



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MÁRCIO ANDRÉ DA SILVA SOUSA

ESTUDO BIOELETROQUÍMICO E TOXICOLÓGICO SOBRE O ZEBRAFISH (*D. rerio*) DE DUAS SÉRIE DE DERIVADOS AMINOGUANIDÍNICOS

MACEIÓ

2019

MÁRCIO ANDRÉ DA SILVA SOUSA

ESTUDO BIOELETROQUÍMICO E TOXICOLÓGICO SOBRE O ZEBRAFISH (*D. rerio*) DE DUAS SÉRIE DE DERIVADOS AMINOGUANIDÍNICOS

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do grau de Mestre Em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Aline Barros Fidelis de Moura.

MACEIÓ

2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

S725e Sousa, Márcio André da Silva.
 Estudo bioeletroquímico e toxicológico sobre o zebrafish (*D. rerio*) de duas séries de derivados aminoguanidínicos / Márcio André da Silva Sousa. – 2019. 95 f. : il. color.

 Orientadora: Maria Aline Barros Fidelis de Moura.
 Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2019.

 Bibliografia: f. 88-95.

 1. Peixe-zebra. 2. Bioeletroquímica. 3. Voltametria. 4. Testes de toxicidade. I. Título.

CDU: 543.55



Ata de Exame de Dissertação

Aos dezoito dias do mês de abril de 2019, às quatorze horas, reuniu-se na Sala 204 do PPGCF da ESENFAR-UFAL, a banca examinadora composta pelas docentes doutoras e pelo docente doutor, Maria Aline Barros Fidelis de Moura, José Rui Machado Reys e Fabiane Caxico de Abreu Galdino, para o Exame de Defesa da dissertação intitulada: "Estudo bioeletroquímico e toxicológico sobre o zebrafish (D. rerio) de duas séries de derivados aminoguanidínicos", elaborada pelo Mestrando Márcio André da Silva Sousa, regularmente matriculado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Nível Mestrado, sob a orientação da Prof. Dra. Maria Aline Barros Fidelis de Moura, que presidiu os trabalhos. Após apresentação por 50 minutos, o mestrando foi arguido pela banca. Em seguida, reunidos em sessão secreta às 15:55 horas, os examinadores consideraram a dissertação APROVADA OU () APROVADA COM RESTRIÇÃO, emitindo o seguinte parecer: _____

Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada às 16:15 horas e eu, Daniel de Brito Ricarte, Secretário do PPGCF, Curso de Mestrado, lavrei a presente ata que segue assinada pela Banca Examinadora e pelo Mestrando, Maceió, 18 de abril de 2019

Presidente (Orientadora): Profª Drª Maria Aline Barros Fidelis de Moura

Examinador Interno: Prof. Dr. José Rui Machado Reys

Examinadora Externa: Profª Drª Fabiane Caxico de Abreu Galdino

Mestrando: Márcio André da Silva Sousa

Dedico este trabalho,

À minha família, meus pais Antônia e
Sebastião; meus irmãos Priscylla, João e Filipe,
que sempre estiveram ao meu lado dando
significado ao que realizei.

AGRADECIMENTOS

“Demonstrar gratidão é uma das atitudes mais simples e poderosas que os seres humanos são capazes de expressar uns pelos outros”. (Randy Pausch, A lição final)

Agradeço a Deus por sua infinita bondade, pela sabedoria e paciência que me concede, além das bençãos que tenho recebido durante toda minha vida, eu tenho a certeza de que, sem ele, não estaria aqui. E agradeço também a Virgem Maria pela interseção em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais Antônia Ferreira da Silva e Sebastião Otacílio de Sousa por tudo que fizeram por mim e meus irmãos. Eles foram os maiores incentivados dos nossos estudos, pois tinham ciência de que os estudos são a maior herança que os pais podem deixar para os filhos. Eles nos ensinaram a lutar pelos nossos sonhos e de não desistir no primeiro fracasso. E principalmente, a sermos sempre humildes e nunca esquecer de nossas origens.

Aos meus irmãos João, Filipe e Priscylla por serem mais que irmãos, mas grandes amigos! Por sempre estarem ao meu lado, vocês sempre serão minhas referências!

Aos meus amigos de graduação e de mestrado que compartilharam alegrias e tristezas durante todos esses anos, especialmente a Juliana que me acompanha desde a graduação, mestrado e agora somos companheiros de trabalho.

Ao Daniel (secretário do curso de mestrado) por sua disponibilidade e boa vontade de sempre nos ajudar da melhor forma. Ele é um grande exemplo de funcionário!

A todos os farmacêuticos da Santa Casa de Misericórdia de Maceió pelo companheirismo diário, em especial a minha coordenadora Lizete Vitorino e a Michelle Almeida (que na época era minha supervisora) pela oportunidade da mudança de horário e por fim conseguir cursar o mestrado.

À minhas colegas do setor de farmácia da Santa Casa Nossa Senhora da Guia, por fazerem dos meus plantões mais alegres e serem exemplos como profissionais: Luciana, Mônica, Ariana, Simony, Renata e Paula. À farmacêutica Danielle Rose por ser um exemplo de profissional e uma grande companheira de trabalho.

Ao professor Dr João Xavier de Araújo Júnior por ceder as substâncias utilizadas na minha dissertação e a Érica pela disponibilidade e atenção quando eu precisei de sua ajuda.

À professora Dr^a Fabiane Caxico de Abreu Galdino por abrir as portas do seu laboratório (LEMAN) para serem realizadas as análises eletroquímicas e emanar gentileza e alegria comigo. Agradeço de forma especial a Samaysa que me acompanhou durante todos os experimentos, aos ensinamentos (principalmente a limpar eletrodo!) e pela paciência nesse último ano de mestrado. Eu tenho a consciência que esta dissertação não seria a mesma sem sua ajuda. E a todos os alunos do LEMAN que sempre estão de bom humor e de bem com a vida!

Ao Instituto Butantan, na pessoa da professora Mônica Lopes Ferreira pela parceria e troca de experiências durante esses dois anos.

À minha orientadora, professora Dr^a Maria Aline Barros Fidelis de Moura, minha gratidão! Agradeço de coração por toda paciência, ensinamentos e puxões de orelhas. Foi como uma mãe durante todo o mestrado. Ela ensinou mais do que a ciência em si, mas lições pra levar para toda a vida!

RESUMO

O *Danio rerio* (peixe-zebra) vem sendo utilizado há alguns anos como modelo animal experimental por apresentar semelhança genética com o seres humanos e por possuir inúmeras vantagens em relação a outros modelos de vertebrados. O uso desse peixe para análises toxicológicas no ramo da química medicinal é importante para determinar a toxicidades dos novos protótipos de fármacos, uma vez que se faz necessário tais análise na fase pré-clínica. A inclusão de estudos eletroquímicos auxiliam na elucidação da atividade biológica e toxicológica. O trabalho teve como objetivo avaliar o efeito toxicológico agudo de duas series de derivados aminoguanidínicos (LQM e LQM.1) inéditos sobre o zebrafish e investigar a relação da toxicidade com o perfil bioeletroquímico dessas substâncias. A toxicidade foi avaliada em embriões de *Danio rerio* do tipo selvagem através do FET teste nas concentrações de 20 e 50 μM para a primeira série e 20 μM para a segunda e os estudos eletroquímicos foram realizados por voltametria cíclica em meio prótico, utilizando eletrodo de carbono vítreo em tampão fosfato, nas concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ à $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para primeira série e $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para a segunda. Os derivados 3, 6, 7, 9, 11 e 13 apresentaram mortalidade abaixo de 50% nas concentrações testadas. Os derivados 10, 14, 17 e 19 apresentaram mortalidade de 100% nas duas concentrações testadas. Já os derivados da segunda série (LQM.1) apresentaram sobrevida dos embriões maior que 70%. As substâncias 2, 5, 7, 8, 18 e 20 da primeira série apresentaram teratogenicidade em larvas durante as 96 horas de exposição e as 2.1, 3.1, 5.1, 6.1, 8.1, 9.1, 10.1, 13.1, 16.1, 17.1, 18.1 e 19.1 da segunda série também acarretaram em anomalias morfológicas nas larvas. Através da voltametria observamos que o processo de transferências elétrons das séries de derivados aminoguanidínicos ocorre na faixa da oxidação e na maioria dos compostos de forma irreversível além de não ser observado uma relação entre potencial de oxidação e toxicidade. Ao investigar a interação das LQM's 09 e 19 por VPD, utilizando um eletrodo de carbono vítreo, numa solução tampão de acetato pH 4,5 com 20% de etanol com o dsDNA, verificou-se a interação do composto 09, mas não foi observado para o 19 pois seu potencial de oxidação suprimiu o sinal das bases guanina e adenina. Em contrapartida foi evidenciada a interação das LQM's 09 e 19 com a solução de ssDNA. Alguns derivados da primeira série (LQM) mostraram-se moléculas promissoras pela baixa toxicidade em embriões de zebrafish e os derivados da segunda série (LQM.1) mostraram que as alterações moleculares realizadas diminuíram a toxicidade sobre os embriões.

Palavras-chaves: Peixe-zebra; Aminoguanidinas; Bioeletroquímica; Toxicidade

ABSTRACT

Danio rerio (zebrafish) has been used for several years as an experimental animal model because it shows genetic similarity with humans and because it has many advantages over other vertebrate models. The use of this fish for toxicological analyzes in the field of medicinal chemistry is essential to determine the toxicities of the new drug prototypes since such analysis is necessary for the preclinical phase. The inclusion of electrochemical studies helps to elucidate biological and toxicological activity. The objective of this study was to evaluate the acute toxicological effect of two novel series of aminoguanidine derivatives (LQM and LQM.1) on zebrafish and to investigate the toxicity relationship with the bioelectrochemical profile of these substances. The toxicity was evaluated in wild-type *Danio rerio* embryos through the FET test at the concentrations of 20 and 50 μM for the first series and 20 μM for the second series. The electrochemical studies were performed by cyclic voltammetry in a protic environment, using a glassy carbon electrode in phosphate buffer, at the concentration of $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ at $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ for first series and $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ for the second. Derivatives 3, 6, 7, 9, 11, and 13 showed mortality below 50% at the concentrations tested. Derivatives 10, 14, 17, and 19 showed 100% mortality in the two concentrations tested. The derivatives of the second series (LQM.1) presented the embryo survival rate greater than 70%. The substances 2, 5, 7, 8, 18 and 20 of the first series showed teratogenicity in larvae during 96 hours of exposure and 2.1, 3.1, 5.1, 6.1, 8.1, 9.1, 10.1, 13.1, 16.1, 17.1, 18.1 and 19.1 of the second series also resulted in morphological abnormalities in the larvae. Through the voltammetry, we observed that the electron transfer process of the series of aminoguanidine derivatives occurs in the oxidation range and in the most of the compounds in an irreversible way besides not being observed relation between oxidation potential and toxicity. In investigating the interaction of LQM's 09 and 19 by VPD, using a glassy carbon electrode, in a sodium acetate buffer solution, pH 4,5, with 20% ethanol with dsDNA, the interaction of compound 09 was observed but was not observed for 19 because its potential of rust obscured the signal of guanine and adenine bases. In contrast, the interaction of LQM's 09 and 19 with the ssDNA solution was evidenced. Some derivatives of the first series (LQM) showed promising molecules due to the low toxicity in zebrafish embryos and the second series derivatives (LQM.1) showed that the molecular alterations performed diminished the toxicity on the embryos.

Keywords: Zebrafish; Aminoguanidine; Bioelectrochemical; Toxicity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Zebrafish adulto.....	22
Figura 2 - Vantagens do uso do Zebrafish (<i>D. rerio</i>) como modelo experimental em relação a outras espécies experimentais.....	24
Figura 3 – Estrutura química da Aminoguanidina e do aminoácido L-arginina estruturalmente relacionado.....	28
Figura 4 - Estrutura química dos grupamentos amidina e hidrazona.....	29
Figura 5 – Métodos eletroanalíticos: Sua classificação geral.....	31
Figura 6 – Modelos de respostas do potencial ao eletrodo (a) sistema reversível (b) e sistema irreversível (c).....	33
Figura 7 – Representação esquemática de aplicação de potencial em voltametria de pulso diferencial. a) Plotagem da rampa de potencial e aplicação do pulso. A corrente é mostrada em 1 e 2; b) Voltamograma com pico de corrente gaussiana.....	34
Figura 8 – DNA em fila dupla com representação detalhada do interior hidrofóbico do DNA, destacando as fitas formadas pelos nucleotídeos interligados e suas respectivas bases.....	36
Figura 9 – Voltamograma de pulso diferencial (VPD) obtido com eletrodo de carbono vítreo em solução tampão de acetato pH 4,5 a 0,1M com 60 µg/mL de: ssDNA (—) 1ª voltamograma e dsDNA (---) 1ª voltamograma e (—) 40ª voltamograma.....	37
Figura 10 – Estrutura geral das 20 guanilhidrazonas avaliadas.....	39
Figura 11 – Peixes-zebra criados no laboratório.....	42
Figura 12 – Embrião fecundado (A) e embrião coagulado (B).....	43
Figura 13 - Esquema dos métodos empregados para ensaio de toxicidade aguda em embriões de zebrafish: produção de ovos, extração, seleção e distribuição dos embriões fertilizados em placa de 24 poços preparadas com as determinadas concentrações.	44
Figura 14 - Disposição das placas de 24 poços. 1-5 concentrações testes, nC controle negativo, iC controle interno da placa (água diluída), Pc controle positivo e Sc controle do solvente.....	45

Figura 15 - Falta de formação da somite: embrião de zebrafish em (a) e (c) apresentando formação de somites, e em (b) e (d) a ausência ou pequena formação de somite.....	47
Figura 16 – Não desprendimento da cauda em vista lateral. *ausência do botão ocular.....	48
Figura 17 – Falta de batimentos cardíacos. É indicada pela não convulsão do coração (dupla seta).....	48
Figura 18 – Cella eletroquímica.....	50
Figura 19 – Voltamograma cíclico da superfície do carbono vítreo após limpeza.....	51
Figura 20 – Representação esquemática do biossensor de dsDNA.....	52
Figura 21 – Delay de desenvolvimento observado após 96 hpf para a substância LQM 12. Controle em 96 hpf (A), embrião 96 hpf na concentração de 20 μ M (B), embrião 96 hpf na concentração de 50 μ M (C).....	57
Figura 22 – Sobrevivência de embriões de <i>D. rerio</i> expostos aos derivados aminoguanidínicos LQM's 2-6 (A), LQM's 7-11 (B), LQM's 12-16 (C) e LQM's 17-20 (D) na concentração de 20 μ M.....	58
Figura 23 – Sobrevivência de embriões de <i>D. rerio</i> expostos aos derivados aminoguanidínicos LQM's 2-6 (A), LQM's 7-11 (B), LQM's 12-16 (C) e LQM's 17-20 (D) na concentração de 50 μ M.....	59
Figura 24 – Efeitos teratogênicos dos derivados aminoguanidínicos após 96 hpf de exposição em 50 μ M . Controle (A), LQM 02 (B), LQM 05 (C), LQM 07 (D), LQM 08 (D). Seta vermelha: escoliose, seta azul: edema de saco vitelino, seta verde: edema de pericárdio.....	60
Figura 25 – Efeitos teratogênicos dos derivados aminoguanidínicos após 96 hpf de exposição em 50 μ M . Controle (A), LQM 08 (B), LQM 18 (C), LQM 20. Seta vermelha: escoliose, asterisco: ausência de bexiga natatória.....	61
Figura 26 – Voltamogramas cíclicos para os compostos LQM's 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19 e 20 nas concentrações de 1 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ (-), 2 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ (-) e 3 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ (-) em meio aquoso etanólico (10%), tampão fosfato pH 7. Eletrodo de carbono vítreo, v = 50mV s ⁻¹	68

