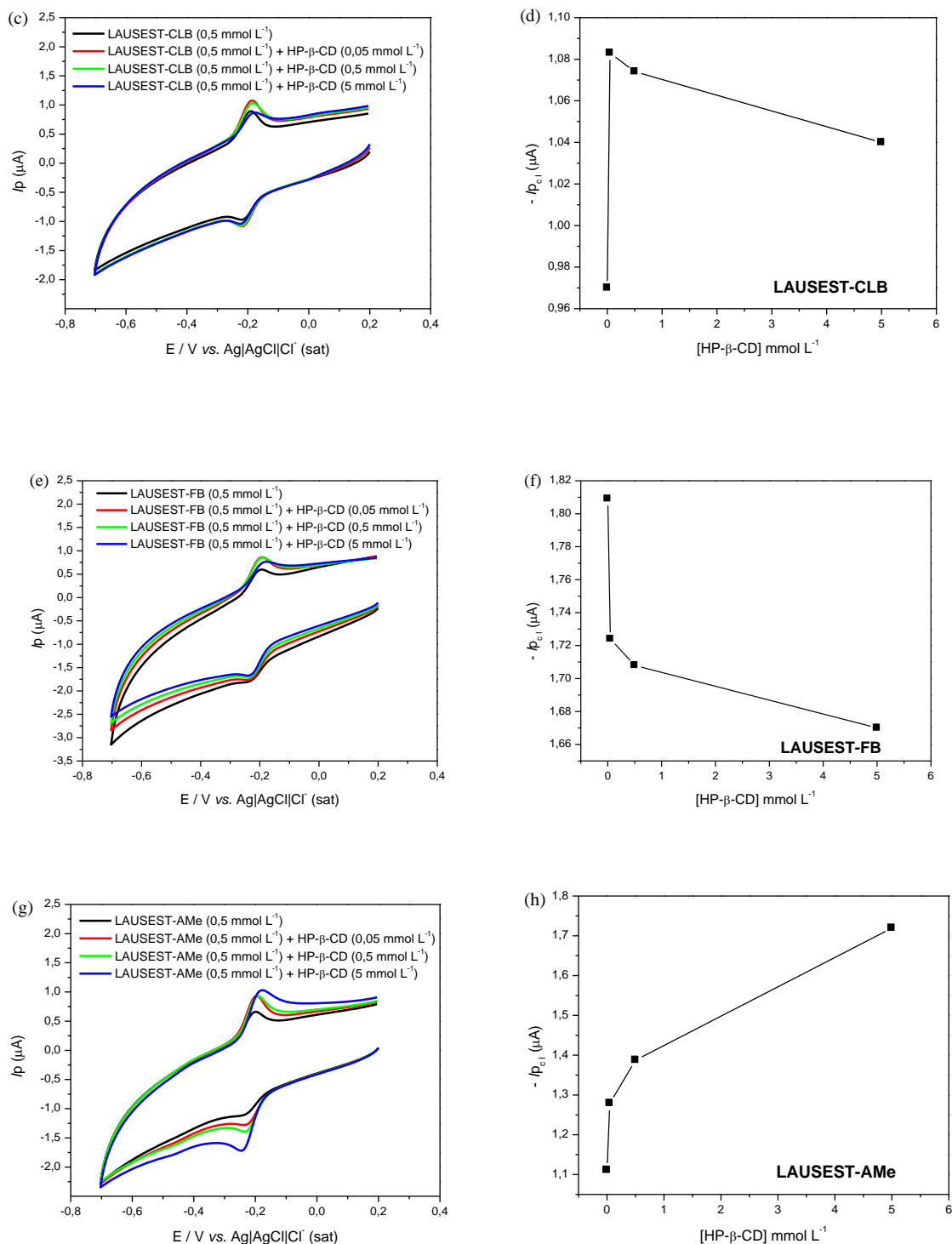
proporção de HP- $\beta$ -CD 10 vezes maior que LAUSEST-B observou-se uma tendência no desaparecimento da segunda onda.

No estudo de interação de LAUSEST-CLB com HP- $\beta$ -CD, observou-se que na proporção de HP- $\beta$ -CD 10 vezes menor que LAUSEST-CLB, ocorreu um aumento na intensidade de corrente de pico catódica devido ao aumento da solubilidade do substrato; no entanto, nas adições seguintes (1:1 e 1:10) a corrente de pico catódica diminui, e o potencial de pico catódico sofre um deslocamento de 4 mV para potencial mais negativo dificultando o processo de redução ( $E_{pc} = -0,216$  V, na ausência de HP- $\beta$ -CD, e  $E_{pc} = -0,220$  V na presença).

O comportamento eletroquímico observado para LAUSEST-FB com as sucessivas adições de HP- $\beta$ -CD mostrou um diminuição da intensidade de corrente de pico catódico e não influenciou o potencial de redução ( $-0,236$  V), indicando ausência de interação de LAUSEST-FB com a cavidade da HP- $\beta$ -CD.

Assim como na presença de  $\beta$ -CD, LAUSEST-AMe mostrou forte interação com a cavidade de HP- $\beta$ -CD. Na presença de HP- $\beta$ -CD nas proporções 10:1, 1:1 e 1:10, LAUSEST-AMe mostrou um aumento da intensidade de corrente de pico catódico, indicando aumento da solubilidade, enquanto, para a proporção 1:10, se observou um deslocamento no potencial de pico catódico para potencial mais negativo ( $-0,246$  V), ocasionado pelo encapsulamento do substrato com subsequente desfavorecimento do processo de redução.

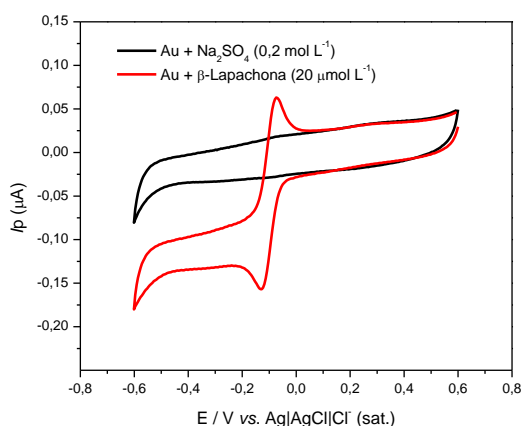




**Figura 25.** (a, c, e, g) Voltamogramas cíclicos da série LAUSEST (0,5 mmol L<sup>-1</sup>) em eletrodo de carbono vítreo e adição de HP-β-CD sólida nas concentrações de 0,05 mmol L<sup>-1</sup>, 0,5 mol L<sup>-1</sup> e 5 mmol L<sup>-1</sup>. (b, d, f, h) Gráfico de  $-i_{pCl}$  vs. [HP-β-CD]. Tampão fosfato pH 7;  $\nu = 0,05$  Vs<sup>-1</sup>.

#### 4.1.2.3 Comportamento Eletroquímico da $\beta$ -lapachona em SAM Mista de $\beta$ -CD-SH-Au + MUA

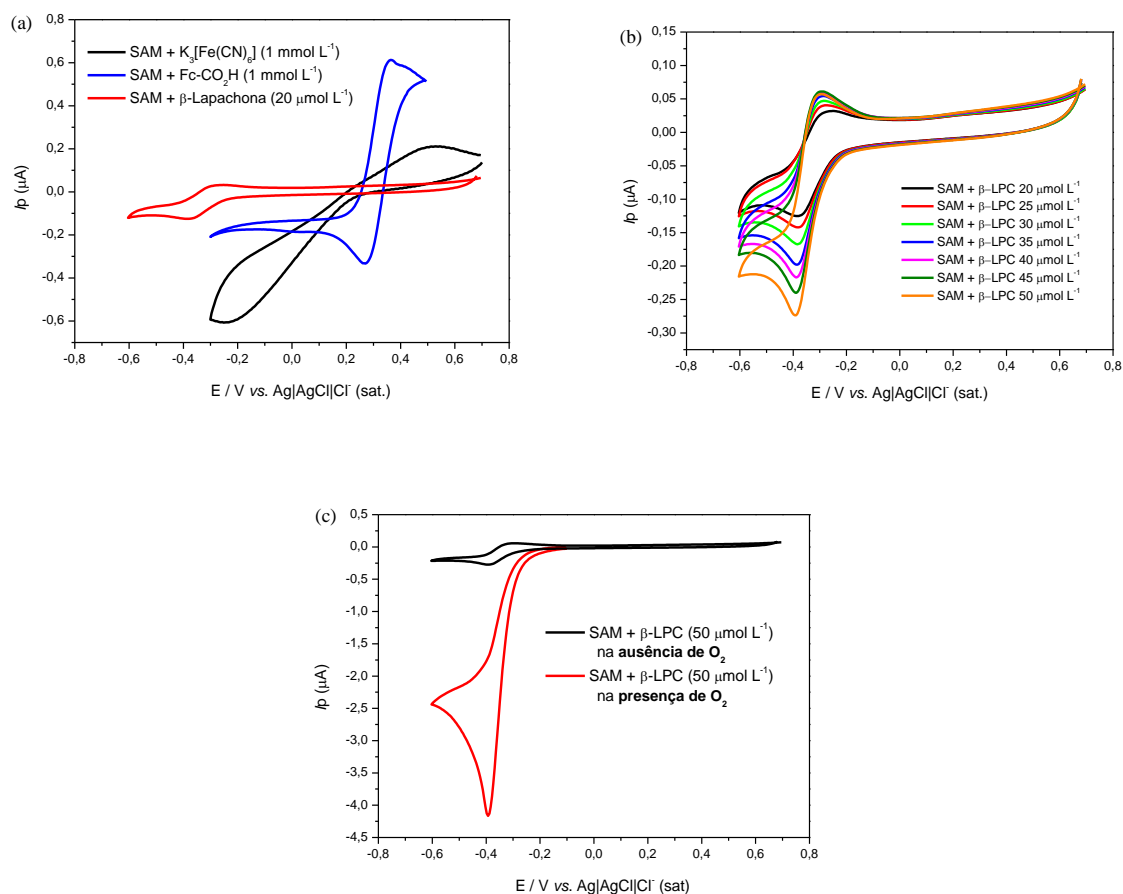
A fim de avaliar o comportamento voltamétrico da  $\beta$ -lapachona em eletrodo quimicamente modificado com SAM mista de  $\beta$ -CD-SH-Au + MUA, realizou a síntese da  $\beta$ -CD-SH e modificação de eletrodo de ouro (Au), assim como descritos na literatura por CHOI *et al.* (2005). Como mostra a Figura 26, o potencial de redução da  $\beta$ -lapachona em eletrodo de Au é de -0,129 V, utilizando uma solução de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,2 mol L<sup>-1</sup>.