Figura 27 – Voltamogramas de pulso diferencial registrado após 15 minutos de exposição de um biossensor de dsDNA a diferentes concentrações da LQM 09 em tampão acetato (pH 4,5). Amplitude do pulso de 50 mV, largura do pulso de 70 ms e taxa de varredura de 0,005 V s ⁻¹	74
Figura 28 – Voltamogramas de pulso diferencial registrado após 15 minutos de exposição de um biossensor de dsDNA a diferentes concentrações da LQM 19 em tampão acetato (pH 4,5). Amplitude do pulso de 50 mV, largura do pulso de 70 ms e taxa de varredura de 0,005 V s ⁻¹	75
Figura 29 – Voltamogramas de pulso diferencial da LQM 09, presente em diferentes concentrações, em tampão acetato (pH 4,5) em solução de ssDNA. O pico Ia está relacionado a oxidação do composto e os picos marcados com G e A estão relacionados com a oxidação de guanina e adenina respectivamente.....	76
Figura 30 – Voltamogramas de pulso diferencial da LQM 19, presente em diferentes concentrações, em tampão acetato (pH 4,5) em solução de ssDNA. O pico Ia está relacionado a oxidação do composto e os picos marcados com G e A estão relacionados com a oxidação de guanina e adenina respectivamente.....	77
Figura 31 – Sobrevivência de embriões de <i>D. rerio</i> expostos aos derivados aminoguanidínicos LQM's 1.1-5.1 (A), LQM's 6.1-10.1 (B), LQM's 11.1-15.1 (C) e LQM's 16.1-20.1 (D) na concentração de 20µM.....	79
Figura 32 – Efeitos teratogênicos dos derivados aminoguanidínicos após 96 hpf de exposição em 20 µM. Controle (A), LQM 2.1 (B), LQM 3.1 (C), LQM 5.1 (D), LQM 6.1 (E) e LQM 8.1 (F). Seta vermelha: edema de pericárdio, seta amarela: edema de saco vitelino e asterisco verde: ausência de bexiga natatória.....	80
Figura 33 – Efeitos teratogênicos dos derivados aminoguanidínicos após 96 hpf de exposição em 20 µM. Controle (A), LQM 9.1 (B), LQM 10.1 (C) e LQM 13.1 (D). Seta vermelha: edema de pericárdio, seta amarela: edema de saco vitelino, seta azul: escoliose e asterisco verde: ausência de bexiga natatória.....	81
Figura 34 – Efeitos teratogênicos dos derivados aminoguanidínicos após 96 hpf de exposição em 20 µM. Controle (A), LQM 16.1 (B), LQM 17.1 (C), LQM 18.1 (D) e LQM 19.1 (E). Seta vermelha: edema de pericárdio, seta amarela: edema de saco vitelino, seta azul: escoliose e asterisco verde: ausência de bexiga natatória.....	82

Figura 35 – Voltamogramas cíclicos para os compostos LQM's 1.1, 2.1, 3.1, 4.1, 5.1, 7.1, 9.1, 10.1, 11.1, 12.1, 13.1, 14.1, 16.1, 17.1, 18.1 e 20.1 na concentração de $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio aquoso etanólico (10%), tampão fosfato pH 7. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem da sobrevivência de embriões e larvas de <i>D. rerio</i> pelas diferentes concentrações das Guanilhidrazonas testadas 96 horas pós-fertilização.....	54
Tabela 2 – Valores do coeficiente de partição (Log P) das guanilhidrazonas testadas.....	62
Tabela 3 – Parâmetros eletroquímicos para os derivados aminoguanidínicos na maior concentração testada. Eletrodo de carbono vítreo, E Vs. Ag AgCl Cl-sat, $v = 50\text{mV s}^{-1}$	66
Tabela 4 – Relação entre os potenciais redox e toxicidade das guanilhidrazonas testadas.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS SÍMBOLOS E SIGLAS

ΔE	Variação de potencial
AMG	Aminoguanidina
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATP	Trifosfato de Adenosina do inglês “Adenosine Triphosphate”
CE₅₀	Concentração efetiva média
CEUA	Comissão de Ética no uso de Animais
CL₅₀	Concentração letal média
DNA	Ácido desoxirribonucleico do inglês “Deoxyribonucleic Acid”
dsDNA	DNA de fita dupla
E_{1/2}	Potencial de meia onda
E_{p2}	Potencial de pico a meia altura de onda
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_{pc}	Potencial de pico catódico
FET	Embryo Toxicity Test
GHZ	Guanilhidrazona
Hpf	Horas pós-fertilização
I	Corrente elétrica
I_{pa}	Corrente elétrica de pico anódico
I_{pc}	Corrente elétrica de pico catódico
ISO	Organização Internacional de Normatização
NO	Óxido nítrico
OECD	Organisation for economic Co-operation and Development

SNC	Sistema Nervoso Central
ssDNA	DNA de fita simples
TE	Técnicas eletroquímicas
USEPA	United States Environmental Protection Agency
VC	Voltametria Cíclica
VPD	Voltametria de Pulso Diferencial
WNT	Working Group of the National Coordinators
ZFIN	Zebrafish Information Network

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1 Toxicidade	21
2.2 O <i>Danio rerio</i>	22
2.2.1 Emprego do Zebrafish como modelo experimental.....	23
2.2.2 Emprego do Zebrafish em estudos toxicológicos de novos fármacos.....	25
2.3 Aminoguanidíνας	28
2.4 Técnicas eletroquímicas	30
2.4.1 Voltametria Cíclica.....	32
2.4.2 Voltametria de pulso diferencial.....	34
2.4.3 Biossensor de DNA.....	35
3 OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo geral	38
3.2 Objetivos específicos	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Amostras	39
4.2 FET teste	40
4.2.1 Aspectos éticos.....	41
4.2.2 Animais.....	41
4.2.3 Reprodução.....	41
4.2.4 Seleção de ovos.....	43
4.2.5 Preparo das placas.....	44

4.2.6 Manutenção dos embriões e larvas.....	46
4.2.7 Avaliação dos embriões e larvas.....	46
4.2.8 Mortalidade.....	46
4.3 Análises eletroquímicas.....	48
4.3.1 Preparo das Soluções.....	49
4.3.2 Voltametria Cíclica.....	49
4.3.3 Investigação da interação dos compostos com DNA por voltametria de pulso diferencial (VPD).....	51
4.3.3.1 Preparo do gel de dsDNA e análise da interação do filme com as amostras (AMG)...	51
4.3.3.2 Preparo da solução de ssDNA e análise da interação da mesma com as amostras (AMG).....	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
5.1 Avaliação da Toxicidade aguda da série LQM em embriões de zebrafish (FET teste).....	54
5.2 Comportamento eletroquímico da série LQM.....	64
5.2.1 Estudo Eletroquímico das Guanilhidrazonas em meio prótico.....	64
5.2.2 Estudo da interação dos compostos com o biossensor de DNA utilizando VPD.....	73
5.2.3 Estudo da interação dos compostos com o sensor de ssDNA utilizando VPD.....	75
5.3 Avaliação da Toxicidade aguda da série LQM.1 em embriões de zebrafish (FET teste).....	78
5.4 Comportamento eletroquímico da série LQM.1 por voltametria cíclica (VC) em meio prótico.....	83
6 CONCLUSÃO.....	87
7 PERSPECTIVAS.....	89
8 REFERÊNCIAS.....	90

1. INTRODUÇÃO

O estudo para o desenvolvimento de novos fármacos requer a realização de experimentos com animais em níveis celular e molecular, tanto para o desenvolvimento de novas terapias, como para determinar a segurança do composto (toxicidade). O *Danio rerio*, também chamado de zebrafish ou paulistinha (no Brasil), é um peixe de pequeno porte (aproximadamente 0,5 cm) que vive nas regiões tropicais de água doce do Sul da Ásia. Esse vertebrado tem se destacado como modelo experimental para avaliar toxicidade de diversos compostos. A utilização do *D. rerio* como modelo experimental cresceu consideravelmente nos últimos anos. Ele tem sido utilizado em diversos estudos, isto é reflexo do avanço da tecnologia, ciência e detalhamento genético e molecular do zebrafish.

O *D. rerio* ao longo do tempo tornou-se um modelo de vertebrado comumente usados para avaliar toxicidade de drogas e produtos químicos. Mesmo apresentando evidentes diferenças fisiológicas com os seres humanos, o paulistinha é uma plataforma ideal para ensaios *in vivo*. Isso se deve ao seu baixo custo em relação aos outros modelos animais. Apesar da diferença evolutiva em relação ao homem, sendo necessário a repetição em outros modelos animais para serem diretamente correlacionados com os seres humanos, o *D. rerio* é excelente para estudos preliminares e seletivos por conta da sua praticidade e rápida obtenção de resultados (GUYON et al., 2007).

As Guanilhidrazonas (Aminoguanidinas) representam uma classe de substâncias amplamente estudadas, pois apresentam propriedades químicas e biológicas importantes. Essa classe possui vários estudos sobre suas ações terapêuticas, dentre elas se encontram: ações anti-hipertensivas, antidiabéticas, antineoplásicas, antibacterianas, antimaláricas e tripanocida (MARTINS, 2004). Deste modo, é importante a elucidação dos mecanismos de toxicidade, identificar pontos finais de toxicidade e a relação dose-resposta dessas substâncias frente ao *D. rerio*.

Na avaliação de toxicidade de um composto, é necessário determinar os pontos finais de toxicidade, a relação dose-resposta, a determinação dos mecanismos de toxicidade, e determinar a toxicodinâmica da droga. Dentre esses testes, a toxicidade a curto (aguda) e longo (crônica) prazo são medidas em animais, para que suas propriedades farmacológicas possam

ser definidas dentro de uma relação dose-resposta. Experimentos de toxicidade com vertebrados são comumente usados para identificação de perigo ambiental e avaliação de risco de produtos químicos, fitossanitários, farmacêuticos, biocidas, aditivos para alimentos e efluentes (BRAUNBECK et al., 2014; SCHOLZ et al., 2013).

A eletroquímica é útil na investigação do comportamento dos fármacos ou protótipos de fármacos, principalmente quanto à simulação de processos farmacológicos, bioquímicos e/ou toxicológicos, visto que os fenômenos de oxirredução estão relacionados como os principais mecanismos de metabolismo celular. Esses estudos também ajudam na elucidação dos mecanismos de transferência de elétrons, com reações acopladas assim como na investigação da interação de intermediários de redução com macromoléculas específicas nos organismos vivos (ANDRES; ECKMANN; SMITH, 2013).

Os estudos eletroquímicos podem ser desenvolvidos em vários meios, prático, aprótico e mistos, desta forma, tem-se resultados com diferentes comportamentos eletroquímicos. Relacionando com atividade biológica, é necessário reproduzir os vários meios celulares. Os meios podem ser hidrofílicos ou lipofílicos. Para simular sistemas lipofílicos (membranas, sítio alvo de proteínas), o processo redox pode ser realizado em meios não aquosos, já para simular sistemas hidrofílicos, como fluidos citoplasmáticos, o processo redox pode ser realizado em meios aquosos (CAVALCANTI et al., 2004; DE PAIVA et al., 2012).

A partir destas considerações propôs-se pesquisar os seguintes problemas: Investigar se a utilização das concentrações de Guanilhidrazonas promove toxicidade aguda em embriões de *D. rerio*; se existe relação entre o comportamento redox das Guanilhidrazonas com sua toxicidade nos embriões desse peixe e analisar a interatividades desses compostos frente ao “dsDNA” (DNA de fita dupla) e “ssDNA” (DNA de fita simples).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Toxicidade

Toxicidade é a capacidade inerente de uma substância e seu potencial de causar danos aos organismos vivos e é relacionada a concentração e duração da exposição. A expressão da toxicidade de um agente tóxico depende das características da exposição e de seus efeitos no organismo. Desta forma, a toxicidade pode ser descrita como um evento molecular único, que envolve preferencialmente, uma cascata de eventos, que se inicia com a exposição, em seguida da distribuição e biotransformação. Esses eventos estão relacionados aos mecanismos de transporte e de interação com sítio ou órgãos-alvo, ou seja, os efeitos nocivos só se manifestam se o xenobiótico alcançar locais específicos do organismo, nas concentrações suficientes para desencadear algum efeito tóxico (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

Os ensaios de toxicidade permitem estabelecer limites de concentrações para vários compostos químicos e permite avaliar de forma considerável o impacto de misturas de poluentes (substâncias) sobre os organismos aquáticos dos corpos hídricos receptores (BERTOLETTI, 1990).

Quando se trata de testes de toxicidade podem ser observados efeitos agudos e os efeitos crônicos. Os efeitos agudos são aqueles que ocorrem rapidamente após a exposição ao toxicante por um curto período de tempo (horas, dias ou semanas). Quando se ultrapassa esse período para desencadear alguma resposta tóxica, considera-se efeito crônico. Os testes de toxicidade aguda são experimentos de curta duração, que geram respostas rápidas em estudos de letalidade tóxica, onde o objetivo é determinar a Concentração Letal Média (CL_{50}) de determinada substância. Quando se trata de organismos aquáticos o tempo varia de 24 a 96 horas de exposição. Normalmente, o efeito é a letalidade, porém dependendo do organismo aquático o efeito pode ser a imobilidade (LOMBARDI, 2004).

A CL_{50} e a “ CE_{50} ” (concentração efetiva média) são consideradas para avaliação do efeito agudo. A primeira é a Concentração letal média, ou a concentração do toxicante que causa mortalidade de 50% dos organismos expostos num intervalo de 24 a 96 horas, a segunda, é a concentração efetiva média, ou a concentração do toxicante que causa imobilidade de 50% dos organismos expostos no intervalo de tempo igual ao da primeira.

O estresse agudo em peixes é caracterizado por danos morfológicos severos, ou seja, alterações físicas, alterações no metabolismo, colapso a nível celular e perda de tecido. Se a perda de tecido for exacerbada ou se algum processo biológico vital for irreversivelmente comprometido, o organismo irá morrer. Caracterizando a toxicidade letal aguda (KIDD; WEINSTEIN, 2003).

2.2 O *Danio rerio*

O *D. rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae) conhecido como Paulistinha ou peixe-zebra (Figura 1, página 22), é de pequeno porte, de água doce e de regiões tropicais da Ásia. Ele vive em média três anos e atinge no máximo, 5 cm de comprimento e é uma espécie gregária, mais comumente encontrado em cardumes de 5-20 indivíduos. Ele é um dos mais importantes modelos de organismos vertebrados para pesquisas biológicas, pois sua embriologia e genética são consideradas excelentes para estudo (DAMMSKI et al., 2011).

Figura 1 – Zebrafish adulto



FONTE: DAMMSKI et al., 2011.

2.2.1 Emprego do Zebrafish como modelo experimental

O *D. rerio* é criado em biotérios desde os anos 50, porém apenas 30 anos mais tarde, o pesquisador George Streisinger, realizou um estudo pioneiro e revolucionário, o qual empregou técnicas que anteriormente só eram possíveis em invertebrados. A partir dos anos 90, inúmeros estudos alavancaram o zebrafish como modelo experimental clássico. Hoje, esses estudos abrangem diversos campos da ciência, como a área da genética, toxicologia, comportamento e evolução (DAMMSKI et al., 2011). Entretanto, o *Danio rerio* não é utilizado apenas em pesquisas biomédicas, mas também para estudos de ecotoxicidade. Desta forma, o teste de toxicidade aguda dos peixes representa o ensaio de vertebrados mais realizado para medir e avaliar riscos ambientais (AŠMONAITE et al., 2016; BRAUNBECK et al., 2014).

A necessidade por ensaios simples e rápidos com organismos vivos levou à busca de novos testes. Por muito tempo se utiliza *Artemia salina* para determinar letalidade e monitorização de atividade biológica simples e é utilizada como bioensaio preliminar para substâncias químicas (CAVALCANTE et al., 2000). Por outro lado, o uso do *D. rerio* é mais vantajoso que o uso de *Artemia salina* ou qualquer outro crustáceo, pois existem várias características que o favorecem como modelo de estudo. Podemos citar: pouco espaço para sua manutenção, baixo custo, fácil manipulação e desenvolvimento, ciclo biológico acelerado, facilidade na análise comportamental em ambientes controlados, sensibilidade para drogas, pequeno porte, rápida metabolização e genética semelhante 70% com o ser humano (GOLDSMITH, 2004).