**Figura 26.** Voltamogramas cíclicos da  $\beta$ -lapachona em eletrodo de ouro (Au).  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,2 mol L<sup>-1</sup> e  $\nu = 0,01 \text{ V s}^{-1}$ .

A Figura 27a mostra o voltamograma cíclico de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ,  $\text{Fc-CO}_2\text{H}$  e  $\beta$ -lapachona em eletrodo de ouro modificado com camada mista de  $\beta$ -CDSH + MUA em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,2 mol L<sup>-1</sup>. A molécula de  $\text{Fc-CO}_2\text{H}$ , devido a seu tamanho, pode entrar na cavidade da  $\beta$ -CD e ocorrer transferência de elétrons [BOLLO *et al.*, 2003]. Como mostrado na Figura 27a, a camada mista não promove a supressão do processo redox do ácido ferrocenocarboxílico; por outro lado, não apresenta nenhum pico referente ao par redox para o ferricianeto de potássio. Esse comportamento é esperado para o ferricianeto, porque seu tamanho é maior do que a cavidade da  $\beta$ -CD e, assim, o acesso da sonda ao eletrodo de ouro é eficazmente bloqueado pela monocamada mista [BOLLO *et al.*, 2003; DAMOS *et al.*, 2007]. O sinal inclinado referente ao ferricianeto, contudo, mostra que ainda existem alguns espaços no eletrodo entre as moléculas de  $\beta$ -CDSH e MUA, em que a espécie redox pode penetrar até a superfície do eletrodo. Esses sítios vazios são denominados pinholes.

Como discutido anteriormente, para a efetiva formação das SAMs, o eletrodo deve estar com a superfície totalmente livre de sujeira e arranhões que, apesar de todos os cuidados, no caso de eletrodos planos tornam-se difíceis de serem removidos. Tendo a monocamada mista formada, um teste preliminar com  $\beta$ -lapachona mostrou um pico de natureza reversível em -0,366 V (Figura 28a).



**Figura 27.** (a) Voltamogramas cíclicos para  $K_3[Fe(CN)_6]$ ,  $Fc-CO_2H$  e  $\beta$ -lapachona em Au modificado com  $\beta$ -CDSH + MUA; (b) Voltamogramas cíclicos do efeito da concentração da  $\beta$ -lapachona em SAM de  $\beta$ -CDSH + MUA; (c) Efeito catalítico da  $\beta$ -lapachona, na presença de oxigênio, em SAM de  $\beta$ -CDSH + MUA.  $Na_2SO_4$  0,2 mol  $L^{-1}$ ;  $\nu = 0,01$  V  $s^{-1}$ .

Para possíveis fins de eletroanálise adicionaram-se sucessivas alíquotas de  $\beta$ -lapachona, como mostra a Figura 27b, onde se observaram um aumento da intensidade de corrente de pico de redução proporcional as adições. Já comparando os resultados descritos anteriormente da reatividade da  $\beta$ -lapachona com o oxigênio em eletrodo de CV, não modificado, e também com a literatura, em SAM, a catálise da  $\beta$ -lapachona mostrou-se bem mais efetiva como mostra a Figura 27c, visto que

este favorecimento pode ser devido ao encapsulamento dessa quinona e do oxigênio molecular.

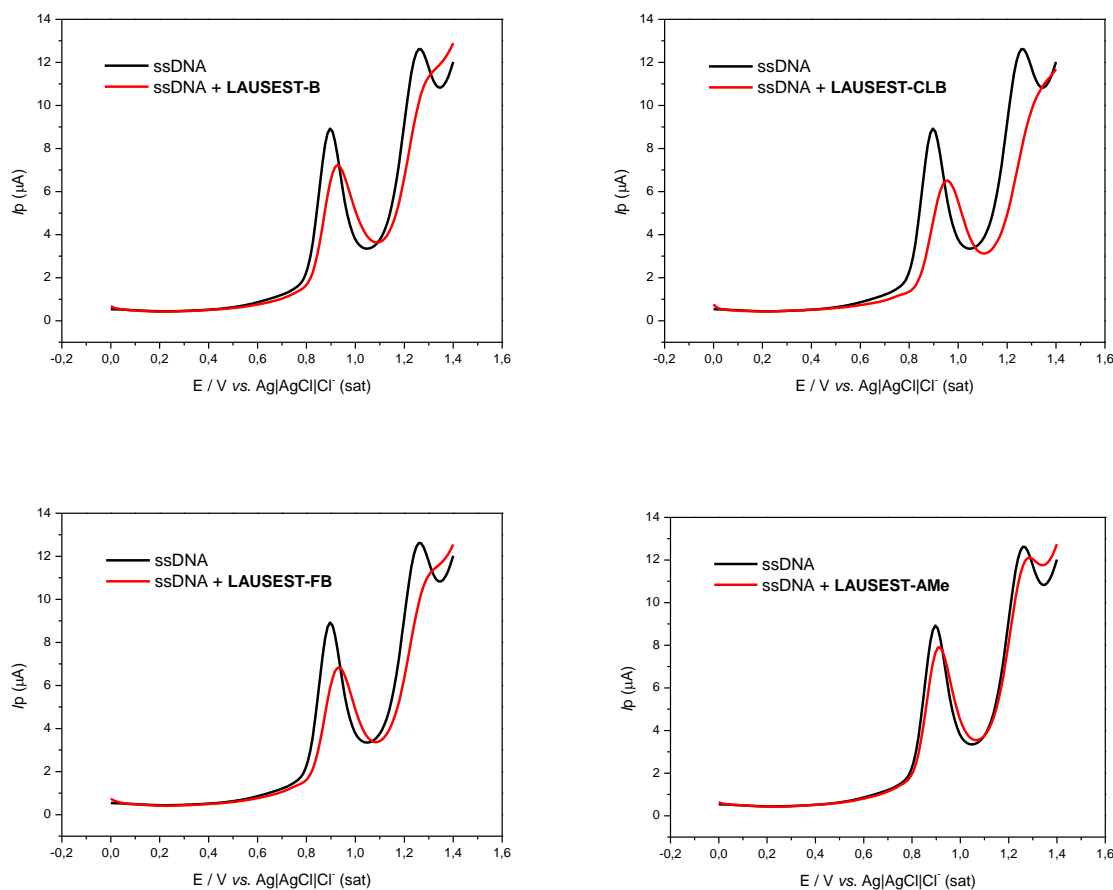
#### 4.1.2.4 Estudo de Interação com ssDNA

O espectro eletroquímico do ssDNA em meio aquoso etanólico tamponado, tampão acetato (pH 4,5), apresentou duas ondas anódicas bem definidas e de alta intensidade de corrente, referentes a oxidação das bases púricas, guanina e adenina, em 0,895 V e 1,261 V vs Ag|AgCl|Cl<sup>-</sup> (sat.), respectivamente. Foram adicionadas alíquotas (0,05 mmol L<sup>-1</sup>) dos compostos da série LAUSEST em soluções individuais de ssDNA e observou-se um decréscimo da intensidade da corrente de pico de oxidação das bases associado a um leve deslocamento de potencial.

Ao contrário da  $\beta$ -lapachona, onde o mecanismo biológico de ação não tem como alvo o DNA [DE ABREU *et al.*, 2002b; BRETT *et al.*, 2002], e sim enzimas específicas, como as topoisomerases [NEDER *et al.*, 1998], os estudos com os derivados da série LAUSEST sugerem que o mecanismo de ação destes compostos tem como alvo o DNA, podendo isto ser confirmado com os resultados obtidos no estudo de interação com ssDNA, conforme as Figura 28 e 29.

De acordo com a Figura 28 observou-se um comportamento diferenciado para os compostos da série LAUSEST com relação à interação com ssDNA, sendo a interação mais efetiva atribuída os derivados halogenados, onde o composto que contém um átomo de cloro em sua estrutura (LAUSEST-CLB) provocou maior decréscimo e deslocamento de potencial para a onda referente a oxidação da guanina e desaparecimento do pico relativo a adenina. No caso do composto que contém um grupo metila (LAUSEST-AMe), observou-se menor interação com as bases de DNA, o que evidencia que a presença de um grupo substituinte ávido por elétrons acentua a interação, o que possivelmente está relacionada à maior nucleofilia do derivado como consequência do efeito *para* retirador.

Contudo, considerando o sugerido, observou-se uma resposta discrepante para o composto que contém um átomo de flúor em sua estrutura (LAUSEST-FB), já que o efeito eletrorretirador é maior para o flúor do que para o cloro. No entanto, como observado na Figura 28, a interação de LAUSEST-CLB com as bases púricas não é consideravelmente maior quando comparada com LAUSEST-FB.

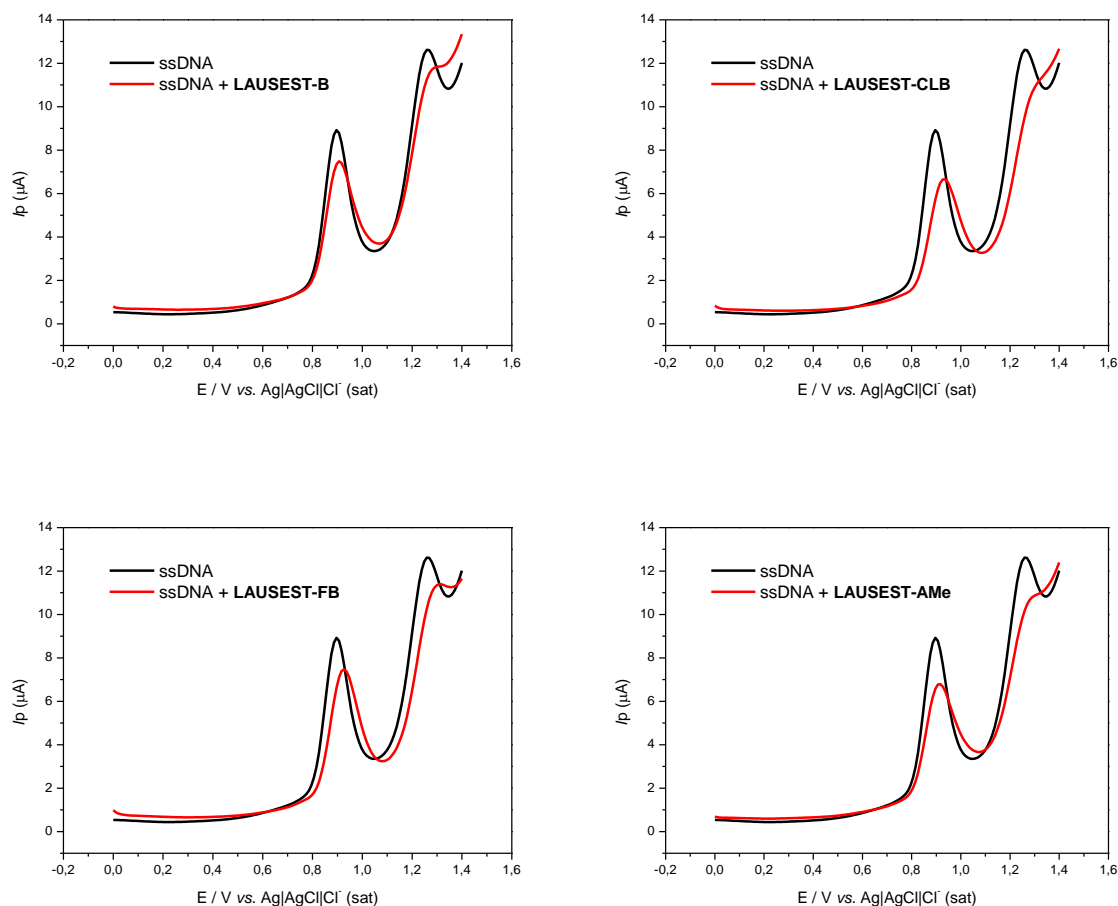


**Figura 28.** Voltamogramas de Pulso Diferencial (VPD) dos compostos da série LAUSEST em solução etanólica (30% v/v) de ssDNA em tampão acetato pH 4,5. [LAUSEST] = 0,05 mmol L<sup>-1</sup>; eletrodo de CV;  $\nu$  = 5 mV s<sup>-1</sup>.

Além disso, com o objetivo de avaliar a interação do ânion radical gerado, após redução das quinonas, com as bases púricas, guanina e adenina, fixou-se o potencial em -0,27 V durante 120 segundos antes de proceder com a eletro-oxidação do DNA. No entanto, observou, como mostra a Figura 29, que o ânion radical gerado após redução da quinona não influencia, de forma considerável, na interação dos compostos da série LAUSEST com o ssDNA, visto que a resposta eletroquímica obtida (intensidades de corrente e os potenciais de pico anódico) foram similar aos resultados obtidos nos experimentos realizados sem redução das quinona (Figura 28).

Contudo, LAUSEST-AMe apresentou maior afinidade pela base adenina quando na presença de sua espécie reduzida (Figura 29), pois se observou uma diminuição da intensidade de corrente de pico referente à oxidação dessa base. Tais

resultados corroboram para que o mecanismo de ação biológica destes compostos esteja relacionado à interação com o DNA.

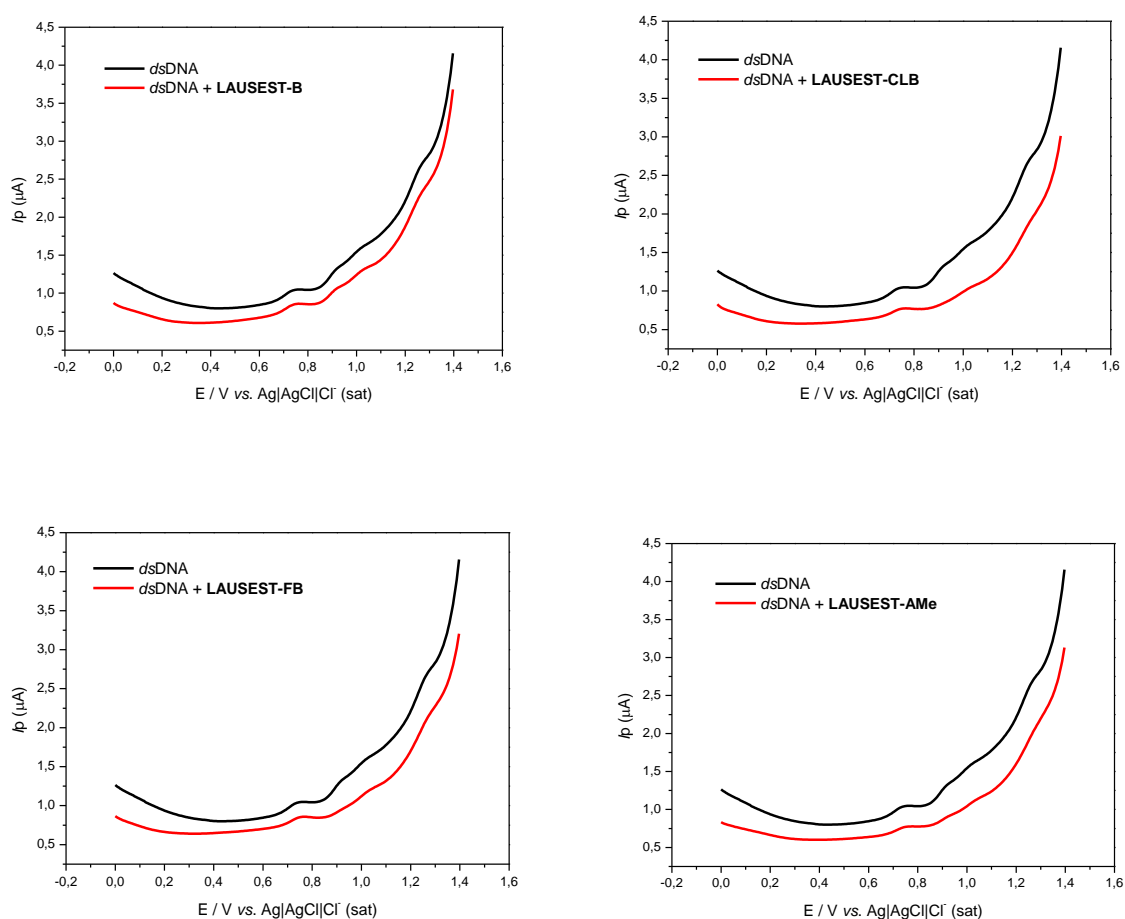


**Figura 29.** Voltamogramas de Pulso Diferencial (VPD) dos compostos da série LAUSEST em solução etanólica (30% v/v) de ssDNA em tampão acetato pH 4,5 após acondicionamento em -0,28 V durante 120 s. [LAUSEST] = 0,05 mmol L<sup>-1</sup>; eletrodo de CV;  $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$ .

#### 4.1.2.5 Estudo com Biossensor de dsDNA

Os eletrodos modificados com DNA têm sido aplicado com sucesso tanto como superfícies modificadas para determinação eletroanalítica de fármacos quanto para o estudo com a interação dos mesmos com o DNA. Eles permitem avaliar e prever interações com prejuízos celulares, através de técnicas eletroquímicas (voltametria de pulso diferencial, em eletrodos de carbono vítreo modificados com DNA em fita dupla) baseadas na observação da ligação das moléculas em estudo com os ácidos nucleicos.

Neste sentido, os estudos em biossensor eletroquímico demonstraram que os compostos da série LAUSEST não interagem diretamente com o DNA (Figura 30), ou seja, não atuam por intercalação entre as bases da dupla hélice desta macromolécula, assim como seu precursor, a  $\beta$ -lapachona. Nesse caso não há evidência dos picos de oxidação das bases constituintes do DNA, o que indica conservação da conformação original do DNA.



**Figura 80.** Voltamogramas de Pulso Diferencial (VPD) dos compostos da série LAUSEST em biossensor de *dsDNA* em solução etanólica (30% v/v) tamponada (tampão acetato pH 4,5). [LAUSEST] = 0,05 mmol L<sup>-1</sup>; eletrodo de CV;  $\nu$  = 5 mV s<sup>-1</sup>.