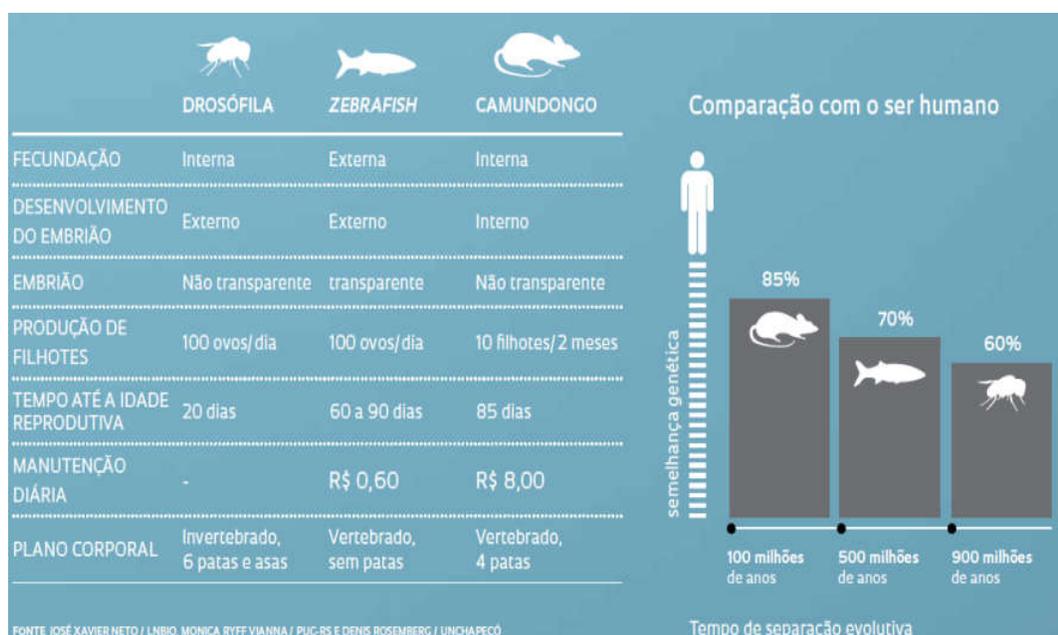
O crescimento no número de pesquisas e publicações usando o *D. rerio* como modelo animal se intensificou, isso se deve ao sequenciamento do seu genoma, por apresentar genoma similar com os dos seres humanos e camundongo (BARBAZUK et al., 2000). Todo esse crescimento resultou na criação de um site especializado nesse tema, o “ZFIN” - Zebrafish Information Network (<http://zfin.org>), onde os criadores disponibilizam informações completas sobre seu uso, desde a anatomia até a sua criação.

Em comparação com outros modelos animais o zebrafish possui várias vantagens. Ele possui 70% de semelhança genética com o ser humano, o seu desenvolvimento embrionário pode ser observado através do córion (transparente) até vinte quatro horas após a fertilização. Esse fato contribui para a detecção de anormalidades durante o desenvolvimento embrionário em testes de toxicidade. Sua rápida capacidade reprodutiva e suas características morfológicas

e fisiológicas, aceleram o processo de descoberta de novos fármacos (STERN; ZON, 2003). Pode-se também realizar ensaios em todos os seus estágios de vida, desde embrião até peixe adulto, além da manutenção diária ser mais barata em relação a manutenção dos camundongos. Já quanto as substâncias testadas, elas podem ser adicionadas diretamente na água, pois são absorvidas de forma rápida e acumuladas em diferentes tecidos, principalmente no sistema nervoso central (SNC) pelo *D. rerio* (GROSELL; WOOD, 2002).

A figura 2 mostra a interessante comparação entre os diversos modelos animais e destaca as vantagens de se utilizar o zebrafish como modelo experimental.

Figura 2 - Vantagens do uso do Zebrafish (*D. rerio*) como modelo experimental em relação a outras espécies experimentais.



FONTES: José Xavier Neto / LNBio, Monica Ryff Vianna / PUC-RS e Denis Rosemberg / Unchapecó.

O teste de toxicidade aguda em embriões de peixes (FET) foi aprovado em 2013 pelo Working Group of the National Coordinators (WNT) do programa de orientação de testes da OECD (Organisation for economic Co-operation and Development) e publicado como

orientação para ensaios de produtos químicos N°236. Se tornando oficialmente a diretriz para determinar a toxicidade aguda ou letal de produtos químicos em embriões (BRAUNBECK et al., 2014; BUSQUET et al., 2014). Existem outras abordagens semelhantes que podem ser usadas para determinar a toxicidade aguda de drogas. Existem ensaios padrões recomendadas pela Organização Internacional de Normatização (ISO, 1996), Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA), Sociedade Americana de Testes e Materiais (ASTM).

Os testes de toxicidade aguda em vertebrados fazem parte da detecção das ameaças ambientais e avaliação de substâncias químicas, produtos fitofarmacêuticos e farmacêuticos. Uma das limitações do FET test é que as amostras devem ser solúveis em meio aquoso para a avaliação da toxicidade, pois as amostras são adicionadas em poços com meio E2 (aquoso) necessário para o desenvolvimento dos embriões. De acordo com o protocolo 236 da OECD (2013), os embriões de peixe zebrafish recém-fertilizados são expostos ao produto químico a ser testado durante um total de 96h. São considerados indicadores de letalidade: coagulação de ovos fertilizados, ausência de formação da somite (estrutura embrionária primitiva que dará origem a medula óssea e coluna vertebral do peixe), não desprendimento da cauda do saco vitelino e ausência de batimentos cardíacos visualizados ao microscópio.

A determinação da toxicidade de um candidato a medicamento é uma etapa decisiva, pois um composto com uma alta toxicidade pode comprometer os ensaios clínicos e torná-lo inviável.

2.2.2 Emprego do Zebrafish em estudos toxicológicos de novos fármacos

Nos últimos anos tem-se desenvolvido testes de toxicidade aguda tanto para o *D. rerio* adultos como para embriões através de recomendações internacional (OECD, 2013). Em um estudo de toxicidade aguda no *D. rerio* é considerado apenas a concentração aquosa da substância testada e desta forma não é considerada a quantidade absorvida. Porém, mesmo que os parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo e excreção podem ser diferentes em relação as mamíferos, a determinação dos valores de CL para o *D. rerio* tem sua importância positiva na compreensão dos efeitos tóxicos de drogas potencias (BARROS et al., 2008; KARI; RODECK; DICKER, 2007). Parnig et al. (2002) comparou valores de CL para 18 substâncias em embriões de zebrafish e roedores constatando que os embriões do peixe foram mais

sensíveis a exposição tóxica que os roedores. Vários estudos relatam resultados similares entre outros modelos animais e o *D. rerio*, confirmando a sua utilidade para ensaios toxicológicos pela equivalência de resultados (LU et al., 2014; VAN DEN BRANDHOF; MONTFORTS, 2010).

O zebrafish pode ser utilizado como modelo animal para realizar vários ensaios de toxicidade. Pode-se realizar ensaios de toxicidade cardíaca, hepática, histológica, morfológica, neurológica e comportamental. Para determinar cardiotoxicidade no peixe, pode-se realizar dois tipos de ensaios. A análise fenotípica é comumente usada, onde os embriões são expostos, geralmente durante 96 horas, e após esse período é observado e filmado microscopicamente alterações nas dimensões do coração ou por análise morfométrica (comprimentos do eixo longo, curto e entre as bordas dos ventrículos na sístole e diástole), frequência cardíaca e edemas (SITTARAMANE et al., 2015; WANG et al., 2017; YANG et al., 2017).

A composição hepática do *D. rerio* após 5 dias de desenvolvimento (estado larval) é semelhante ao dos seres humanos. Com exceção das células de Kupffer, todas as outras células do fígado são encontradas no zebrafish, e essas células realizam as mesmas funções em comparação com os mamíferos, incluindo a secreção biliar, síntese de glicogênio, insulina e armazenamento de lipídios. Os genes possuem um alto grau de semelhança entre o zebrafish e os humanos, tornando esse modelo animal útil para estudar os mecanismos de toxicidade hepática (GOESSLING; SADLER, 2015). Desta forma os peixes são expostos as substâncias e posteriormente é realizado os testes histopatológicos ou fenotípicos com o intuito de observar a produção ou não de efeitos inflamatórios, morfológicos ou alterações patológicas celulares na histologia do tecido.

Para determinar a toxicidade neurológica durante o desenvolvimento embrionário em mamíferos leva tempo e requer muito trabalho. Porém, o zebrafish possui vários fatores que contribuem para a sua escolha nesses tipos de ensaios. Um deles é o fato do embrião se tornar larva desenvolvida após 120 horas, apresentando funcionalidade total dos órgãos, em especial o cérebro. E apresentar homologia das vias sensoriais semelhantes aos seres humanos (XUE et al., 2013; YUAN et al., 2016). Teste de contração espontânea embrionária (contagem de movimentos de um lado para outro da cauda), teste de sensibilidade tátil (toque com uma extremidade pontiaguda e registrar fuga em 20 testes realizados), atividade de natação livre (distância total percorrida em cada minuto durante 20 minutos com luz visível) e atividade de

natação em estimulação do foto período claro-escuro são exemplos de ensaios de toxicidade neuronal (YUAN et al., 2016).

Em relação a toxicidade de órgãos específicos de vários compostos testados em embriões de *D. rerio*, KARI et al. (2007), em sua revisão, indica a existência de muitas características comuns pelos efeitos de várias substâncias em órgãos diferentes no peixe e nos mamíferos. É notório que a maioria dos genes humanos homólogos têm domínio funcional de proteínas no *D. rerio*. Logo, o uso do modelo do zebrafish para o estudo da ação das drogas sobre os seres humanos é bastante razoável, uma vez que as ligações de fármacos ocorre em domínios funcionais (CHAOYONG, 2004).

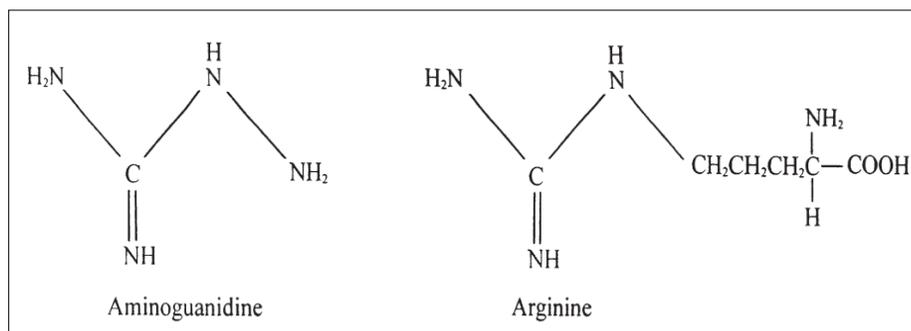
As análises morfológicas de toxicidade no zebrafish são as observações de possíveis alterações na anatomia normal do embrião ou larva do peixe, os chamados testes qualitativos. Esse ensaio é o mais utilizado, pois é fácil e rápido de se reproduzir. Durante todo processo embriogênese podemos observar a morfologia do embrião e larva porque o córion é transparente e assim facilita sua visualização. Pode-se calcular ainda as taxas de mortalidade das substâncias teste frente aos embriões, os chamados testes quantitativos. A morte é determinada, segundo o protocolo 236 da OECD (2013), quando existe coagulação dos embriões, ausência de somite, não desprendimento da cauda do saco vitelino e ausência de batimentos cardíacos.

Na prática os ensaios de toxicidade com o *D. rerio* possibilitam selecionar substâncias entre as menos tóxicas, ou seja, as mais promissoras para dar continuidade com outros experimentos e as mais tóxicas para serem novamente modificadas estruturalmente; comparar resultados com outros modelos animais menos semelhantes com os seres humanos (drosófila, crustáceos) ou até mesmo elimina-los, além da obtenção de resultados imediatos sobre a toxicidade de alguma amostra. O uso do *D. rerio* e seus embriões também contemplam os princípios de Russell-Burch (1959) de redução (reduction), substituição (replacement) e refinamento (refinement) no uso de animais, também chamado de princípio dos 3R's. Dentre as recomendações destacam-se a substituição de vertebrados vivos por invertebrados, embriões de vertebrados e microrganismos; qualidade genética, sanitária e ambiental dos animais levando a o uso de menos animais e resultados mais confiáveis e refinar o manuseio dos animais e seus protocolos.

2.3 Aminoguanidinas

A aminoguanidina (AMG, CH_6N_4 , $\text{MM}= 74,09$) foi preparada pela primeira vez em 1892 por redução da nitroguanidina, podendo ser sintetizada também, através de hidratação ou hidrólise de compostos relacionados a guanidina (LIEBER; SMITH, 1939). A AMG é um dos muitos derivados das guanidinas, porém tem propriedades em comum com as hidrazinas e por esse motivo é também classificado como guanilhidrazonas. Os compostos guanidínicos são solúveis em água quando formam sais com íons cloreto e sulfato. A estrutura química das AMG é relacionada ao aminoácido L-arginina (Figura 3, página 28), molécula importante no transporte de nitrogênio em humanos e é derivada através da ação catalítica da “NO” (Óxido nítrico) sintase (NILSSON, 1999).

Figura 3 – Estrutura química da Aminoguanidina e do aminoácido L-arginina estruturalmente relacionado



FONTE: NILSSON, 1999.

As Guanilhidrazonas, como também são chamadas, são uma classe de substâncias amplamente estudadas e de grande interesse científico, isso se deve as suas importantes propriedades químicas e biológicas. Farmacologicamente essas substâncias, destacam-se com agentes anti-hipertensivos (FOYE et al., 1990), antineoplásicos (SILVA et al., 2016), antibacterianos (MANDEWALE et al., 2015), antimaláricos (RUIZ; AVIADO, 1970) e tripanocida (MESSEDER et al., 1995).

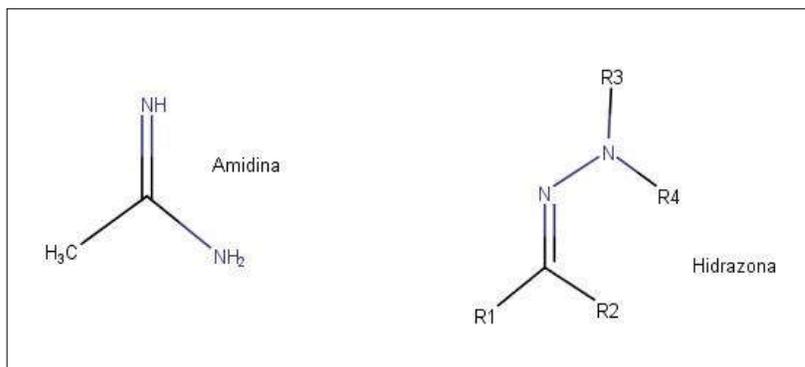
As Guanilhidrazonas (GHZ) são identificadas em sua estrutura química grupos amidina (guanil) ligados ao grupo hidrazona, como é ilustrado na Figura 4.

Os fármacos contendo o grupo guanidino têm sido alvo de testes pré-clínicos e clínicos para o tratamento de tumores. Associam essa atividade ao grupamento guanidino, sendo essencial para a ação citotóxica em células leucêmicas (LOESBERG et al., 1991). Andreani et al. (2000) sintetizou novas guanilhidrazonas que foram testadas como potenciais agentes antitumorais em linhagens de células cancerígenas da mama, pulmão e glioma. Concluíram assim, que os grupos 3-nitrofenil 3 4-nitrofenil são importantes grupamentos farmacofóricos para desencadear essa ação antitumoral.

Messeder et al. (1995) relatou que guanilhidrazonas aromáticas simples também possuem atividade contra as formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (doença de chagas). Sua ação, provavelmente, seria pela interação com a membrana do parasita ou “DNA” (Ácido desoxirribonucleico).

Alguns fármacos antihipertensivos consagrados são da mesma classe das guanilhidrazonas ou possuem similaridade estrutural com estas. Suas ações são de agonistas adrenérgicos seletivos. Sua capacidade de baixar a pressão arterial resulta da ativação dos receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos nos centros de controle cardiovascular do “SNC” (Sistema nervoso central), que suprime o efluxo de atividade do sistema nervoso simpático do cérebro (HOFFMAN, 2003; LEMKE et al., 2008).

Figura 4 - Estrutura química dos grupamentos amidina e hidrazona



FONTE: O AUTOR

Em seus estudos Sekutor et al. (2013), sintetizou guanilhidrazonas adamantano-substituídas com a finalidade de obter compostos capazes de inibir seletivamente a butirilcolinesterase, auxiliando assim no tratamento do Mal de Alzheimer. Identificando assim forte interação entre o grupo guanidino e o sítio ativo da enzima. Seguindo a mesma linha de substituição, Andreani et al., (2011) sintetizou moléculas citotóxicas com o potencial de inibir linhagens de células relacionadas ao câncer de mama.

2.4 Técnicas Eletroquímicas

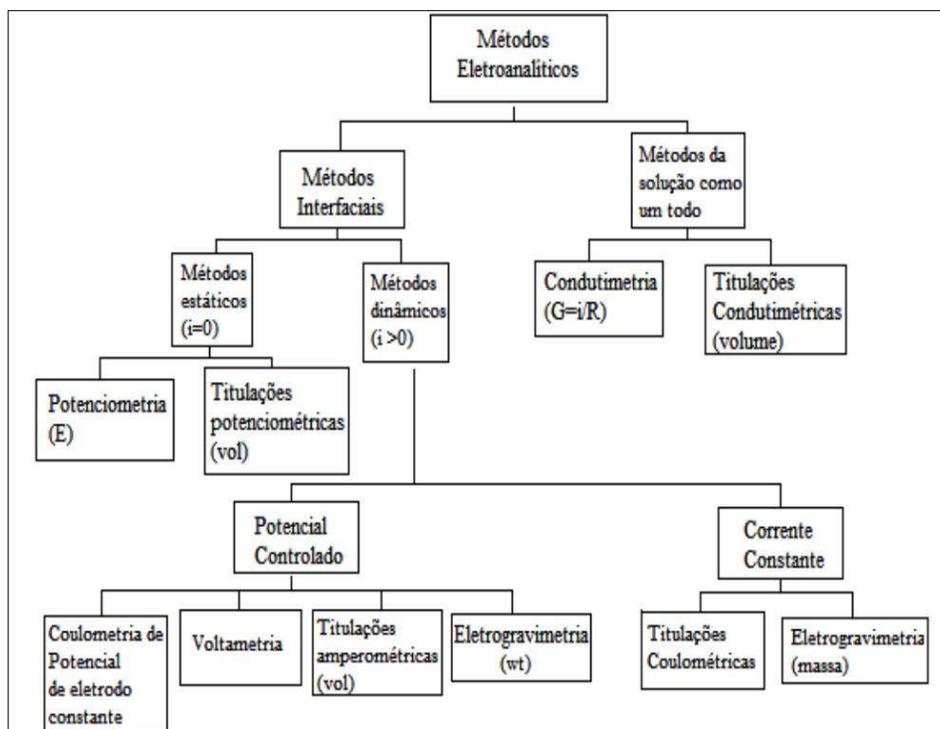
Os estudos da eletroquímica tiveram início no final do século XVIII, quando Galvani dessecava um sapo e de forma acidental percebeu que ao tocar com lâminas metálicas as terminações nervosas, os músculos do animal se contraíam. Essa observação foi uma das principais evidências e pontos de partida para descoberta do que é definido como corrente elétrica (PACHECO et al., 2013).

A eletroquímica envolve fenômenos químicos associados à separação de cargas e muitas vezes essa separação leva à transferência de elétrons, que ocorre de forma homogênea (em solução) ou heterogênea (na superfície do eletrodo). Desta forma a eletroquímica é constituída por inúmeros métodos qualitativos e quantitativos que faz valer das propriedades elétricas para mensurar o analito a partir de fenômenos onde a espécie redox interage fisicamente e/ou quimicamente com os outros compostos do meio ou até mesmo com as interfaces. As interações entre os componentes é observada quando se é empregado perturbações controladas no sistema. Podemos citar como exemplo a aplicação de uma diferença de potencial e as medidas conhecidas por sinais eletroquímicos (BRETT, 1996; SKOOG, 2005).

Existem hoje muitos métodos eletroquímicos desenvolvidos, entretanto os mais utilizados são os métodos interfaciais e os não interfaciais (Figura 5, página 31). Os métodos interfaciais são definidos como o fenômeno eletroquímico que ocorre entre a superfície do eletrodo e a superfície da solução, podendo ser classificados como dinâmico e estático. Ele é considerado dinâmico quando a célula eletroquímica é operada com aplicação de corrente, conseqüentemente, ele é considerado estático, quando a célula é operada sem aplicação de

corrente. Os métodos não interfaciais são definidos como o fenômeno eletroquímico que ocorre em solução (BRETT, 1996; SKOOG, 2005).

Figura 5 – Métodos eletroanalíticos: Sua classificação geral



FONTE: SKOOG, 2005.

A voltametria é um dos métodos que se destaca por ser dinâmico, interfacial e controlado. Ela é baseada nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente. A voltametria é classificada como dinâmica, pois a cela eletroquímica é operada na presença de corrente elétrica ($i > 0$), a qual é medida em função de um potencial aplicado controlado (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). O sistema é composto por três eletrodos, onde temos o eletrodo de trabalho, o eletrodo de referência e o eletrodo auxiliar, gerando assim maior estabilidade no sistema. Assim, as informações sobre o analito são obtidas por meio da medição da magnitude da corrente elétrica entre o eletrodo de trabalho e o auxiliar ao se aplicar uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o de

referência. Obtemos então como resposta do processo redox um voltamograma (ALEIXO, 2003; PACHECO et al., 2013).

As espécies eletroativas apresentam valores específicos de potencial de oxidação e/ou redução onde existe a transferência de carga entre a substância e a superfície do eletrodo, em condições específicas, resultando em um valor de corrente que é proporcional à concentração do composto estudado. Desta forma, é possível determinar informações qualitativas e quantitativas da substância investigada (SKOOG, 2005).

As técnicas eletroquímicas (TE) fornecem informações importantes sobre a viabilidade de processos de transferência de elétrons *in vivo*. A literatura relata correlações entre Epc (Potencial de redução ou pico catódico) e atividade biológica, deixando em evidência os estudos eletroquímicos como ferramentas na elucidação de mecanismos de ação de inúmeros fármacos (ABREU, 2002; BRETT, 1996). A eletroquímica e suas análises apresentam-se também como uma ótima alternativa para muitas aplicações em química analítica, podemos citar o controle de qualidade de produtos farmacêuticos, controle de qualidade de produtos alimentícios, estudos ambientais, dentre outras (ALEIXO, 2003; PACHECO et al., 2013). As vantagens das análises eletroquímicas são expressas na alta sensibilidade, baixo custo instrumental e operacional (PACHECO et al., 2013).

As tantas facilidades como baixo custo, sensibilidade e versatilidade faz com que os métodos eletroanalíticos atraiam contribuições de outras áreas como por exemplo a química farmacêutica. Essa parceria resulta em estudos que simulam processos farmacológicos, bioquímicos ou toxicológicos, elucidando os fenômenos de oxirredução que estão relacionados com os principais mecanismos de metabolismo celular no meio biológico (PACHECO et al., 2013; SKOOG, 2005).

2.4.1 Voltametria cíclica

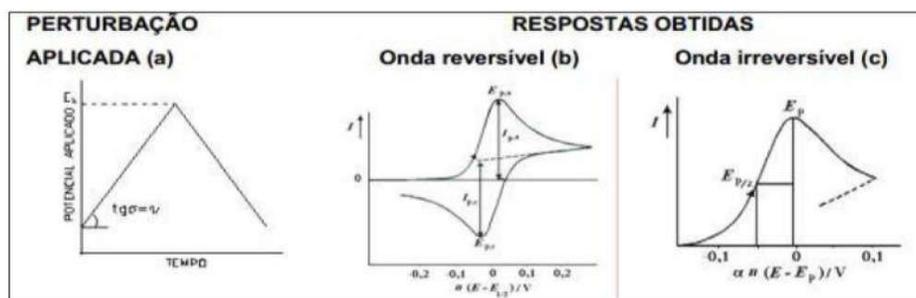
A voltametria Cíclica (VC) é uma técnica eletroanalítica importante e a mais utilizada para a aquisição qualitativa de informações sobre reações eletroquímicas. Em muitos casos a VC constitui o primeiro experimento realizado em um estudo, proporcionando identificação rápida dos potenciais redox das espécies em análise (PACHECO et al., 2013; WANG, 2006a). Em particular, ela oferece uma localização rápida de potenciais redox de espécies eletroativas

e avaliação do efeito do meio sobre o processo redox, cinética das reações de reações heterogêneas de oxirredução, termodinâmica do processo, sobre reações químicas acopladas a processos adsortivos e auxiliar na elucidação do mecanismo de substância analisada (PACHECO et al., 2013).

A VC é caracterizada por promover uma varredura reversa de potencial, deste modo o potencial que é aplicado ao eletrodo é submetido à variação em uma velocidade determinada e constante pelo operador. A varredura do sistema vai de um potencial inicial até um potencial final, e quando esse potencial final é alcançado a varredura é convertida ao potencial inicial. Após esse processo é gerado uma resposta, na qual chama-se de voltamograma, onde se observa o processo eletródico através das informações obtidas como: os potenciais de pico catódico e anódico (E_{pc} e E_{pa}), as correntes de pico catódico e anódico (I_{pc} e I_{pa}) e os potenciais de meia onda ($E_{1/2}$) ou de pico a meia altura de onda ($E_{p/2}$), conforme figuras 6 (BRETT, 1996; SKOOG, 2005).

Os sistemas podem apresentar uma natureza reversível ou irreversível. Este comportamento é consequência das propriedades químicas do analito. O sistema é considerado reversível quando o produto da redução é todo consumido no processo de oxidação. Logo, quando o sistema apresenta uma transferência eletrônica reversível o voltamograma apresenta um par de picos catódicos e uma de picos anódicos. Se a natureza do sistema seja irreversível, o voltamograma apresentará apenas um par de picos (BRETT, 1996; PACHECO et al., 2013; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Figura 6 – Modelos de respostas do potencial ao eletrodo (a) sistema reversível (b) e sistema irreversível (c).



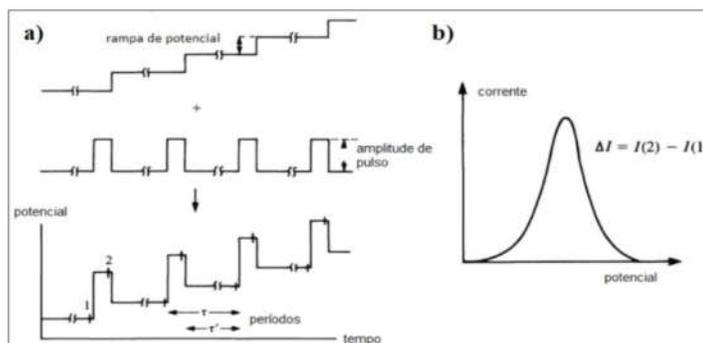
FONTE: GREEF; PEAT; GROUP., 1985.

2.4.2 Voltametria de pulso diferencial (VPD)

A voltametria de pulso diferencial tem como princípio aplicar no eletrodo de trabalho pulsos de amplitude fixos superpostos em uma rampa de potencial crescente. Nesse processo a corrente é medida duas vezes, uma antes de se aplicar o pulso e outra no final do mesmo (Figura 7a, página 34). A subtração (instrumental) da primeira corrente com a segunda gera uma diferença que é plotada versus o potencial que foi aplicado (PACHECO et al., 2013; VALENTE, 2010; WANG, 2006a). O resultado, como é ilustrado na figura 7b, é um voltamograma que consiste de picos de corrente em curva de Gauss (curva de sino), onde a área é proporcional a concentração da espécie eletroativa (ALEIXO, 2003; PACHECO et al., 2013).

Uma das vantagens do VPD é sua sensibilidade a qual permite obter limites de detecção da ordem 10^{-8} mol L⁻¹. Isso é possível graças a correção da corrente capacitiva ou não-faradáica. Quando se aplica o pulso, ocorre um aumento da corrente capacitiva e da corrente faradáica, logo a corrente faradáica diminui de forma linear, porém a corrente capacitiva diminui exponencialmente, deste modo após um tempo apropriado para se fazer a segunda leitura, faz-se uma medida da corrente total onde a corrente capacitiva é desconsiderada (ALEIXO, 2003). Outra vantagem é a possibilidade de determinar níveis de espécies orgânicas e inorgânicas, pois os picos de potencial (E_p) aparecem próximos ao potencial de meia-onda da correspondente análise polarográfica (PACHECO et al., 2013; WANG, 2006b).

Figura 7 – Representação esquemática de aplicação de potencial em voltametria de pulso diferencial. a) Plotagem da rampa de potencial e aplicação do pulso. A corrente é mostrada em 1 e 2; b) Voltamograma com pico de corrente gaussiana.



FONTE: ALEIXO, 2003.

2.4.3 Biossensor de DNA

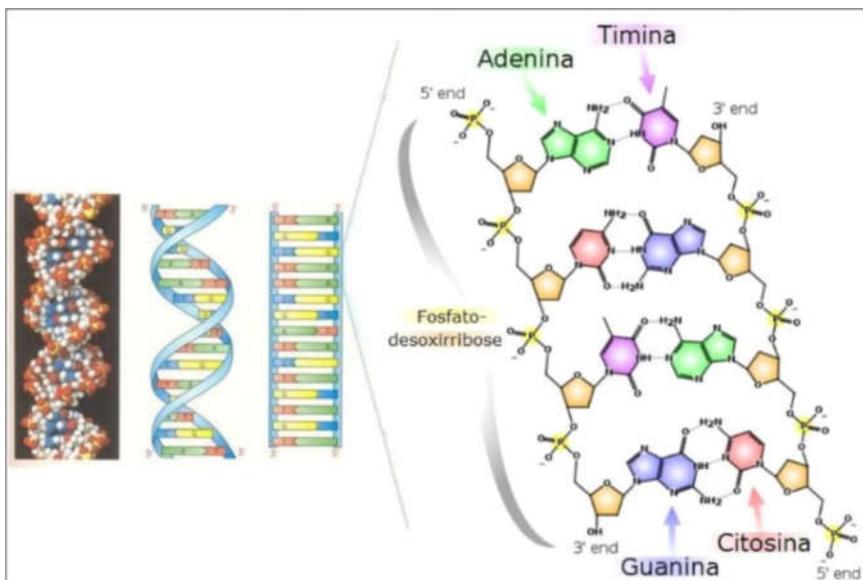
O ácido desoxirribonucleico (DNA) tem papel essencial na determinação das características hereditárias, pois guarda informações genéticas indispensáveis para a replicação dos seres vivos. Devido a sua importância, o DNA tem sido estudado quimicamente e fisicamente. Muitos compostos interagem com o DNA, desencadeando mudanças na estrutura do mesmo e nas suas bases. Essas interações levam a alterações na replicação do DNA levando ao aparecimento do câncer por exemplo. Nesse cenário, é de suma importância a elucidação dos fatores que explicam essa afinidade/seletividade que os compostos tem com o DNA (DICULESCU; PAQUIM; BRETT, 2005).

Um biossensor é uma ferramenta de análise que mescla a especificidade de um elemento de detecção biológica com um transdutor que produz um sinal elétrico/óptico proporcional à concentração da amostra ou analito. Na eletroquímica os biossensores agregam a capacidade analítica dos métodos eletroquímicos com a especificidade do processo de reconhecimento biológico, sendo classificados em amperométricos, condutimétricos e potenciométricos (DICULESCU; PAQUIM; BRETT, 2005; WANG, 2006a).

Um biossensor eletroquímico de DNA é um receptor/transdutor que tem como preparo fixar na superfície de um transdutor eletroquímico, de forma imóvel, o DNA de fita dupla (dsDNA) para ter a função de reconhecimento molecular através de processos específicos de ligação de DNA (ABREU; PAULA; FERREIRA, 2008).

A informação genética celular é codificada pelas bases nitrogenadas purinas, adenina (A) e guanina (G) juntamente com as bases de pirimidina, citosina (C) e timina (T). Os filamentos de nucleotídeos são torcidos em uma dupla hélice e são ligados por ligações de hidrogênio (Figura 8, página 36) entre as bases de cada filamento (A-T; G-C). A oxidação do DNA em um eletrodo de carbono vítreo através da técnica de voltametria de pulso diferencial mostra dois picos de correntes oriundos da oxidação de porções de guanina e adenina (Figura 9, página 37).

Figura 8 – DNA em fila dupla com representação detalhada do interior hidrofóbico do DNA, destacando as fitas formadas pelos nucleotídeos interligados e suas respectivas bases.

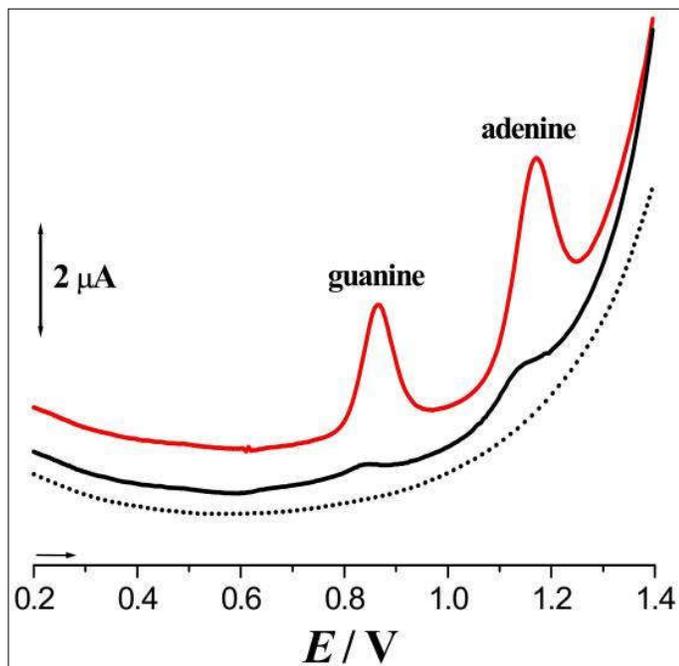


FONTE: COSTA, 2011.