## 4.2 Estudo Eletroquímico do Ácido Úsnico

### 4.2.1. Meio Aprótico

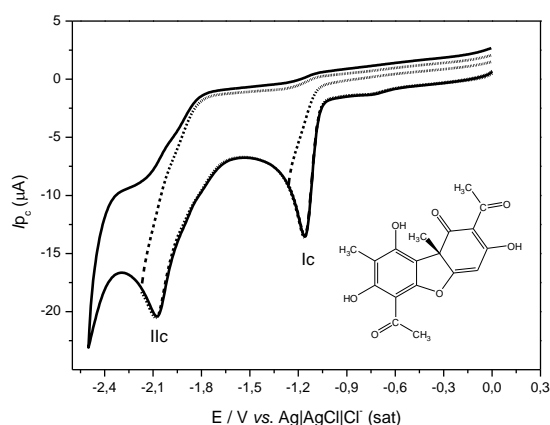
A voltametria cíclica redutiva do Ácido Úsnico foi realizada em meio aprótico (DMF/TBAP 0,1 mol L<sup>-1</sup>) e demonstrou a presença de duas ondas catódicas (Ic e IIc,



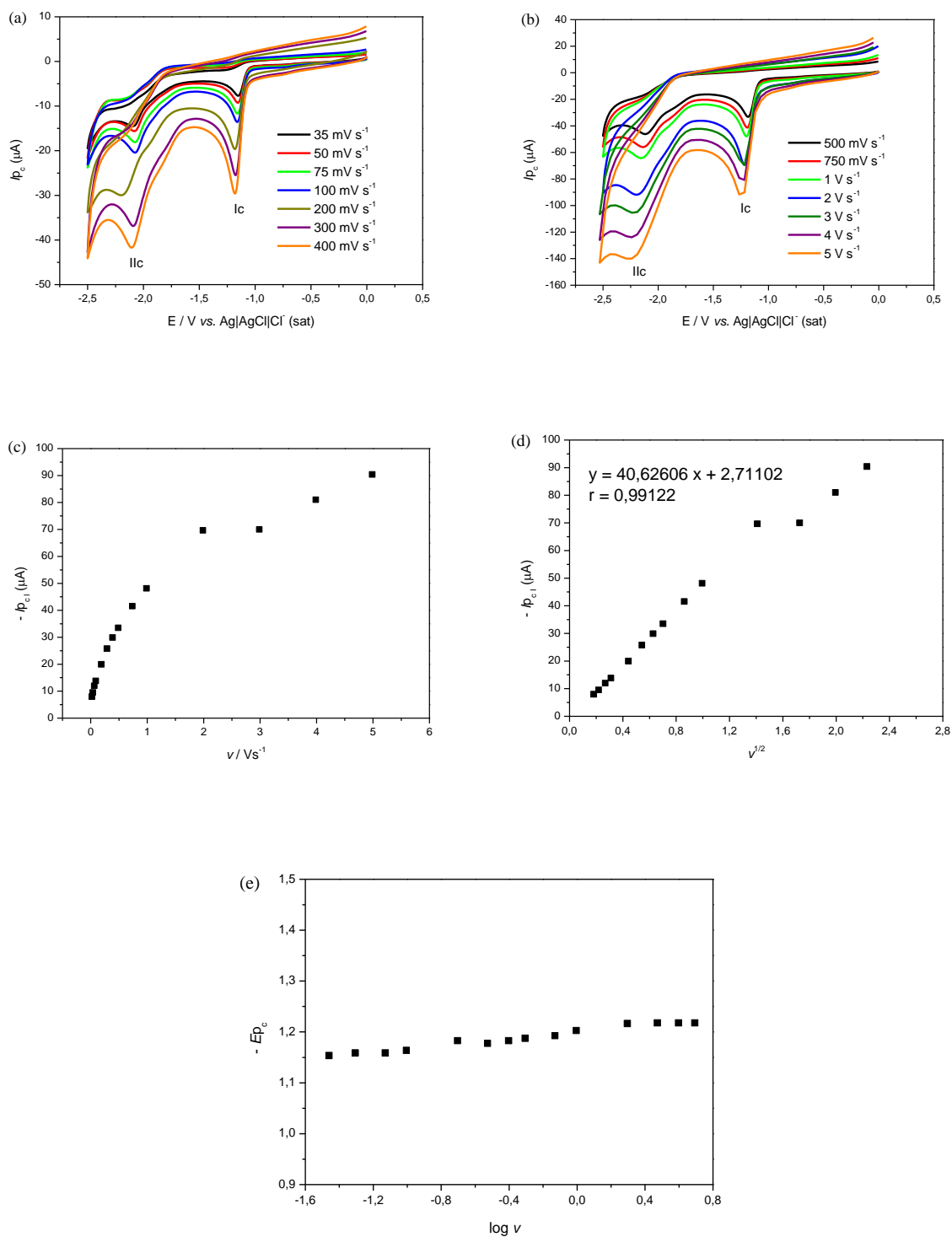
respectivamente), bem definidas, e um ombro em potencial anterior ao segundo pico. Essas ondas apresentaram características de processos irreversíveis observados pela ausência de picos anódicos (Figura 31) e, provavelmente, estão relacionadas à redução das carbonilas presente da estrutura química do Ácido Úsnico.

Como mostra a Figura 32, os valores de intensidade de corrente em função da raiz quadrada da velocidade de varredura para a primeira onda catódica demonstraram que o transporte de massa através da solução, o qual rege a chegada da substância à superfície do eletrólito, é de natureza difusional.

Em seguida encontram-se os gráficos: valores de intensidade de corrente da onda Ic em função da velocidade de varredura e também em função da raiz quadrada da velocidade de varredura, da análise do potencial de redução de primeira onda (Ic) em função do *log* da velocidade de varredura e, também a Tabela 19 onde estão apresentados os resultados correspondentes aos parâmetros eletroquímicos obtidos do estudo em função da velocidade de varredura ( $\nu$ ) para o Ácido Úsnico.



**Figura 31.** Voltamogramas cíclicos do Ácido Úsnico a  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .  $[\text{Ácido Úsnico}] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em DMF/TPAP ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ); eletrodo de CV.



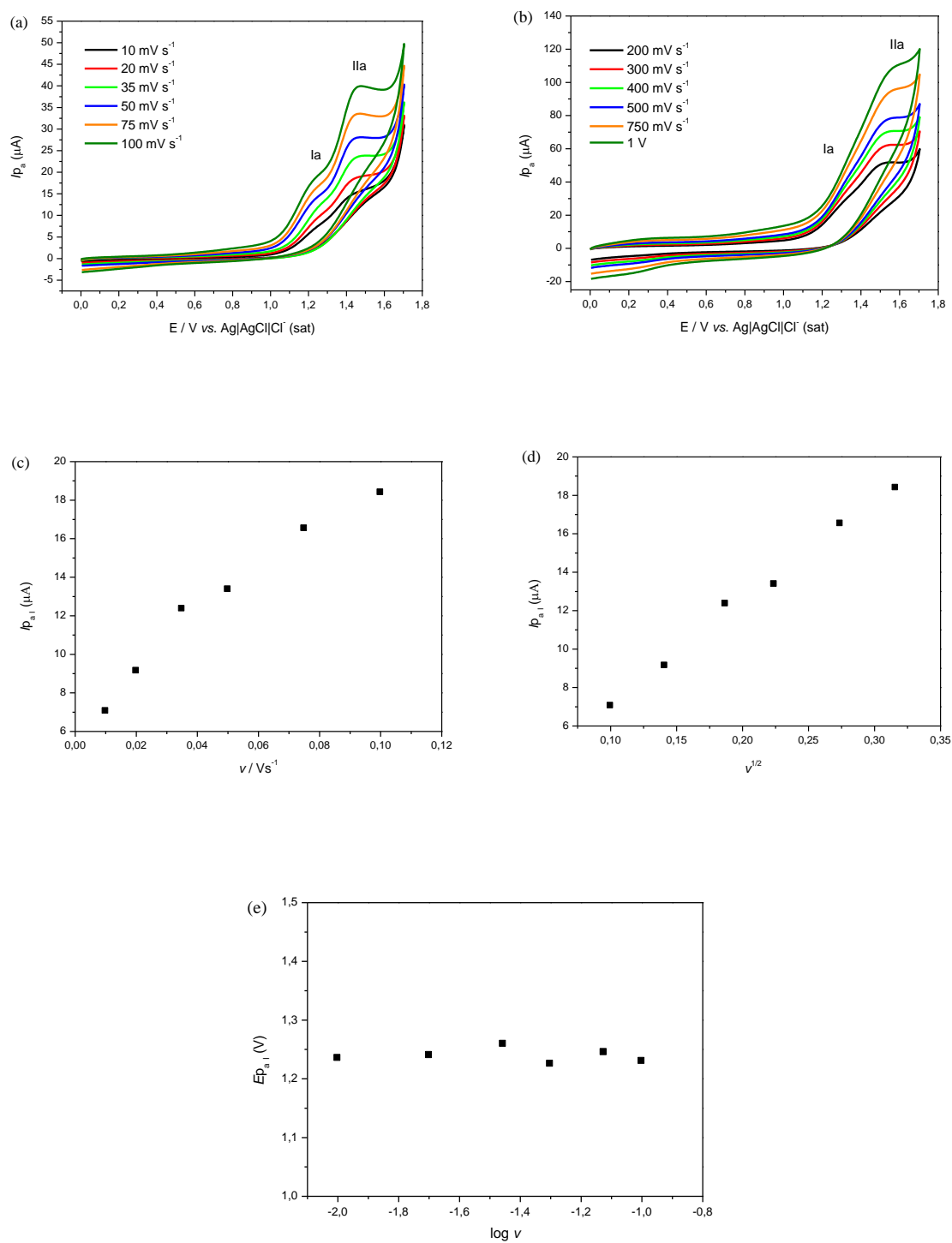
**Figura 32.** (a) e (b) Voltamogramas cíclicos do Ácido Úsnico em função da velocidade de varredura. (c) gráfico de *i*<sub>p,c</sub> vs. *v*; (d) gráfico de *i*<sub>p,c</sub> vs. *v*<sup>1/2</sup>; (e) gráfico de *E*<sub>p,c</sub> vs. log *v*. [Ácido Úsnico] = 1,0 mmol L<sup>-1</sup> em DMF/TPAP (0,1 mol L<sup>-1</sup>); eletrodo de CV.