O comportamento eletroquímico que se obtém com o DNA de cadeia dupla (dsDNA) e o DNA de cadeia simples (ssDNA), indica que existe uma maior dificuldade para ocorrer reações de transferências de elétrons no interior da fita dupla de DNA na superfície do eletrodo, do que com o DNA de fita simples, que por sua vez, as bases estão expostas e próximas ao eletrodo facilitando assim a transferência de elétrons (DICULESCU; PAQUIM; BRETT, 2005; OLIVEIRA-BRETT et al., 2002).

A interação de um composto químico, que pode ser um fármaco, pro-fármaco ou um metabólito secundário, com o dsDNA pode quebrar as ligações de hidrogênio e abrir a dupla hélice, expondo assim as bases constituintes do DNA as quais podem sofrer reações de oxidação (ABREU; PAULA; FERREIRA, 2008). Esse dano pode ser monitorado por meio de análises voltamétricas e podem ser úteis para fornecer informações sobre os mecanismos de interação entre drogas e o DNA, como intercalação, ligação em fendas maiores ou menores, alquilação, etc. (PINDUR; JANSEN; LEMSTER, 2005).

Figura 9 – Voltamograma de pulso diferencial (VPD) obtido com eletrodo de carbono vítreo em solução tampão de acetato pH 4,5 a 0,1M com 60 µg/mL de: ssDNA (—) 1ª voltamograma e dsDNA (---) 1ª voltamograma e (—) 40ª voltamograma.



FONTE: DICULESCU; PAQUIM; BRETT, 2005.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito toxicológico agudo das Guanilhidrazonas (série LQM e LQM.1) sobre o *D. rerio* e investigar a bioeletroquímica desses compostos e correlacionar com a toxicidade;

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos de mortalidade na administração aguda das Guanilhidrazonas utilizando testes de toxicidade (96 horas) em embriões de *D. rerio* (FET);
- Verificar os efeitos teratogênicos da administração aguda das Guanilhidrazonas utilizando testes de toxicidade (96 horas) em embriões de peixe (FET);
- Investigar o comportamento eletroquímico das Guanilhidrazonas através da técnica de voltametria cíclica;
- Investigar a interação dos compostos LQM 09 e LQM 19 com o ssDNA e dsDNA e suas respectivas bases por voltametria de pulso diferencial;
- Relacionar o potencial redox das Guanilhidrazonas com seus efeitos tóxicos nos embriões do zebrafish.

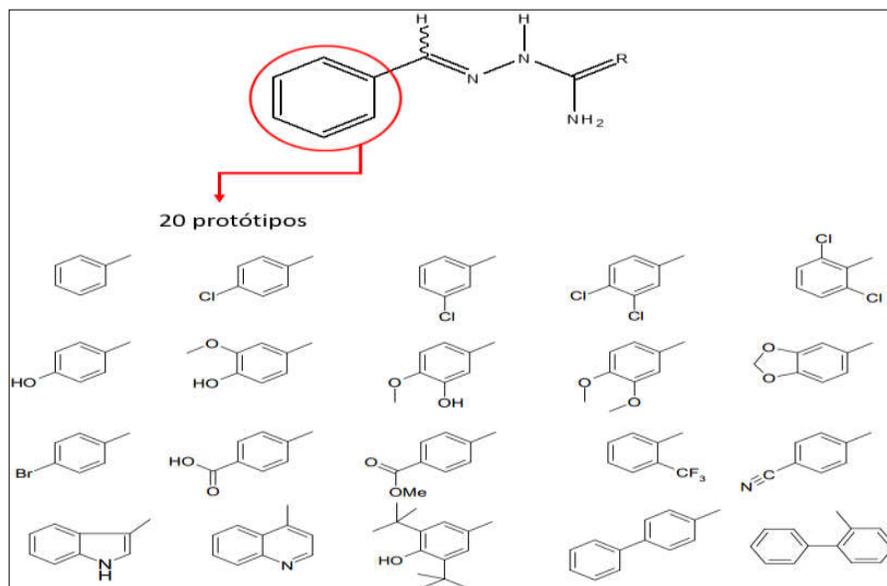
4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras

As amostras das guanilhidrazonas (LQM e LQM.1) utilizadas nesse estudo foram doadas pelo Prof. Doutor João Xavier de Araújo Júnior da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), previamente sintetizadas e caracterizadas por RMN ^1H , RMN ^{13}C e IV. A síntese e caracterização das LQM's foi descrita por Epifanio (2011), já a série de LQM's.1 estão sob proteção e não terão sua estrutura divulgadas, pois as mesmas estão em processo de patente. Na figura 10 podemos observar as estruturas químicas dos 20 compostos da primeira série (LQM).

As 40 amostras utilizadas nesse estudo são AMG denominadas LQMs, enumeradas de 1 a 20 e 1.1 a 20.1. Estes compostos foram racionalmente planejados através de técnicas de bioisosterismo, que consiste em substituir grupamentos ou átomos estruturais de moléculas com atividade biológica que apresentem volumes moleculares, distribuição eletrônica e propriedades físico-químicas semelhantes e são capazes de desempenhar propriedades bioativas (ELIEZER; FRAGA, 2008). Esse planejamento teve como objetivo obter novos candidatos a fármacos com ação antineoplásica mais eficazes e com menor toxicidade (EPIFANIO, 2011).

Figura 10 – Estrutura geral das 20 guanilhidrazonas avaliadas



FONTE: ADAPTADO EPIFANIO, 2011.

4.2 Fet Test

A metodologia da pesquisa foi realizada de acordo com a orientação do protocolo 236 da Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento em zebrafish (OCED).

O princípio do teste se baseia em expor ovos de zebrafish recém fertilizados ao produto teste por um período de 96 horas. A cada 24 horas quatro indicadores de letalidade são registrados:

1. Coagulação de óvulos fertilizados;
2. Falta da formação de somite;
3. Ausência de desprendimento do rabo-cauda do saco vitelino;
4. Falta de batimentos cardíacos.

No final do da exposição, a toxicidade aguda é determinada com base em uma das quatro observações apicais registradas, e posteriormente é calculada a CL50.

Para que os resultados dos testes sejam válidos, seguimos os seguintes critérios:

- A taxa de fertilização total de todos os ovos colhidos foi maior ou igual a 70% no lote testado;
- A temperatura da água foi mantida a 28°C com variação de 1°C para mais ou para menos;
- A sobrevivência total dos embriões no controle negativo foi maior ou igual a 90% até o final das 96 horas de exposição;
- A exposição ao controle positivo resultou em uma mortalidade mínima de 30% no final das 96 horas de exposição;
- A taxa de eclosão no controle negativo foi maior ou igual a 80%;

- Após as 96 horas de exposição, a concentração de oxigênio dissolvido no controle negativo foi maior ou igual a 80% de saturação. Foi utilizado o Unikit oxigênio dissolvido da alfakit® para realização deste controle.

4.2.1 Aspectos éticos

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alagoas, sob o número de protocolo de 33/2017. E os experimentos foram realizados no laboratório de Toxicologia, da Universidade Federal de Alagoas – UFAL e no Laboratório do Centro de Toxinas, Resposta-imune e Sinalização Celular (CeTICS) do Instituto Butantan-SP.

4.2.2 Animais

Para a obtenção dos embriões foram utilizados peixes-zebra adultos do tipo selvagem, originários das instalações do laboratório (figura 11, página 42). Os peixes são mantidos em aquários de vidro em condições ideais para seu crescimento e manutenção, na temperatura de 28°C, valores de pH entre 7 e 8 e oxigênio 6.5 ± 0.4 mg/L. Esses parâmetros foram medidos por kits de análise de água. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial (Alcon Brasil, AlconPet) pelas manhãs e náuplios de artêmia pelas tardes. A iluminação foi controlada no período claro-escuro de 14/10, onde as luzes acendiam as 8 horas e apagavam as 22 horas. A limpeza e remoção de sujidades e fezes foram realizadas diariamente, com renovação da água.

4.2.3 Reprodução

A reprodução é realizada em tanques separados do sistema. Desta forma, é utilizado um tanque especial para reprodução, o qual possui um fundo gradeado, que se encaixa em um aquário maior preenchido com água. Quando ocorre a reprodução, os ovos fertilizados passam pelo fundo gradeado, sendo depositado os embriões no fundo do recipiente inferior e protegidos do canibalismo. Os peixes são selecionados de forma aleatória dos aquários de manutenção

exclusivo de machos e fêmeas. A reprodução foi feita na proporção de 2:1, ou seja, dois machos para uma fêmea. Os machos são mais esguios e de coloração mais escura e as fêmeas de abdômen mais inchado devido ao números de ovos produzidos.

Figura 11 – Peixes-zebra criados no laboratório.



FONTE: O AUTOR.

A preparação para o acasalamento é uma das etapas primordiais para o êxito da reprodução. Doze horas antes do acasalamento dois machos e uma fêmea são colocados no tanque especial dividindo os machos da fêmea, desta forma a fêmea libera feromônios para atrair os machos para a reprodução. A divisória é retirada e assim os peixes darão início ao ritual. O acasalamento, desova e fertilização ocorrem dentro de 30 minutos após o início da luz da manhã. Após o processo, o recipiente de fundo gradeado é retirado, junto com os peixes adultos. Os ovos são coletados o mais cedo possível após a fertilização, e a exposição iniciada

imediatamente, não podendo ultrapassar mais de 3 horas pós fertilização (hpf) como recomendado pelo protocolo de número 236 da OECD.

4.2.4 Seleção de ovos

Os embriões foram colocados em um Becker de vidro e lavados com um auxílio de uma peneira e colocados em uma placa de petri. Foram então classificados individualmente através de um microscópio binocular, com ampliação mínima de 25x. Os ovos fecundados, também chamados de viáveis, são caracterizados por um espaço perivitelino totalmente transparente rodeado da membrana do ovo. Os embriões não fecundados, não saudáveis ou mortos são identificados pela falta de blastômeros e turbidez (Figura 12, página 43).

Figura 12 – Embrião fecundado (A) e embrião coagulado (B)

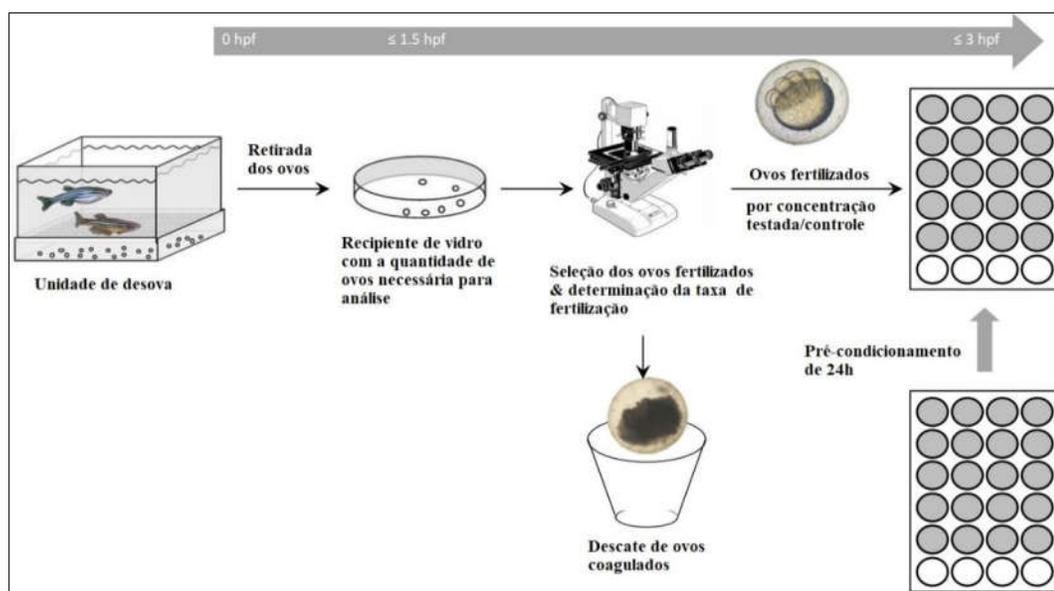


FONTE: OECD, 2013.

Foram utilizados apenas embriões fecundados até 3 hpf e os ovos que apresentavam anomalias evidente (assimétricos, que apresentavam formação de vesículas ou membranas danificadas) e coagulados foram descartados. Após a análise e seleção no microscópio os ovos

são dispostos nas placas de 24 poços. A figura 13 descreve todo o procedimento, iniciando com o acasalamento até a disposição dos embriões nas placas de 24 e posterior exposição.

Figura 13 – Esquema dos métodos empregados para ensaio de toxicidade aguda em embriões de zebrafish: produção de ovos, extração, seleção e distribuição dos embriões fertilizados em placa de 24 poços preparadas com as determinadas concentrações.



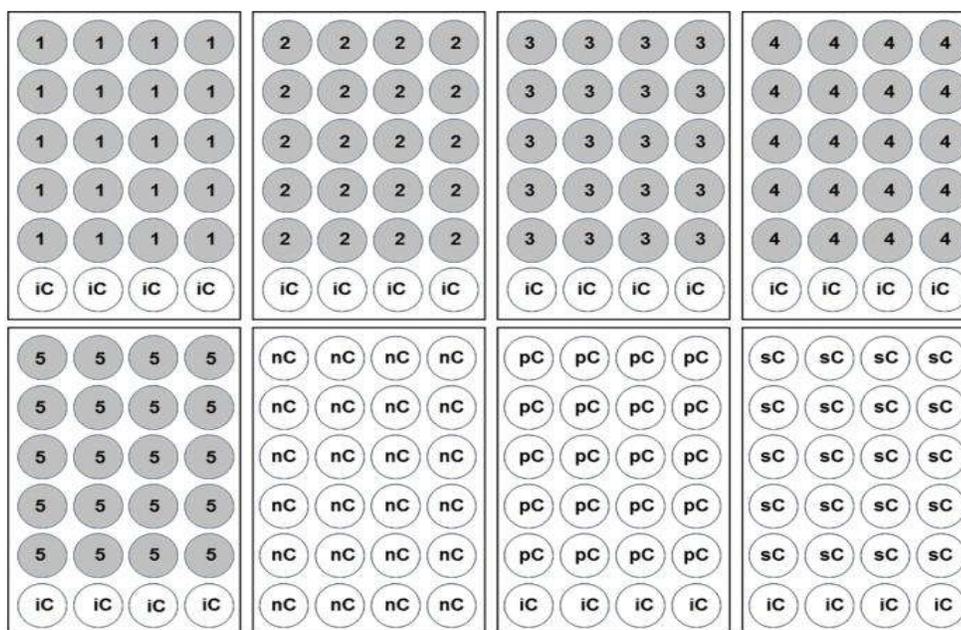
FONTE: ADAPTADO OECD, 2013.

4.2.5 Preparo das placas

O procedimento se deu quando cinco embriões por concentração (por poço) foram expostos aos vinte derivados aminoguanidínicos da série LQM em duas concentrações, 20 e 50 μM e aos 20 derivados da série LQM.1 na concentração de 20 μM (figura 14, página 45). Os ensaios foram conduzidos em placas de 24 poços (Costar® 24Well Cell Culture Cluster, Corning Incorporated, NY, EUA) com cinco embriões (estágio de 4 a 32 células) por tratamento/ concentração a 28 °C. Os embriões foram expostos a diferentes concentrações (com base em doses eficazes de tratamento in vivo) e o experimento foi realizado em quadruplicado. Após o tratamento, os embriões e larvas foram monitorados com um microscópio estéreo de

fluorescência Leica M205C e observados a cada 24 horas (24, 48, 72 e 96 horas pós-fertilização) e cada embrião individual é classificado para mortalidade (coagulação do embrião) e morfológico, má formações (edema do saco vitelino, eixo do corpo dobrado, olho, focinho, mandíbula, edema pericárdico do otólito, cérebro, somito, nadadeira caudal, nadadeira peitoral, circulação, pigmentação, comprimento do tronco e bexiga natatória).

Figura 14 – Disposição das placas de 24 poços. 1-5 concentrações testes, nC controle negativo, iC controle interno da placa (água diluída), pC controle positivo e sC controle do solvente.



FONTE: OECD, 2013.

Os ovos foram distribuídos nas placas da seguinte maneira (figura 14):

- 20 ovos numa mesma placa para cada concentração de ensaio;
- 20 ovos como controle positivo;
- 4 ovos em água de diluição como controle interno da placa em cada uma das placas acima;
- 24 ovos em água de diluição como controle negativo.

4.2.6 Manutenção dos embriões e larvas

Após a disposição dos embriões nas placas, elas foram mantidas em estufa na temperatura de 28°C e retiradas a cada 24h para análise no microscópio. As placas foram tampadas para evitar evaporação excessiva de água e substância.

4.2.7 Avaliação dos embriões e larvas

Os embriões foram avaliados periodicamente durante os 5 primeiros dias de desenvolvimento em 24, 48, 72, 96, 120 horas pós fertilização (hpf). Alterações observadas: mortalidade e alterações morfológicas (má formações).

4.2.8 Mortalidade

Durante a realização do FET teste observamos os seguintes parâmetros de mortalidade:

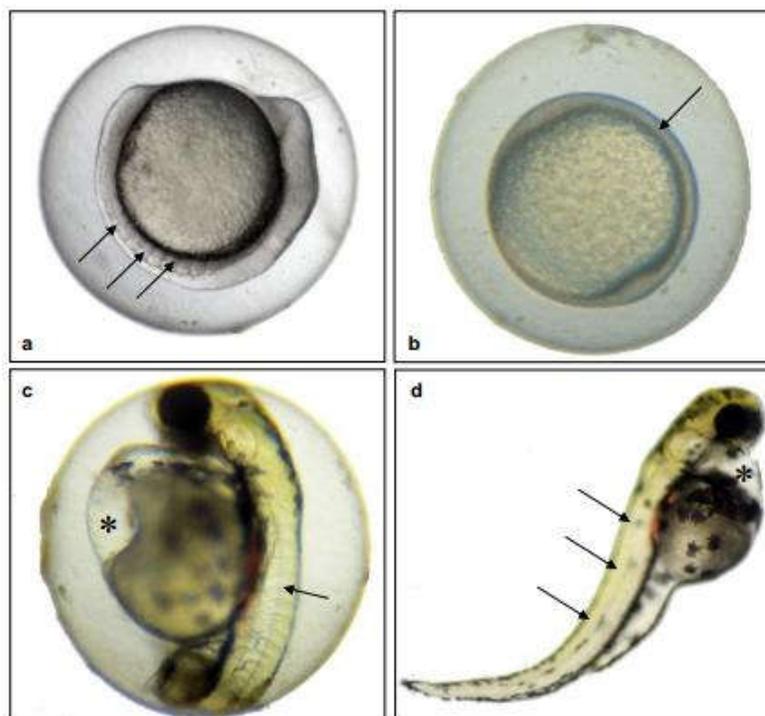
- Coagulação do embrião: os embriões coagulados são brancos, de aparência leitosa e são visíveis ao microscópio (figura 12 B, página 43). O número de embriões coagulados é determinado após 24, 48, 72 e 96 horas;

- Falta de formação da somite: formam-se cerca de 20 somites após 24 horas (figura 15, página 47) num embrião de zebrafish em crescimento normal. Quando o desenvolvimento ocorre de forma comum o embrião apresenta movimentos (contrações), ou seja, movimentos espontâneos, os quais indicam a formação de somite. Em 24 horas os somites podem sofrer retardo de formação, porém em 48h o somite deve ser formado.

- Ausência de desprendimento do rabo-cauda do saco vitelino: Em um zebrafish em desenvolvimento normal, o desprendimento da cauda ocorre após o alongamento posterior do corpo embrionário (figura 16, página 48). A ausência de desprendimento da cauda é registrada após 24, 48, 72 e 96 horas;

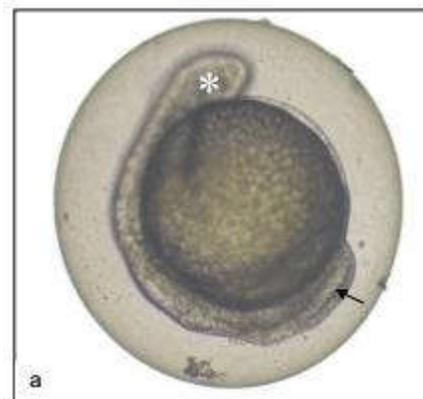
- Falta de batimentos cardíacos: No desenvolvimento normal de um embrião de zebrafish o batimento cardíaco é notório após 48 horas da fertilização (figura 17, página 48). A ausência de batimentos é registrada após 48, 72 e 96 horas após os embriões fertilizados.

Figura 15 - Falta de formação da somite: embrião de zebrafish em (a) e (c) apresentando formação de somites, e em (b) e (d) a ausência ou pequena formação de somite.



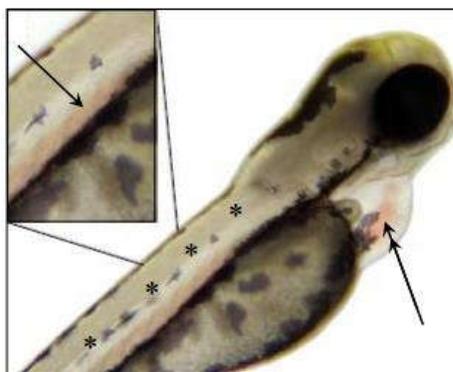
FONTE: OECD, 2013.

Figura 16 - Não desprendimento da cauda em vista lateral. *ausência do botão ocular.



FONTE: OECD, 2013

Figura 17 - Falta de batimentos cardíacos. É indicada pela não convulsão do coração (dupla seta).



FONTE: OECD, 2013.

4.3 Análises Eletroquímicas

Os estudos eletroquímicos foram realizados no Laboratório de Eletroquímica e Microsistemas de Análise (LEMAN) - UFAL sobe coordenação da Prof^a Dr^a Fabiane Caxico de Abreu Galdino.

4.3.1 Preparo das soluções

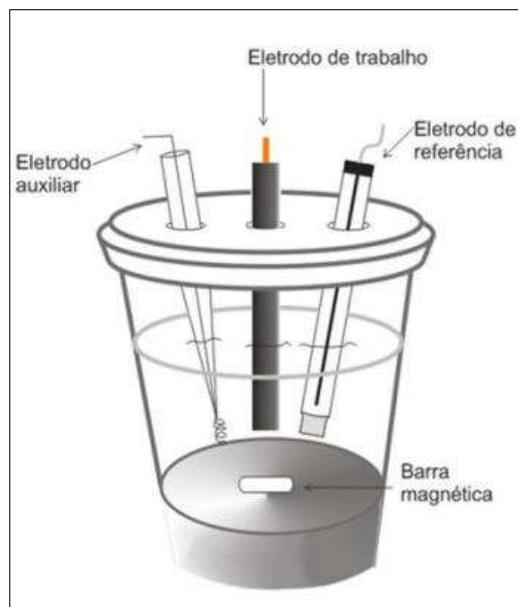
As soluções estoques dos derivados Aminoguanidínicos (LQM 1-20 e LQM 1.1-20.1) foram preparadas nas concentrações de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato, contendo 10% de álcool etílico P.A (co-solvente). As soluções contendo as amostras foram preparadas imediatamente ao iniciarmos os estudos eletroquímicos.

Os estudos eletroquímicos foram realizados em meio tamponado, utilizando com eletrólito suporte uma solução de tampão fosfato, preparada com fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) e fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) na concentração de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 e força iônica de 0,222. Os valores de pH das soluções foram determinados em pH-metro modelo Quimis Q400A.

Foi preparada a solução de ferricianeto de potássio a qual foi utilizada no pré tratamento da superfície do eletrodo de trabalho. A solução foi preparada na concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Todas as soluções foram preparadas em água ultrapura ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) de um sistema de purificação Milli-Q da Millipore Inc em condições ambientes (25°C e 1 atm).

4.3.2 Voltametria cíclica (VC)

As Voltametrias Cíclicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PGSTAT (AUT73222) da Metrohm Autolab® em um sistema constituído por três eletrodos (Figura 18, página 50). Para o eletrodo de trabalho foi utilizado um eletrodo de carbono vítreo (BAS, diâmetro 1,6 mm), como eletrodo auxiliar foi utilizado um fio de platina espiralado, por fim para o eletrodo de referência utilizou-se o sistema $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{Cl}^-$ (saturado) da BAS. As medidas foram realizadas em temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Os gráficos gerados e processados foram tratados utilizando o software Origin 8.0.

Figura 18 – Cella eletroquímica

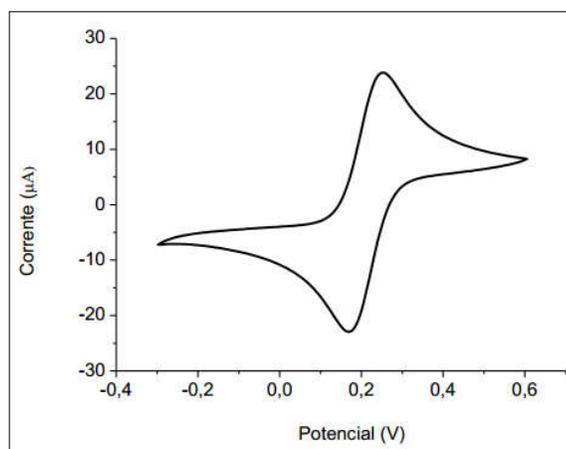
FONTE: ANDRADE, 2013.

Os estudos de voltametria foram realizados com os derivados aminoguanidínicos LQM's (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19 e 20) e LQM's.1 (1.1, 2.1, 3.1, 4.1, 5.1, 7.1, 9.1, 10.1, 11.1, 12.1, 13.1, 14.1, 16.1, 17.1, 18.1 e 20.1) na presença de co-solvente (10% de etanol PA). No sistema proposto, os derivados guanidínicos LQM foram analisados em três concentrações, as quais permaneceram constantes em $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e a série LQM.1 em apenas uma concentração ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). O eletrodo de carbono vítreo não foi modificado para as análises. Foram empregadas essas concentrações pois as substâncias possuem alta capacidade de adsorverem no eletrodo de trabalho.

As substâncias foram pesadas e adicionadas em celas eletroquímicas, em concentração constante, de 5mL. A cela eletroquímica ficou sobe agitação por um período de 60 segundos para homogeneizar as amostras antes da análise. O eletrodo era imerso na solução ao iniciar a varredura para evitar a adsorção das amostras na superfície do eletrodo. A varredura foi programada na velocidade de 50 mV s^{-1} e partiu-se de um potencial zero até 1,2V para todas as análises.

O eletrodo de carbono vítreo (BAS) foi submetido antes de cada análise a um procedimento de limpeza, ou seja, um pré-tratamento da sua superfície eletroativa. Esse tratamento foi realizado em duas etapas: mecânica e eletroquímica. Na etapa mecânica a superfície do eletrodo foi polida em suspensão de alumina ($0,3 \mu\text{M}$) com o auxílio de uma superfície apropriada até a observação de um aspecto espelhado na superfície plana do eletrodo. Após o polimento o eletrodo é lavado com água purificada, imerso em etanol PA e submetido ao ultrassom no tempo de 30 segundos; Esse procedimento auxilia na remoção de partículas residuais na superfície do eletrodo de carbono vítreo (BAS). A etapa eletroquímica consiste em avaliar o grau de limpeza, após procedimento mecânico, realizando uma VC. Desta forma foi realizada uma varredura do sistema analisado (solução de ferricianeto de potássio), na faixa de potencial de 0,6 a -0,3V (Figura 19, página 51).

Figura 19 – Voltamograma cíclico da superfície do carbono vítreo após limpeza.



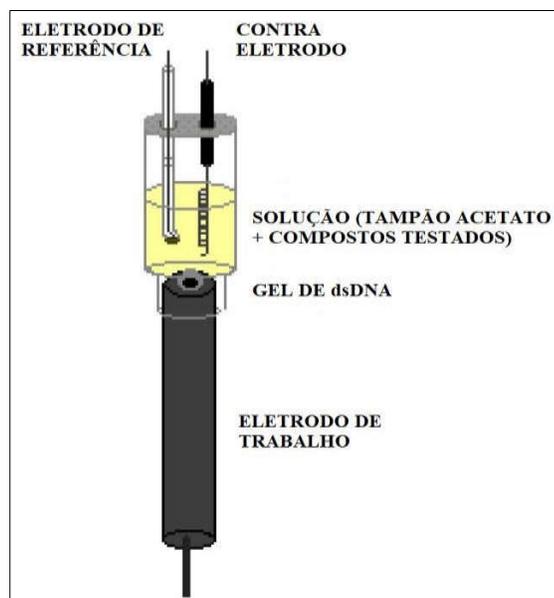
FONTE: O AUTOR.

4.3.3 Investigação da interação dos compostos com DNA por voltametria de pulso diferencial (VPD)

4.3.3.1 Preparo do gel de dsDNA e análise da interação do filme com as amostras (AMG)

O gel de dsDNA foi preparado solubilizando 12 mg de dsDNA em 2 mL de tampão acetato (pH 4,5). Em seguida a mistura foi refrigerada por no mínimo 48 horas antes de ser utilizada, para garantir a total solubilização e formação do gel de DNA. O eletrodo de carbono vítreo foi polido de forma cuidadosa, como foi descrito na secção 4.3.2, e foi adicionado 10 μL do gel na superfície do eletrodo limpo e secado com gás inerte (gás de N_2). O procedimento de aplicação do gel foi feito três vezes para otimizar a formação de um filme na superfície do eletrodo. Antes de aplicar o gel, foi realizado o condicionamento eletroquímico da superfície do eletrodo, ou seja, foram feitas cinco varreduras por VPD na faixa de potencial entre 0 a +1,5 a $0,005 \text{ V s}^{-1}$ com 120 segundos de tempo de condicionamento e sem aplicação de potencial. Esse procedimento tem como objetivo estabilizar a superfície eletródica para ativar (positivamente) permitindo que ocorra interações eletrostáticas entre o eletrodo modificado e os grupos fosfatos negativos do dsDNA.

Figura 20 – Representação esquemática do biossensor de dsDNA.



FONTE: ADAPTADO ABREU; PAULA; FERREIRA, 2008.

Após o preparo do biossensor, foi montada a cela eletroquímica conforme figura 20. As leituras em VPD foram realizadas na faixa de potencial de 0 a +1,4, a uma amplitude de pulso

de 50 mV, largura do pulso de 70 ms e taxa de varredura de $0,005 \text{ V s}^{-1}$. As leituras foram feitas para o branco (tampão acetato pH 4,5) e para as amostras LQM 09 e LQM 19 nas concentrações de $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. As amostras ficaram em contato por 15 minutos com o eletrodo modificado e após cada leitura um novo polimento era realizado no eletrodo de trabalho, novo condicionamento e nova formação do filme de dsDNA na superfície do eletrodo.

4.3.3.2 Preparo da solução de ssDNA e análise da interação da mesma com as amostras (AMG)

A solução de ssDNA foi preparada através da desnaturação do dsDNA. Foi pesado 1,5 mg de DNA de fita dupla e adicionado 1,0 mL de ácido clorídrico ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$), logo após a mistura foi aquecida a $\pm 100 \text{ }^\circ\text{C}$, por uma hora, em banho-maria até a mistura se tornar um solução. Adicionamos, para neutralização, 1,0 mL de hidróxido de sódio ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) e acrescentamos 8,0 mL de uma solução tampão acetato (pH 4,5). A solução foi refrigerada por um período de 24 horas para estabilização.

A partir daí foi feita as leituras, primeiramente o branco na faixa de potencial anódica em VPD a $0,005 \text{ V s}^{-1}$, de 0 a +1,4V. Posteriormente foram realizadas as análises de interação das guanilhidrazonas LQM 09 e LQM 19 com ssDNA nas $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. A cada adição das amostras (aliquotas) era esperado 15 minutos para ocorrer a interação da solução com DNA de fita simples.

As linhas de bases dos voltamogramas foram corrigidas para melhorar a visualização e identificação dos picos nas análises de interação com o ssDNA e dsDNA em VPD. AS correções foram realizada utilizando o software Origin 8.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da Toxicidade Aguda da série LQM em embriões de Zebrafish (FET TEST)

No teste de toxicidade (FET TEST) com embriões expostos aos derivados Aminoguanidínicos nas concentrações de 20 e 50 μ M por 96 horas, foram observados os seguintes parâmetros de mortalidade: coagulação do embrião, falta de formação da somite, ausência de desprendimento da cauda do saco vitelino e falta de batimentos cardíacos (protocolo 236 da OECD). As duas concentrações testadas apresentaram a capacidade de provocar efeitos tóxicos decorrente da exposição em embriões de *D. rerio*. Após os testes de toxicidade aguda, foi possível determinar a porcentagem da sobrevivência dos embriões e larvas após 96 horas da série de substâncias LQM's 02-20 (Tabela 1).