**Tabela 19.** Parâmetros eletroquímicos obtidos a partir da VC redutiva do Ácido Úsnico. Estudo em função da velocidade de varredura.  $E_{pc}$  vs.  $Ag|AgCl|Cl^-$  (sat.).

$\nu$ ( $V s^{-1}$ )	$\nu^{1/2}$ ( $V s^{-1}$ )	$\log \nu$	- $E_{pc}$ (V)	- $i_{pc}$ ( $\mu A$ )
0,035	0,187	-1,456	1,152	7,672
0,050	0,224	-1,301	1,157	9,237
0,075	0,274	-1,125	1,157	11,679
0,100	0,316	-1,000	1,162	13,549
0,200	0,447	-0,699	1,181	19,641
0,300	0,548	-0,522	1,176	25,460
0,400	0,632	-0,398	1,181	29,608
0,500	0,707	-0,301	1,186	33,224
0,750	0,866	-0,125	1,191	41,268
1,000	1,000	0,000	1,201	47,879
2,000	1,414	0,301	1,215	69,366
3,000	1,732	0,477	1,216	69,702
4,000	2,000	0,602	1,216	80,749
5,000	2,236	0,698	1,216	90,118

A voltametria cíclica oxidativa do Ácido Úsnico também foi realizada em meio aprótico (DMF/TBAP 0,1 mol L<sup>-1</sup>) e demonstrou a presença de duas ondas anódicas (Ia e IIa, respectivamente) nas velocidades de 10 a 200 mV s<sup>-1</sup>, sendo observado, acima de 200 mV s<sup>-1</sup>, a fusão da primeira com a segunda onda anódica. Essas ondas apresentaram características de processos irreversíveis, observados pela ausência de picos catódicos (Figura 33) e, provavelmente, estão relacionadas à oxidação das hidroxilas presentes na estrutura química do Ácido Úsnico.

Deste modo, como mostra a Figura 33 e a Tabela 20, os gráficos a seguir, foram determinados a partir dos valores de corrente e potencial obtidos para a primeira onda anódica (Ia) apenas até 100 mV s<sup>-1</sup>. Neste caso, o transporte de massa através da solução foi caracterizado como difusional.

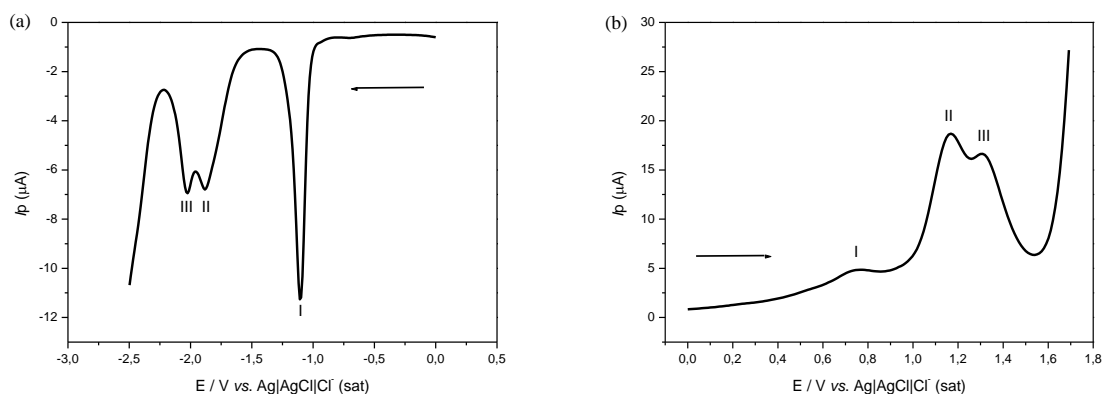


**Figura 33.** (a) e (b) Voltamogramas cíclicos do Ácido Úsnico em função da velocidade de varredura. (c) gráfico de  $i_{pa}$  vs.  $v$ ; (d) gráfico de  $i_{pa}$  vs.  $v^{1/2}$ ; (e) gráfico de  $E_{pa}$  vs.  $\log v$ . [AU] = 1,0 mmol L<sup>-1</sup> em DMF/TPAP (0,1 mol L<sup>-1</sup>); eletrodo de CV.

**Tabela 20.** Parâmetros eletroquímicos obtidos a partir da VC oxidativa do Ácido Úsnico. Estudo em função da velocidade de varredura.  $E_{pa}$  vs.  $Ag|AgCl|Cl^-$  (sat.).

$\nu$ ( $V s^{-1}$ )	$\nu^{1/2}$ ( $V s^{-1}$ )	$\log \nu$	$E_{pa}$ (V)	$i_{pa}$ ( $\mu A$ )
0,010	0,100	-2,000	1,235	7,043
0,020	0,141	-1,699	1,240	9,133
0,035	0,187	-1,456	1,259	12,353
0,050	0,224	-1,301	1,225	13,366
0,075	0,274	-1,125	1,245	16,525
0,100	0,316	-1,000	1,230	18,389

O comportamento voltamétrico do Ácido Úsnico também foi analisado através da técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD) (Figura 34), e demonstrou a presença de três picos catódicos, na região da redução, e três picos anódicos, na região da oxidação. Estes picos referem-se à redução de carbonilas e à oxidação de hidroxilas, respectivamente.



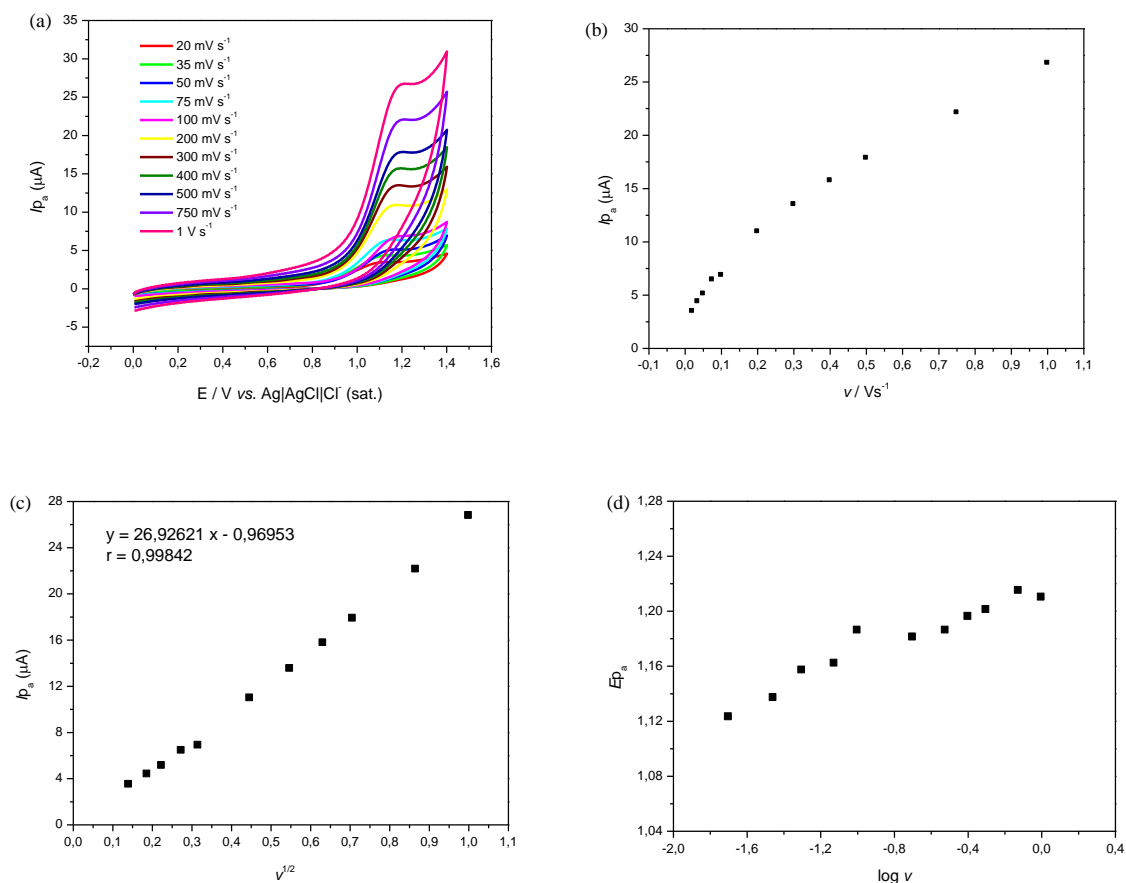
**Figura 34.** Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) redutiva (a) e oxidativa (b) do Ácido Úsnico ( $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em DMF/TBAP ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ). Eletrodo de CV;  $\nu = 0,01 \text{ V s}^{-1}$ .

#### 4.2.2 Meio Prótico

Os estudos eletroquímicos do Ácido Úsnico, em meio prótico, foram realizados em tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 e eletrodo de carbono vítreo (CV) estático (Figura 35, Tabela 21) apenas na oxidação, pois nenhum pico foi observado na região de potencial negativo, como já descrito na literatura [JORGE *et al.*, 2010].

Os voltamogramas cíclicos apresentaram uma única onda anódica em  $E_{pa} +1,154 \text{ V}$  de natureza irreversível e é devido à oxidação da hidroxila ligada ao anel aromático. Além da ausência de onda catódica referente à redução do produto da

oxidação do Ácido Úsnico, o deslocamento do potencial de pico anódico para valores mais positivos em função da velocidade de varredura corrobora a irreversibilidade do sistema.



**Figura 35.** (a) Voltamogramas cíclicos do Ácido Úsnico em função da velocidade de varredura; (b) gráfico de  $i_{pa}$  vs.  $v$ ; (c) gráfico de  $i_{pa}$  vs.  $v^{1/2}$ ; (d) gráfico de  $E_{pa}$  vs.  $\log v$ . [Ácido Úsnico] =  $3,67 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 (30% de EtOH); eletrodo de CV.