Tabela 1 - Porcentagem da sobrevivência de embriões e larvas de *D. rerio* pelas diferentes concentrações das Guanilhidrazonas testadas 96 horas pós-fertilização.

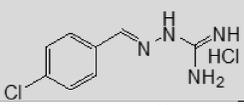
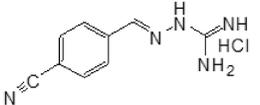
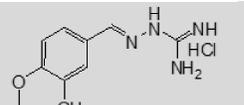
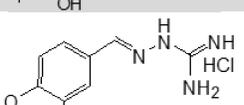
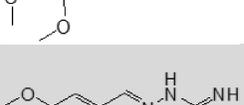
Substâncias	96 hrs							
	20 μ M				50 μ M			
	Ovo Morto	Ovo Vivo	Larva Larva	Larva Morta	Ovo Morto	Ovo Vivo	Larva Larva	Larva Morta
LQM 02 	60	0	40	-	100	-	-	-
LQM 03 	28,57	-	71,43	-	27,27	-	72,73	-
LQM 04 	28,57	-	71,43	-	42,86	-	57,14	-
LQM 05 	10	-	90	-	45,45	10,91	43,64	-
LQM 06 	28,57	-	71,43	-	20	-	80	-

Tabela 1. Continuação.

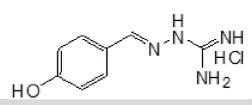
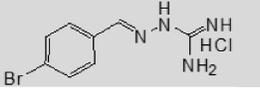
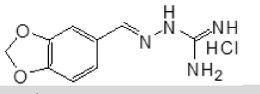
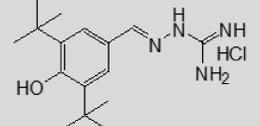
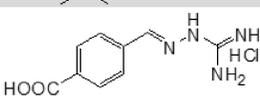
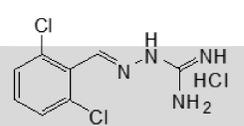
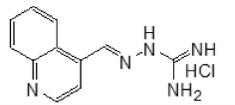
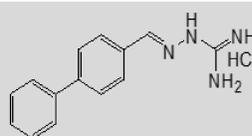
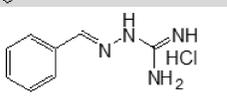
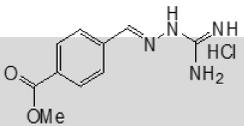
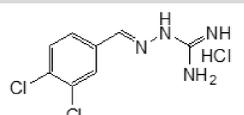
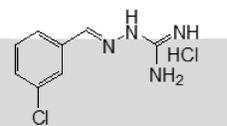
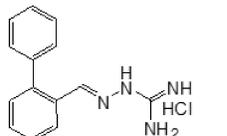
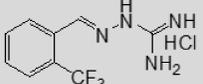
LQM 07		27,27	-	72,72	-	30,77	-	69,23	-
LQM 08		27,27	9,09	63,64	-	100	-	-	-
LQM 09		9,09	-	90,9	-	22,22	-	77,77	-
LQM 10		100	-	-	-	100	-	-	-
LQM 11		16,66	-	83,33	-	36,36	-	63,63	-
LQM 12		16,66	83,33	-	-	-	62,5	-	37,5
LQM 13		9,09	-	90,9	-	36,36	-	63,63	-
LQM 14		100	-	-	-	100	-	-	-
LQM 15		36,36	-	63,63	-	33,33	-	66,66	-
LQM 16		33,33	-	66,66	-	50	-	50	-
LQM 17		100	-	-	-	100	-	-	-
LQM 18		25	-	75	-	72,72	-	-	27,27
LQM 19		100	-	-	-	100	-	-	-

Tabela 1. Continuação.

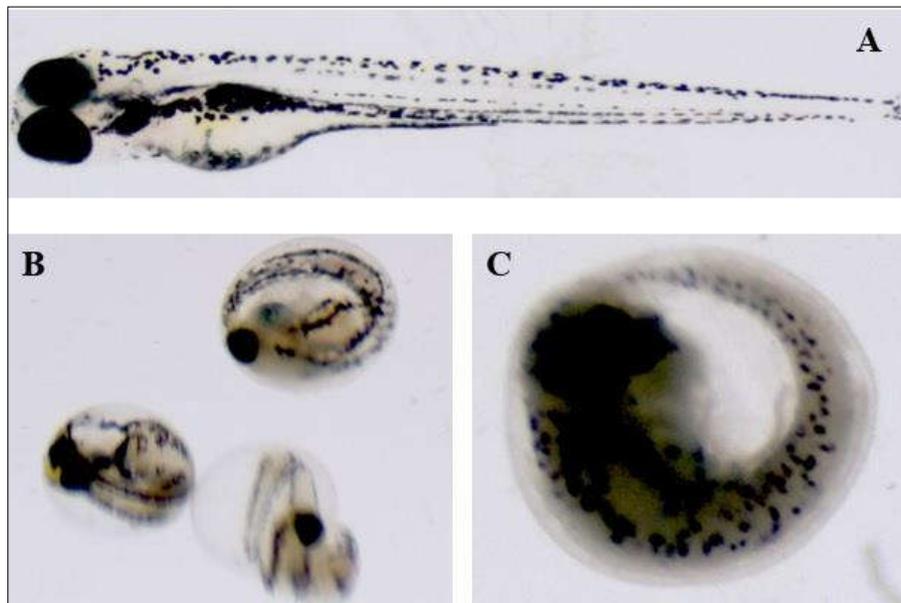
LQM 20		22,22	-	77,77	-	88,88	-	-	11,11
-----------	---	-------	---	-------	---	-------	---	---	-------

hpf: horas pós-fertilização; EM: embrião morto; EV: embrião vivo; LV: larva viva; LM: larva morta; ¹ Em porcentagem.

Conforme a tabela 1, os compostos LQM's 03, 06, 07, 09, 11 e 13 apresentaram perfil de mortalidade semelhante ao controle (segundo os parâmetros da OECD, o controle não pode apresentar mortalidade maior que 20%), próximos de 10% (Figura 22 e Figura 20). Já os compostos LQM's 04 e 05 apresentaram baixa toxicidade apenas na concentração de 20 μ M. As substâncias LQM's 09 e 11 apresentaram menor toxicidade na concentração de 20 μ M em relação aos outros compostos, registrando os valores de 90,9% e 83,33% de larvas vivas respectivamente. Por outro lado, as LQM's 10, 14, 17 e 19 se mostraram altamente tóxicas nas duas concentrações testadas, matando 100% dos embriões expostos e os compostos 2 e 8 foram letais em 100% dos embriões na concentração de 50 μ M (Figura 23, página 59). Na concentração de 50 μ M a substância LQM 09 obteve os melhores resultados, onde 77,77% dos embriões se tornaram larvas.

Os embriões se tornam larvas a partir de 48 horas pós fertilização (hpf), desta forma os embriões vivos observados após 48hpf são indicativos de que a substância promove um atraso de desenvolvimento na embriogênese do modelo animal, neste caso o zebrafish. Esse atraso pode ser também chamado de delay de desenvolvimento. Desta forma, o composto 08 promoveu um atraso de desenvolvimento em aproximadamente 9% dos embriões na concentração de 20 μ M como pode ser observado na tabela 1. Já a substância 05 gerou delay de desenvolvimento em aproximadamente 11% dos embriões (Tabela 1, página 54) na concentração maior (50 μ M). A substância LQM 12 acarretou em atraso de desenvolvimento nos embriões nas duas concentrações testadas, cerca de 83% na concentração de 20 μ M e 62% na concentração de 50 μ M (Figura 21, página 57). O composto 12 também foi capaz de matar todos as larvas que eclodiram na concentração de 50 μ M assim como os compostos 18 e 20 (Tabela 1).

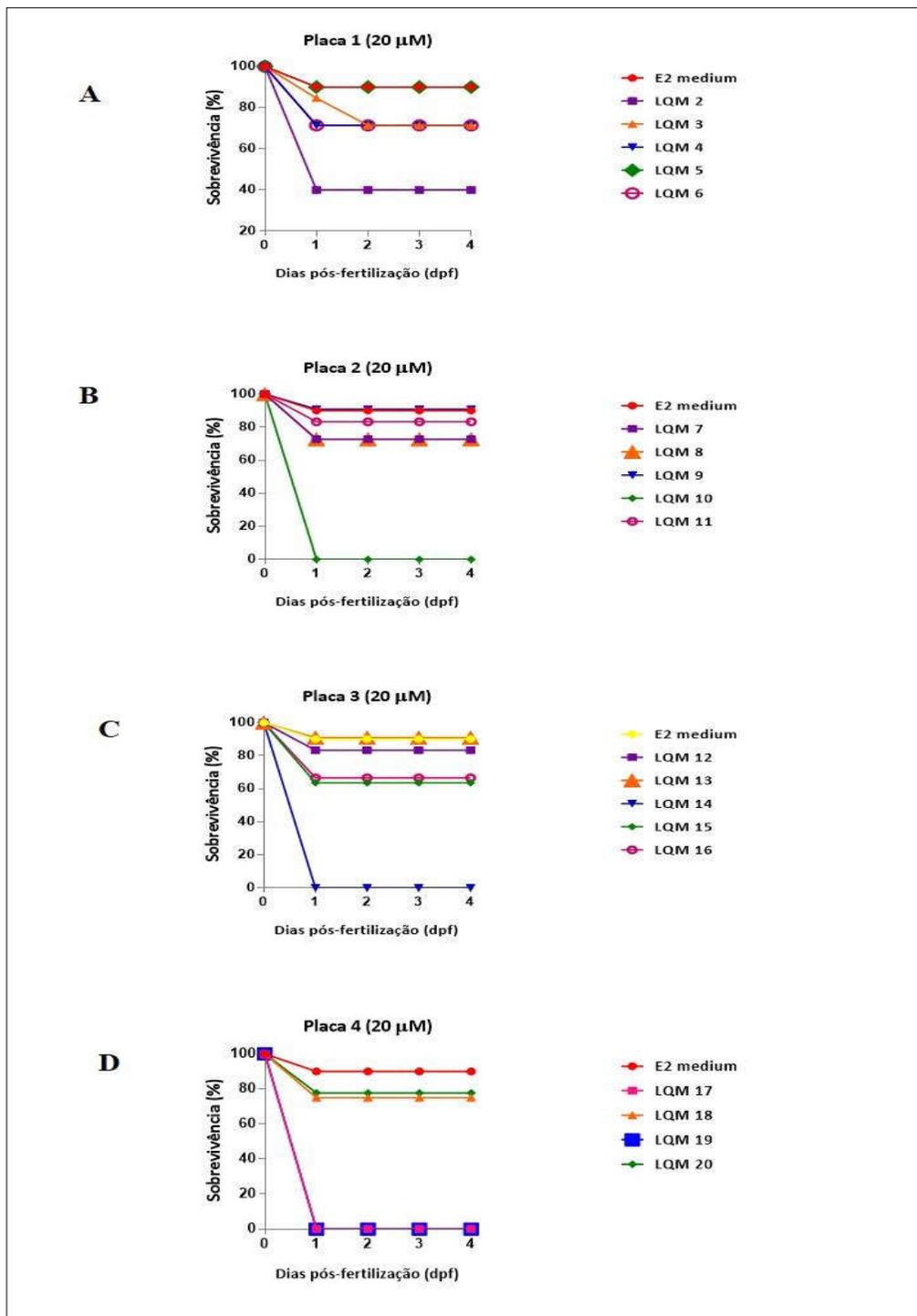
Figura 21 – Delay de desenvolvimento observado após 96 hpf para a substância LQM 12. Controle em 96 hpf (A), embrião 96 hpf na concentração de 20 μ M (B), embrião 96 hpf na concentração de 50 μ M (C).



FONTE: O AUTOR

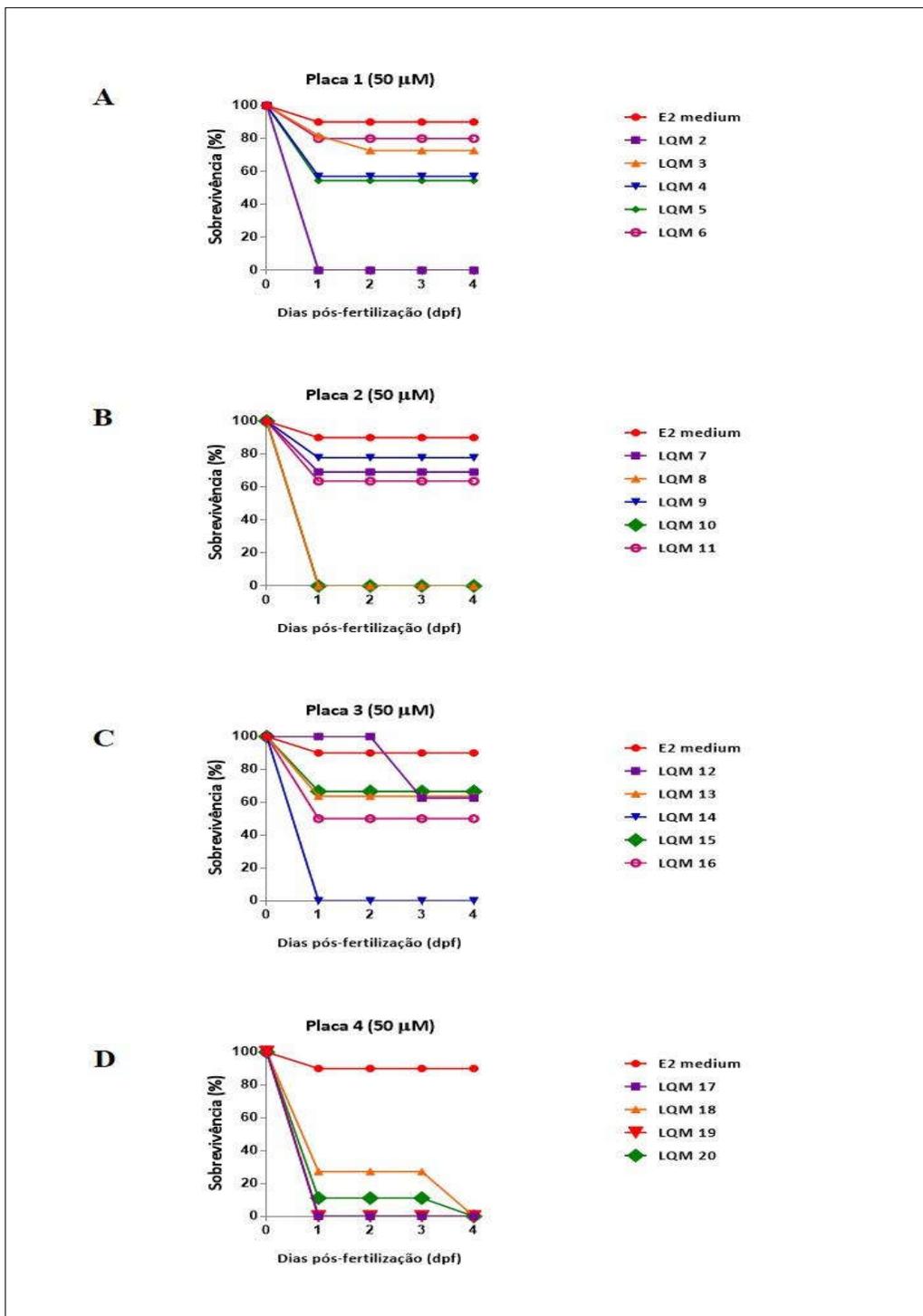
Os derivados aminoguanidínicos desencadearam efeitos teratogênicos aos embriões, também chamado de alterações morfológicas de desenvolvimento, nas duas concentrações testadas. Esses efeitos são visualizados a cada 24h de exposição, logo observa-se alterações na anatomia normal do embrião ou larva do peixe. Essas alterações podem ser de curvatura na coluna vertebral (escoliose), edemas de pericárdio e de saco vitelino, deformações oculares, ausência de bexiga natatória dentre outros. Os efeitos teratogênicos mais frequentes foi o de curvatura na coluna vertebral das larvas após a exposição dos compostos 02, 05, 08, 18 e 20 (Figuras 24 e 25). Na figura 24 C podemos observar que as larvas expostas a substância 05 além de apresentar escoliose, desenvolveram edema de saco vitelino. Já substância LQM 07 desencadeou o desenvolvimento de um edema de pericárdio nas larvas expostas (figura 24 D, página 60). Uma das larvas expostas ao derivado LQM 08 não teve a formação da bexiga natatória após 96 horas de exposição (Figura 25 B, página 61). O composto LQM 10 coagulou todos os embriões expostos como podemos verificar na figura 24 F.