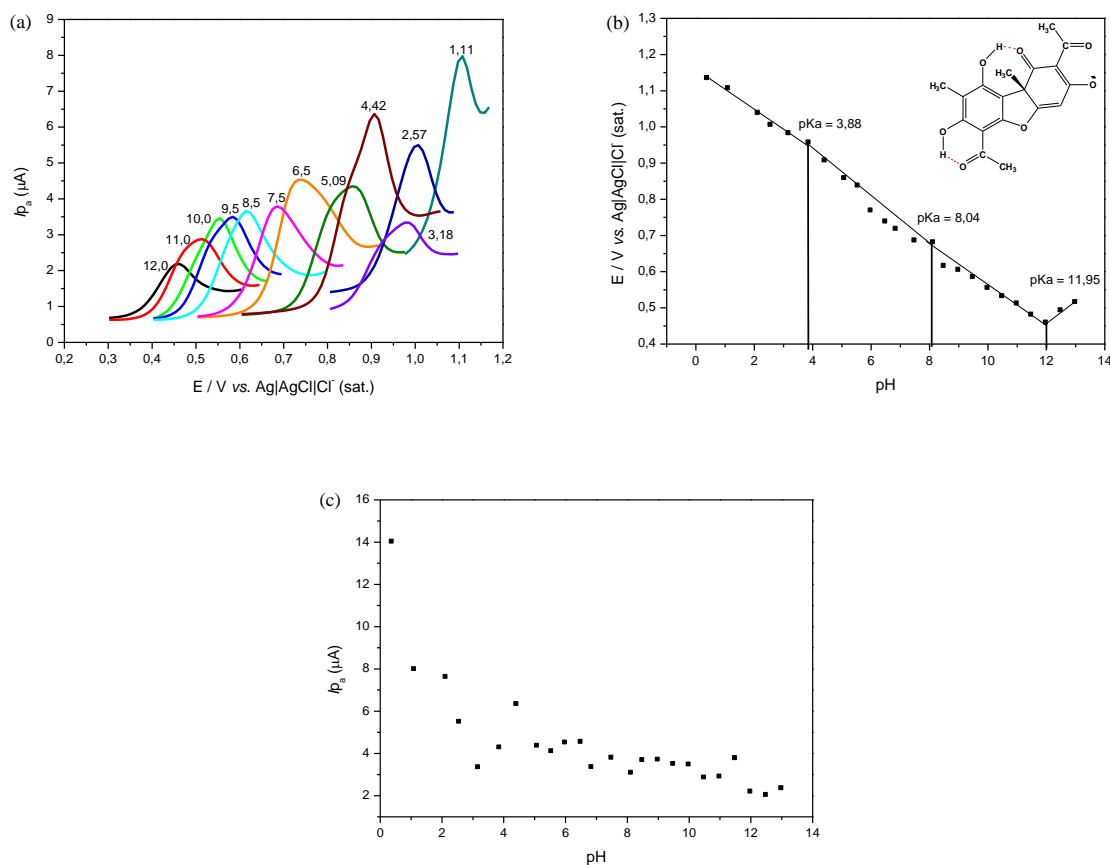
**Tabela 21.** Parâmetros eletroquímicos obtidos para o Ácido Úsnico. Estudo em função da velocidade de varredura. *Epa* vs.  $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{Cl}^-$  (sat.).

$\nu$ ( $\text{V s}^{-1}$ )	$\nu^{1/2}$ ( $\text{V s}^{-1}$ )	$\log \nu$	<i>Epa</i> (V)	<i>ipa</i> ( $\mu\text{A}$ )
0,020	0,141	-1,699	1,123	3,483
0,035	0,187	-1,456	1,137	4,371
0,050	0,224	-1,301	1,157	5,111
0,075	0,274	-1,125	1,162	6,423
0,100	0,316	-1,000	1,186	6,860
0,200	0,447	-0,699	1,181	10,955
0,300	0,548	-0,522	1,186	13,510
0,400	0,632	-0,398	1,196	15,731
0,500	0,707	-0,301	1,201	17,858
0,750	0,866	-0,125	1,215	22,113
1,000	1,000	0,000	1,210	26,760

Objetivando-se determinar o  $\text{pK}_a$  do Ácido Úsnico, estudos eletroquímicos da oxidação do mesmo foram realizados em várias faixas de pH. Para o estudo da variação do potencial de oxidação deste composto com o pH utilizou-se a técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD), com o uso de eletrodo de carbono vítreo, platina e  $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{Cl}^-$  (sat.), como eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, respectivamente.

O efeito na corrente e no potencial de pico em função do pH para o Ácido Úsnico são mostrados na (Figura 36b e Tabela 22). A corrente de pico anódica mostrou-se maior em valores de pH correspondentes ao meio ácido. O aumento do pH da solução tampão promoveu um deslocamento linear do potencial de pico anódico para valores mais negativos. A partir do gráfico do estudo do pH do Ácido Úsnico foi possível verificar três pontos prováveis de  $\text{pK}_a$  ( $\text{pK}_{a1}$ : 3,88,  $\text{pK}_{a2}$ : 8,04 e  $\text{pK}_{a3}$ : 11,95) os quais estão de acordo com a literatura ( $\text{pK}_{a1}$ : 4,40,  $\text{pK}_{a2}$ : 8,80 e  $\text{pK}_{a3}$ : 10,70) [SEGURA-SANCHEZ *et al.*, 2009]. Contudo, o efeito de adsorção do Ácido Úsnico em superfície eletródica provavelmente dificultou a visualização dos pontos de inclinação na reta.

A forte adsorção dos produtos de oxidação não-eletoativos bloqueia a superfície do eletrodo, visto que hidroxilas são espécies eletrodoadoras e, os radicais fenoxilas são alvos preferenciais para oxidantes, além de produtos poliméricos que adsorvem na superfície do eletrodo [JORGE *et al.*, 2010].



**Figura 36.** (a) Voltamogramas de pulso diferencial da dependência do potencial de oxidação do Ácido Úsnico em função do pH; (b) curva de  $E_{pa}$  vs. pH do AU; (c) curva de  $i_{pa}$  vs. pH do AU.  $[AU] = 1 \times 10^{-4}$  mol  $L^{-1}$ , 20% EtOH, eletrodo de CV.

Como descrito por JORGE *et al.* (2010), a oxidação eletroquímica do Ácido Úsnico é dependente do pH, envolve um elétron e um próton em um processo irreversível, e ocorre nas três hidroxilas da molécula, com a seguinte ordem de facilidade de oxidação: OH-1 > OH-10 > OH-8.



**Tabela 22.** Parâmetros eletroquímicos obtidos para o Ácido Úsnico. Estudo em função da variação do pH.  $E_{pa}$  vs.  $Ag|AgCl|Cl^-$  (sat.).

pH	$E_{pa}$ (V)	$i_{pa}$ ( $\mu A$ )
0,39	1,134	14,009
1,11	1,106	7,968
2,13	1,038	7,604
2,57	1,005	5,475
3,18	0,981	3,329
3,87	0,956	4,263
4,42	0,906	6,312
5,09	0,857	4,347
5,55	0,837	4,085
6,00	0,768	4,494
6,50	0,737	4,535
6,85	0,717	3,335
7,50	0,685	3,784
8,13	0,680	3,064
8,50	0,615	3,668
9,00	0,604	3,690
9,50	0,584	3,481
10,0	0,554	3,453
10,5	0,531	2,842
11,0	0,511	2,884
11,5	0,480	3,759
12,0	0,458	2,178
12,5	0,492	2,014
13,0	0,515	2,335

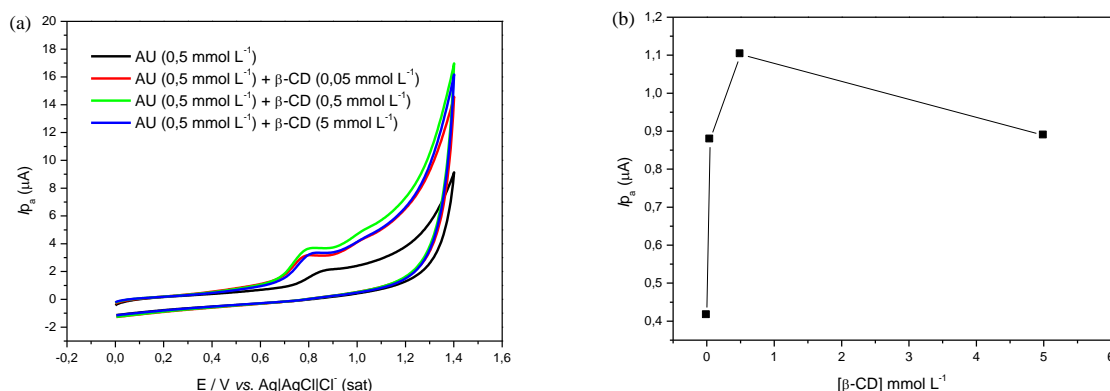
#### 4.2.2.1 Comportamento Eletroquímico do Ácido Úsnico Frente à $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD

O Ácido Úsnico apresenta uma ampla atividade biológica, no entanto sua baixa solubilidade em meio aquoso, aliado à toxicidade, tem impossibilitado seu uso em aplicações biomédicas. A fim de contornar esses aspectos, tem-se avaliado a formação do complexo de inclusão do Ácido Úsnico com ciclodextrinas [SEGURA-SANCHEZ *et al.*, 2009].

Com esse mesmo objetivo, fez-se uso da voltametria cíclica para avaliar o comportamento eletroquímico do Ácido Úsnico, parcialmente solúvel, na presença de  $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD em tampão fosfato pH 7,0.

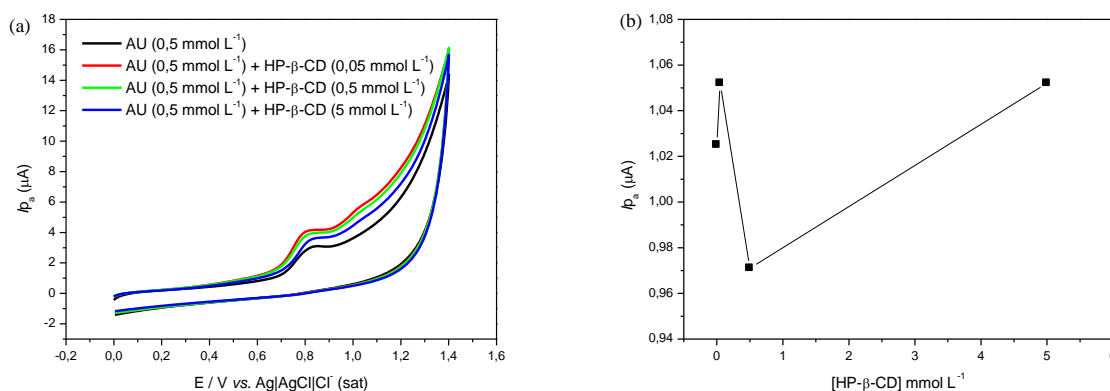
O comportamento voltamétrico observado para o Ácido Úsnico na presença de  $\beta$ -CD (Figura 37) nas proporções 10:1 e 1:1 (Ácido Úsnico: $\beta$ -CD) mostrou um aumento da intensidade de corrente de pico catódico, indicando aumento da

solubilidade, enquanto que para a proporção 1:10, se observou uma diminuição na intensidade de corrente anódica e deslocamento do potencial de pico para potencial mais negativo.



**Figura 37.** (a) Voltamogramas cíclicos do Ácido Úsnico ( $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em eletrodo de carbono vítreo e adição de  $\beta$ -CD sólida nas concentrações de  $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ . (b) Gráfico de  $I_{p_c}$  vs.  $[\beta\text{-CD}]$ . Tampão fosfato pH 7;  $\nu = 0,05 \text{ Vs}^{-1}$ .

A Figura 38 mostra o comportamento eletroquímico do Ácido Úsnico na presença de HP- $\beta$ -CD, onde se observou um aumento da corrente de pico anódico quando se introduz HP- $\beta$ -CD na proporção 10 vezes menor. A partir da análise dos voltamogramas fica evidente que a interação do Ácido Úsnico com a HP- $\beta$ -CD é menos efetiva quando comparada a  $\beta$ -CD.

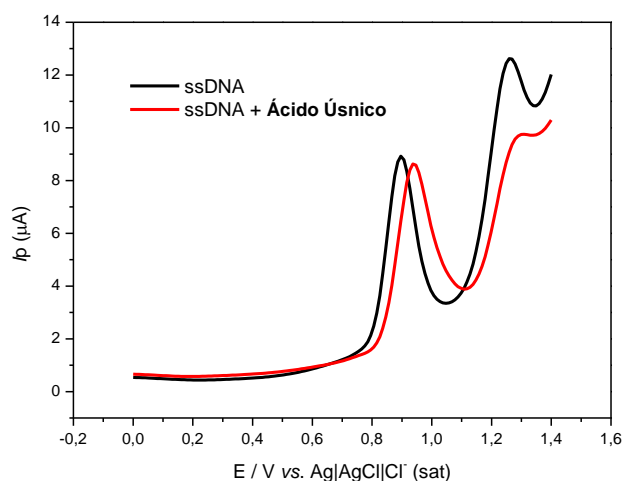


**Figura 38.** (a) Voltamogramas cíclicos do Ácido Úsnico ( $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em eletrodo de carbono vítreo e adição de HP- $\beta$ -CD sólida nas concentrações de  $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ . (b) Gráfico de  $I_{p_c}$  vs.  $[\text{HP-}\beta\text{-CD}]$ . Tampão fosfato pH 7;  $\nu = 0,05 \text{ Vs}^{-1}$ .

#### 4.2.2.2 Estudo de Interação com ssDNA

Como descrito anteriormente, o DNA é um dos alvos biológicos de maior relevância para a ação de fármacos e, portanto biossensores de DNA são úteis para esclarecer o mecanismo de ação biológica de substâncias potencialmente ativas. A Figura 39 evidencia a eletro-oxidação do ssDNA, caracterizado pela exposição das bases púricas, guanina e adenina, respectivamente, e demonstra que o Ácido Úsnico interage com o DNA, visto que observa-se um discreto deslocamento de potencial associado à uma diminuição da intensidade da corrente de pico, referente a oxidação da adenina.

Nos experimentos anteriores averiguou-se que o Ácido Úsnico em pH 4,5 apresenta um potencial de redução em torno de +0,9 V, e isto pode está relacionado a uma menor diminuição da corrente de pico anódica referente à guanina.

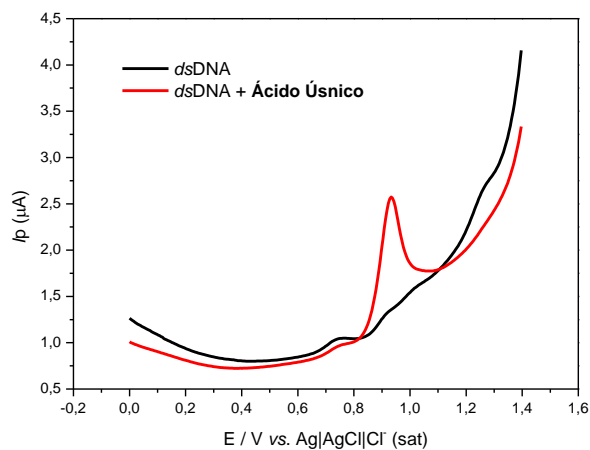


**Figura 39.** Voltamogramas de Pulso Diferencial (VPD) do Ácido Úsnico em solução etanólica (30% v/v) de ssDNA em tampão acetato pH 4,5. [Ácido Úsnico] = 0,05 mmol L<sup>-1</sup>; eletrodo de CV;  $\nu$  = 5 mV s<sup>-1</sup>.

#### 4.2.2.3 Estudo com Biossensor de dsDNA

O estudo do Ácido Úsnico em biossensor de DNA (Figura 40) demonstrou que houve ausência de interação direta desta substância com o DNA, devido ao não aparecimento dos sinais característicos de oxidação das bases nitrogenadas do DNA. O pico de oxidação, presente no voltamograma é devido à oxidação do Ácido

Úsnico. Deste modo, os resultados obtidos com biossensor eletroquímico de DNA sugerem que o Ácido Úsnico não interage com o DNA via intercalação.



**Figura 40.** Voltamogramas de Pulso Diferencial (VPD) do Ácido Úsnico em biossensor de *dsDNA* em solução etanólica (30% v/v) tamponada (tampão acetato pH 4,5). [Ácido Úsnico] = 0,05 mmol L<sup>-1</sup>; eletrodo de CV;  $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$ .

## 5 CONCLUSÃO

No presente trabalho foram investigados o comportamento eletroquímico de derivados sintéticos da  $\beta$ -lapachona e do Ácido Úsnico, substâncias biologicamente ativas, a fim de corroborar com as propriedades farmacológicas dos mesmos.

O perfil voltamétrico dos derivados da  $\beta$ -lapachona foi comparado

Os compostos da série LAUSEST apresentaram características semelhantes ao comportamento de quinonas em meio aprótico e prótico, e observou-se que mudanças de substituinte no anel piranosídico não afetam, de um modo geral, o processo de redução destas quinonas. Além disso, demonstraram, assim como seu precursor, a  $\beta$ -lapachona, reatividade com o oxigênio molecular, sugerindo que a atividade citotoxicidade dos mesmos pode estar relacionada à formação de ERO.

A interação dos compostos em estudo com  $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD em solução, foi avaliada por voltametria cíclica e, mostrou que na presença dessas moléculas hospedeiras, ocorreram mudanças no perfil voltamétrico de cada substância, principalmente da LAUSEST-AMe, sugerindo aumento de solubilidade em meio aquoso. Além disso, pode-se constatar uma possível utilização do eletrodo modificado com SAM mista de  $\beta$ -CD-SH-Au + MUA, como sensor para determinação de  $\beta$ -lapachona.

Estudos com ssDNA também foram realizados para todos os compostos, e foi possível observar interação com DNA, visto que avaliou-se a diminuição de intensidade de corrente de pico das bases púricas, guanina e adenina, assim como deslocamento no potencial de oxidação destas, implicando que tanto os compostos da série LAUSEST quanto o Ácido Úsnico, provavelmente, apresentam um mecanismo de ação biológico relacionado à interação com DNA. Já os estudos com biossensor de dsDNA, demonstraram que a interação com o DNA pode ocorrer via, alquilação do DNA, interagindo com as bases, e não como intercalantes, visto que, na presença das substâncias, não ocorreu exposição das bases do dsDNA.

## 6 PERSPECTIVAS

- ✓ Propor possíveis mecanismos que justifiquem uma reatividade diferenciada dos compostos da série LAUSEST frente ao oxigênio;
- ✓ Avaliar a interação dos derivados da  $\beta$ -lapachona com ciclodextrinas através de outras técnicas, como infravermelho e RMN  $^1\text{H}$ ;
- ✓ Testar os derivados da  $\beta$ -lapachona e o Ácido Úsnico em SAM mista de  $\beta$ -CDSH + MUA e verificar a presença de catálise com o oxigênio.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, G.M.C.; ROLIM, L.A.; NETO, P.J.R.; LEITE, A.C.L.; BRONDANI, D.J. Purificação e caracterização da  $\beta$ -lapachona e estudo de estabilidade dos cristais em diferentes condições de armazenamento. *Quim. Nova*, **2008**, v. 31, p. 413.
- BARD, A.J.; FAULKNER, L.R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, Wiley, New York, **1990**.
- BOLLO, S.; YÁÑEZ, C.; STURM, J.; NÚÑEZ-VERGARA, L.; SQUELLA J.A. Cyclic Voltammetric and Scanning Electrochemical Microscopic Study of Thioled  $\alpha$ -Cyclodextrin Adsorbed on a Gold Electrode. *Langmuir*, **2003**, v. 19, p. 3365.
- BOLTON, J. L.; TRUSH, M.; PENNING, T.; DRYHURST, G.; MONKS, T. J. Role of quinones in toxicology. *Chem. Res. Toxicol.*, **2002**, v. 13, p. 135.
- BRETT, A. M. O.; GOULART, M. O. F.; DE ABREU, F. C. Detection of the damage caused to DNA by niclosamide using a DNA biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, **2002**, v. 17, p. 913.
- BRETT, A. M. O.; MACEDO, T. R. A.; RAIMUNDO, D.; MARQUES, M. H.; SERRANO, S. H. P. Voltammetric behaviour of mitoxantrone at a DNA-biosensor, *Biosens. Bioeletronics*, **1998**, v. 13, p. 861.
- BREWSTER, M.E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2007**, v. 59, p. 645.
- BUDAL, R.M. Estudos de formação de complexos de inclusão em ciclodextrinas. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, **2003**.
- CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J.; KHARK, R. Cyclodextrinas in drug delivery: an updated review. *AAPS Pharmscitech*, **2005**, v. 6.
- CHAMBERS, J. Q. *Eletrochemistry of quinones*. In: The chemistry of quinonoid compounds, Patai, S.; Rapport, Z., eds. John Wiley & Sons Ltd: New York, **1988**.
- CHAMBERS, J. Q. *Eletrochemistry of quinones*. In: The chemistry of quinonoid compounds, Patai, S., ed. John Wiley & Sons Ltd: New York, **1974**.

CHOI, S.-W.; JANG, J.-H.; KANG, Y.-G.; LEE, C.-J.; KIM, J.-H. Characterization of self assembled thiolated  $\beta$ -cyclodextrin and tolane thioacetate mixed monolayer. *Colloids Surf., A*, **2005**, v. 257-258, p. 31.

COCCHIETTO, M.; SKERT, N.; NIMIS, P. L.; SAVA G. A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften*, **2002**, v. 89, p. 137.

DAMOS, F.S.; LUZ, R.C.S.; SABINO, A.A.; EBERLIN, M.N.; PILLI, R.A.; KUBOTA, L.T. Adsorption kinetic and properties of self-assembled monolayer based on mono(6-deoxy-6-mercapto)- $\beta$ -cyclodextrin molecules. *J. Electroanal. Chem.*, **2007**, v. 601, p. 181.

DE ABREU, F. C.; FERRAZ, P. A. L.; GOULART, M. O. F. Some applications of electrochemistry in biomedical chemistry. Emphasis on the correlation of electrochemical and bioactive properties. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2002a**, v. 13, p. 19.

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

DE ABREU, F.C.; FERREIRA, D.C.M.; GOULART, M.O.F.; BURIEZ, O.; AMATORE, C. Electrochemical activation of  $\beta$ -lapachone in  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes and reactivity of its reduced form towards oxygen in aqueous solutions. *J. Electroanal. Chem.*, **2007**, v. 608, p. 125.

DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ, P.; LOBO-CASTAÑÓN, M. J.; MIRANDA-ORDIERES, A. J.; MUÑOZ-BLANCO, P. Electrochemistry of Nucleic Acids at Solid Electrodes and Its Applications. *Electroanal.*, **2004**, v. 16, p. 1193.

DRYHURST, G. Electrochemistry of biological molecules. *Academic Press*, New York, **1977**.

ENDO, H., NAKAJI-HIBARAYASHI, T.; MOROKOSHI, S.; GEMMEI-IDE, M. and KITANO, H. Orientational Effect of Surface-Confined Cyclodextrin on the Inclusion of Bisphenol. *Langmuir*, **2005**, v. 21, p. 1314.



FERREIRA, V. F.; SILVA, M. N.; SOUZA, M. C. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na  $\beta$ -lapachona e derivados. *Química Nova*, **2003**, v. 26, n. 3, p. 407.

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

FRYDMAN, B.; MARTON, L. J.; SUN, J. S.; NEDER, K.; WITIAK, D. T.; LIU, A. A.; WANG, H.; MAO, Y.; WU, H.; SANDERS, M. M.; LIU, L. F. Induction of DNA topoisomerase II-mediated DNA cleavage by beta-lapachone and related naphthoquinones. *Cancer Res.* **1997**, v. 57, p. 620.

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

GOULART, M. O. F.; FALKOWSKI, P.; OSSOWSKI, T.; LIWO, A. Electrochemical study of oxygen interaction with lapachol and its radical anions. *Bioelectrochem.*, **2003**, v. 59, p. 85.

HILLARD, E.A.; DE ABREU, F.C.; FERREIRA, D.C.M.; JAOUEN, G.; GOULART, M. O.F.; AMATORE, C. Electrochemical parameters and techniques in drug development. Emphasis on quinones and related compounds. *Chem. Comm.*, **2008**, p. 2612.

INGÓLFSDÓTTIR, K.; CHUNGB, G. A. C.; SKÚLASONA, V. G.; GISSURARSON, S. R.; VILHELMSDÓTTIR, M. Antimycobacterial activity of lichen metabolites in vitro. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **1998**, v. 6, p. 141.

IRONS, R. D.; SAWAHATA, T. In: Patai, M. W., *Bioactivation of Foreign Compounds*, New York, Academic Press, **1985**.

JACQ, J. Reactions chimiques et électrochimiques couplées en régime stationnaire. 2. Systèmes redox consécutifs. *Electrochim. Acta*, **1967**, v. 12, p. 1345.

JEFTIC; MANNING. *Electrochemistry of quinones*. In: The chemistry of quinonoid compounds, Patai, S.; Rapport, Z., eds. John Wiley & Sons Ltd: New York, **1970**.

JORGE, S. M. A.; PONTINHA, A. D. R.; MARQUES, M. P.M.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Solid state electrochemical behavior of usnic acid at a glassy carbon electrode. *Analytical Letters*, **2010**, v. 43 p. 1713.

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

LOFTSSON, T.; MASSON, M. Review. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *Int. J. Pharm.*, **2001**, v. 225, p. 15.

MAKIN, G.; DIVE, C. Apoptosis and cancer chemotherapy. *Trends Cell Biol.* **2001**, v. 11, p. S22.

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

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

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

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S.; Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Quim. Nova*, **2001**, v. 24, p. 105.

NEDER, K.; MARTON, L. J.; LIU, L. F.; FRYDMAN, B. Reaction of beta-lapachone and related naphthoquinones with 2-mercaptoethanol: A biomimetic model of topoisomerase II poisoning by quinones. *Cell Mol. Biol.*, **1998**, v. 44, p. 465.

OKSANEM, I. Ecological and biotechnological aspects of lichens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2006**, v. 73, p. 723.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. *Quim. Nova*, **2002**, v. 25, p. 976.

OSSOWSKI, T.; PIPKA, P.; LIWO, A.; JEZIOREK, D. Electrochemical and UV-spectrophotometric study of oxygen and superoxide anion radical interaction with

anthraquinone derivatives and their radical anions. *Electrochim. Acta.*, **2000**, v. 45, p. 3581.

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

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

ROJAS, M.T.; KÖNIGER, R.; STODDART, J.F.; KAIFER, A.E. Supported Monolayers Containing Preformed Binding Sites. Synthesis and Interfacial Binding Properties of a Thiolated  $\beta$ -Cyclodextrin Derivative. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, v. 117, p. 336.

ROLIM NETO P. J.; ALVES, G. M.; ROLIM, L. A.; LEITE, A. C.; BRONDANI, D. J.; MEDEIROS, F. P.; BIEBER, L. W.; MENDONÇA, F. J. Purificação e caracterização da  $\beta$ -lapachona e estudo de estabilidade dos cristais em diferentes condições de armazenamento. *Química Nova*, **2008**, v. 31, n. 2, p. 413.

SANTOS-MAGALHÃES, S.N.; LIRA, M.C.B.; FERRAZ, M.S.; SILVA, D. G. V. C.; CORTES, M. E.; TEIXEIRA, K. I.; CAETANO, N. P.; SINISTERRA, R. D.; PONCHEL, G. Inclusion complex of usnic acid with  $\beta$ -cyclodextrin: characterization and nanoencapsulation into liposomes. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2009**, v. 64, p. 215.

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

SEGURA-SANCHEZ. Elucidation of the complexation mechanism between (+)-usnic acid and cyclodextrins studied by isothermal titration calorimetry and phase-solubility diagram experiments. *Journal of molecular recognition*, **2009**, v. 22, p. 232.

SILVA, M.N.; FERREIRA, V.F.; SOUZA, M.C.B.V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na  $\beta$ -Lapachona e derivados. *Química Nova*, **2003**, v. 26, p. 407.

SIQUEIRA-MOURA, M. P.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; LIRA, M. C. B. Validação de método analítico espectrofotométrico UV para determinação de ácido úsnico em lipossomas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2008**, v. 44, p. 621.

SZEJTLI, J.; SZENTE, L. Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2005**, v. 61, p. 115.

VENTURINI, C. G.; NICOLINI, J.; MACHADO, C.; MACHADO, V.G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. *Quím. Nova*, **2008**, v. 31, p. 360.

YANG, J.; LIN, H.-J.; HUANG, H-Y. Characterization of cyclodextrin-modified infrared chemical sensors. Part I. Modeling the mechanisms of interaction. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, v. 527, p. 27.

ZUMAN, P. *Substituents Effects in Organic Polarography*. Plenum Press: New York, **1967**, caps. I, II and VIII, p.1; 23; 273.