Figura 22 – Sobrevivência de embriões de *D. rerio* expostos aos derivados aminoguanidínicos LQM's 2-6 (A), LQM's 7-11 (B), LQM's 12-16 (C) e LQM's 17-20 (D) na concentração de 20 μ M.



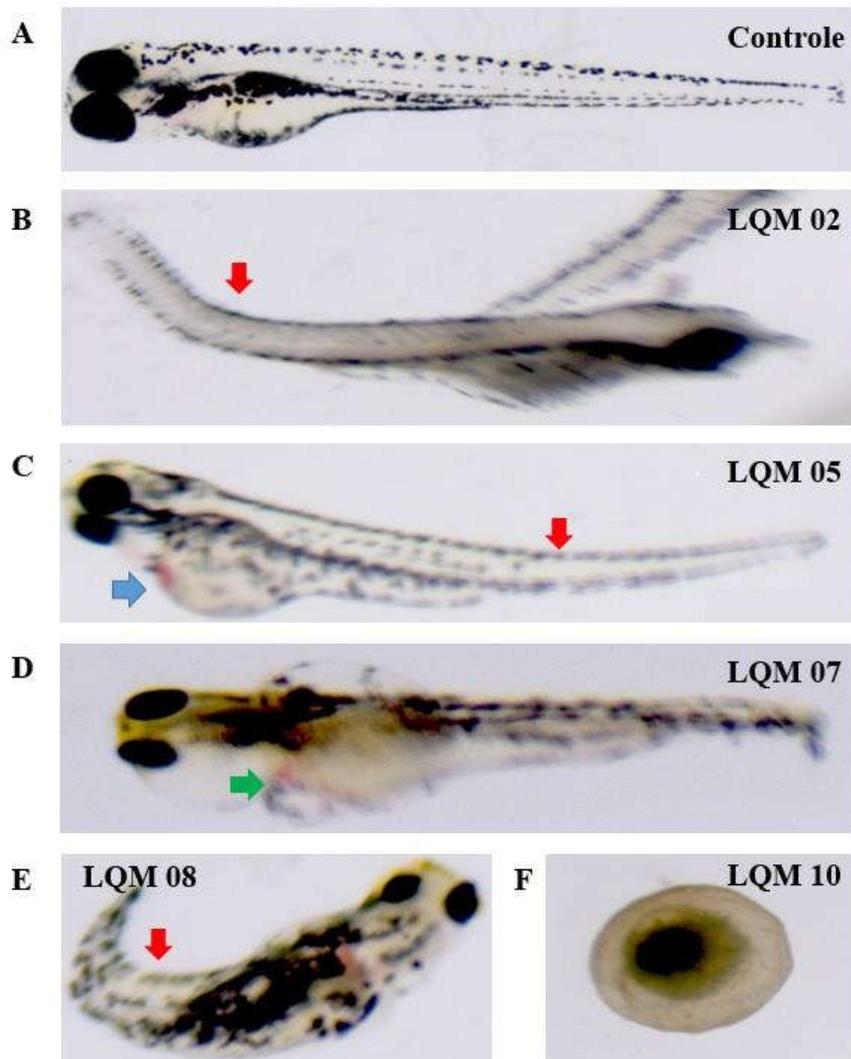
FONTE: O AUTOR

Figura 23 – Sobrevivência de embriões de *D. rerio* expostos aos derivados aminoguanidínicos LQM's 2-6 (A), LQM's 7-11 (B), LQM's 12-16 (C) e LQM's 17-20 (D) na concentração de 50 μ M.



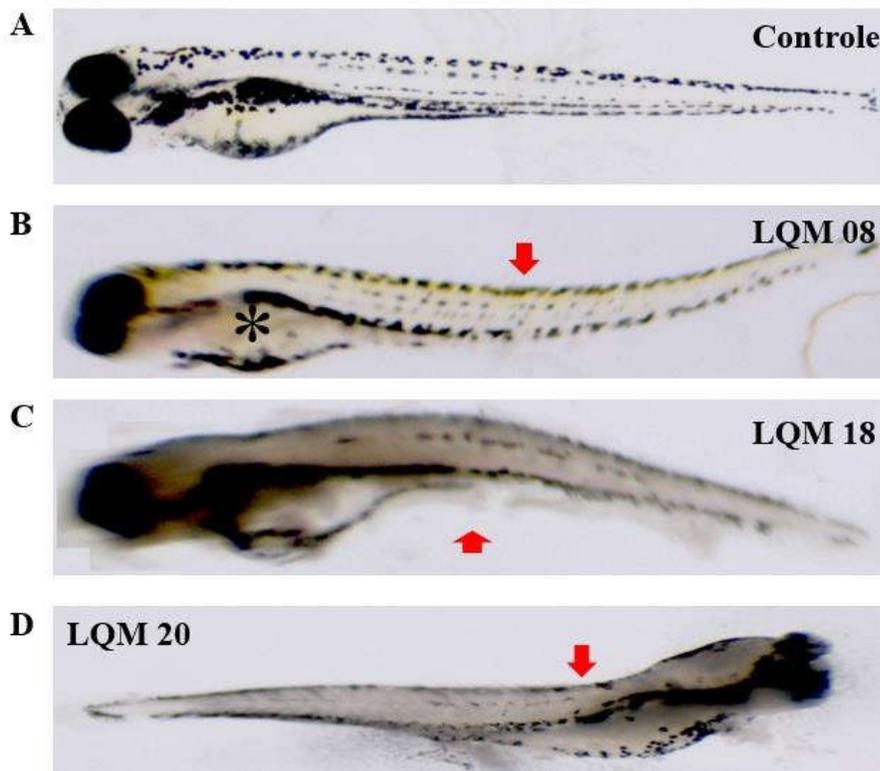
FONTE: O AUTOR

Figura 24 – Efeitos teratogênicos dos derivados aminoguanidínicos após 96 hpf de exposição em 50 μM . Controle (A), LQM 02 (B), LQM 05 (C), LQM 07 (D), LQM 08 (E). Seta vermelha: escoliose, seta azul: edema de saco vitelino, seta verde: edema de pericárdio.



FONTE: O AUTOR

Figura 25 – Efeitos teratogênicos dos derivados aminoguanidínicos após 96 hpf de exposição em 50 μ M . Controle (A), LQM 08 (B), LQM 18 (C), LQM 20. Seta vermelha: escoliose, asterisco: ausência de bexiga natatória.



FONTE: O AUTOR

A relação estrutura-atividade é frequentemente vista como primeiro passo na elucidação de mecanismos toxicológicos. Desta forma, muitos estudos relacionam a atividade biológica de um composto químico com suas propriedades físico-químicas e estruturais (CRONIN; DEARDEN, 1995).

Uma das propriedades físico-químicas citadas é o valor do coeficiente de partição ($\log P$), onde uma substância que possui maior lipofilicidade tende a desencadear maior toxicidade no embrião de *D. rerio*. A lipofilicidade é definida pela razão entre a concentração da substância na fase orgânica e sua concentração na fase aquosa em um sistema de dois compartimentos sob condições de equilíbrio. Logo, a molécula que apresenta maior coeficiente de partição tem maior afinidade pela fase orgânica e tendem a ultrapassar com maior facilidade as membranas

hidrofóbicas (AÏT-AÏSSA et al., 2000; ELIEZER; FRAGA, 2008). Sachidanandan et al. (2008) realizou estudos com embriões de *D. rerio* e sugeriu uma relação entre o valor do log P das substâncias testadas e a capacidade penetração das mesmas nos embriões. Ele descreve que quanto mais positivo o valor do log P, maior será a capacidade de absorção no embrião e conseqüentemente maior será a capacidade do composto em gerar uma alteração fenotípica nos ovos do zebrafish.

Desta forma, observamos que as guanilhidrazonas que possuem maior coeficiente de partição causam maior toxicidade nos embriões de zebrafish, uma vez que tendem a ultrapassar com maior facilidade as membranas celulares do embrião. As substâncias LQM's 10, 14, 17 e 19 possuem os maiores valores de log P (Tabela 2, página 62) em relação aos outros compostos e conseqüentemente apresentaram maior toxicidade, já que possuem maior capacidade de transpor membranas biológicas. Já os compostos que apresentaram menor toxicidade nos embriões possuem valores de coeficiente de partição mais baixos.

Tabela 2 – Valores do coeficiente de partição (Log P) das guanilhidrazonas testadas.

Composto	Log P
LQM 01	0,92
LQM 02	1,93
LQM 03	1,41
LQM 04	0,86
LQM 05	1,12
LQM 06	0,86
LQM 07	0,99
LQM 08	2,2
LQM 09	1,16
LQM 10	4,4
LQM 11	0,93
LQM 12	2,49
LQM 13	1,46
LQM 14	3,05
LQM 15	1,38
LQM 16	1,2
LQM 17	2,49
LQM 18	1,-93
LQM 19	3,05
LQM 20	2,3

Em seus estudos Epifanio (2011) avaliou a atividade farmacológica desses compostos (Guanilhidrazonas LQM's 1-20) através da avaliação citotóxica pelo método de MTT. Este estudo permitiu definir a citotoxicidade desses derivados de forma rápida e fácil. Ele avaliou o comportamento citotóxico em três linhagens de células tumorais humanas: cólon (HCT-8), melanoma (MDA-MB435) e glioblastoma (SF-295). O método empregado no estudo classifica as substâncias em relação a sua atividade, desta forma elas foram classificadas da seguinte maneira: sem atividade, pouca atividade (1-50% de inibição), atividade moderada (50-75% de inibição) e muita atividade (75-100% de inibição). Das 20 guanilhidrazonas, os compostos que apresentaram muita atividade em pelo menos uma das linhagens testadas foram os de número 2, 8, 10, 14, 17 e 19 a uma concentração de 5 µg/mL. Sendo que as LQM's 10, 14, 17 e 19 apresentaram muita atividade nas três linhagens testadas. Esses resultados comparados com a mortalidade em embriões de zebrafish no presente estudo se mostram semelhantes, uma vez que os compostos 10, 14, 17 e 19 causaram morte de 100% dos embriões nas duas concentrações testadas (20 e 50 µM). Já os compostos 2 e 8 que apresentaram atividade em apenas uma linhagem de células tumorais se mostraram altamente tóxicos a embriões de zebrafish na concentração de 50 µM. Já os compostos que apresentaram baixa ou nenhuma atividade citotóxica (03, 06, 07, 09, 11 e 13) apresentaram baixa toxicidade em embriões de *D. rerio*.

Partindo para a relação estrutura-atividade podemos destacar que o composto 10, um dos mais tóxicos, apresenta dois grupamentos alifáticos di-terc-butil fornecendo características lipossolúveis para a molécula. Os compostos 14 e 19 possuem em sua estrutura fenilas nas posições *para* e *orto* respectivamente, as quais são grupamentos volumosos e proporcionam também características lipofílicas as duas substâncias. As características lipossolúveis desses compostos aumentam a capacidade de absorção nos embriões e conseqüentemente a sua toxicidade. Em seus estudos, Epifanio (2011) indicou que as LQM's com estruturas moleculares mais lipofílicas apresentam melhor atividade citotóxica em células tumorais, porém no corrente estudo pode-se indicar que esses compostos mais lipofílicos apresentam maior teratogenicidade em embriões do peixe. Ele também sinalizou que os compostos detentores de grupamentos polares como metoxila (4, 5, 6 e 16), hidroxila e ácidos carboxílicos (4, 6, 7 e 11) e heteroátomos eletronegativos como oxigênio e nitrogênio (1, 3, 9 e 13) apresentaram baixa ou nenhuma atividade citotóxica. Corroborando assim com nosso estudo, pois quando expomos essas substâncias aos embriões de zebrafish, as mesmas apresentaram menor toxicidade, com destaque para as LQM's 03, 06, 07, 09, 11 e 13.

Alguns dos compostos testados são isômeros de posição e, em alguns casos, dependendo da posição dos átomos a atividade tóxica sofre alteração. Podemos citar os isômeros LQM 04 e 06, os quais possuem as mesmas porcentagens de sobrevivência na menor concentração testada (20 μ M), porém quando há o aumento da concentração (50 μ M) o isômero 06 apresenta menor toxicidade, uma vez que a hidroxila e éter estão nas posições *para* e *meta* do anel, respectivamente. O átomo de cloro quando é retirado da posição *para* (LQM 02) e posto na posição *meta* (LQM 18) em relação a ramificação do anel aromático, a toxicidade da molécula diminui levemente na menor concentração testada. De forma geral, os compostos que possuem halogênios em suas estruturas (LQM's 02, 08, 12, 17 e 20) apresentaram toxicidade elevada independente das mudanças de posições realizadas. As LQM's 14 e 19 que possuem fenilas substituídas no anel aromático nas posições *para* e *orto* respectivamente apresentaram 100% de letalidade independentemente da posição da fenila no anel.

As substâncias 10, 14, 17 e 19 apresentaram toxicidade em células saudáveis (linfócitos humanos) segundo estudos de Epifanio (2011). Essa informação corrobora com os resultados do presente estudo, onde esses quatro compostos apesar de apresentarem muita atividade citotóxica tumoral eles apresentam toxicidade elevada em células humanas normais e em embriões de *D. rerio* tornando-os protótipos de baixa seletividade.

5.2 Comportamento Eletroquímico da série LQM

5.2.1 Estudo eletroquímico das guanilhidrazonas em meio prótico

A voltametria cíclica é uma técnica experimental simples e precisa para obtenção quantitativa de dados cinéticos e termodinâmicos de forma que auxiliam na elucidação do mecanismo de ação do fármaco em questão ou na colaboração no processo de desenvolvimento de novos fármacos. É uma técnica usada para estudos eletroquímicos em meio prótico e aprótico de diversos compostos (LU; WANG; LIU, 2007).

Podemos avaliar os processos eletródicos que ocorrem através de parâmetros eletroquímicos relatados na literatura. Os parâmetros analisados e empregados são os potenciais de oxidação (E_{pa}) e de redução (E_{pc}), $(E_{pc} + E_{pa})/2$ quando o processo for reversível e $E_{pc} - E_{pc}/2$ quando o processo for irreversível; a corrente (i) e a razão entre as correntes de pico

catódico e anódico (I_{pa}/I_{pc}) (DE SOUZA, 2011; FONSECA; PROENÇA; CAPELO, 2015; ROCHA et al., 2012).

Os voltamogramas cíclicos para os derivados aminoguanidínicos em meio prótico foram realizados em tampão fosfato, pH 7, e devido à baixa solubilidade das substâncias, trabalhamos em concentrações menores ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), utilizando etanol a 10% como co-solvente, a fim de aumentar a solubilidade dos compostos no meio. Os voltamogramas estão representados na figura 26 e seus parâmetros eletroquímicos estão descritos na tabela 3.

As substâncias LQM's 4 e 5 apresentam um par de picos redox Ia/Ic e um pico IIa bem definidos (Figura 26 D e E, página 68), o que representam os processos de transferência de elétrons. O par redox pode estar relacionadas a oxidação dos substituintes no anel aromático (hidroxila e ésteres) e o pico IIa a oxidação de um dos nitrogênios da região amidina das substâncias. Já os compostos 9 e 11 (Figura 26 I e K, página 69) apresentaram um pico de oxidação Ia bem definido e mais um par de ombros (indicados pela seta) com baixa intensidade. Esses ombros podem ser associados a um possível par redox gerados pela carboxila (LQM 11) e aos oxigênios que fazem parte do anel de cinco membros (LQM 09).

Os compostos 1, 6, 7 e 10, mostram dois pares de picos de oxidação, os quais representam dois processos de transferência de elétrons. No qual o composto LQM 10 (figura 26 J, página 69) apresentou valores de potenciais menores $E_{pa} = +0,287 \text{ V}$ e $E_{pc} = +0,243 \text{ V}$ (Tabela 3, página 66). Já os compostos 1, 6 e 7 apresentaram dois picos de oxidação (Figura 26, página 68), um de maior intensidade (Ia) e outro de menor intensidade (Ic). As LQM's 6, 7 e 10 possuem um comportamento redox semelhante ao das quinonas. Nesse processo, uma quinona é reduzida a uma semiquinona ou hidroquinona e na presença de oxigênio elas são oxidadas para quinonas novamente, gerando assim um par redox característico quando analisado em VC (ENSAFI et al., 2016). Semelhantemente as substâncias 6, 7 e 10 sofrem oxidação e se convertem em benzoquinonas e posteriormente são reduzidas para o composto original.

As LQM's 2, 3, 8, 13, 16, 17 e 20 apresentaram um pico de oxidação bem definido (Ia) e uma onda de baixa intensidade (indicada pela seta). O pico de maior intensidade pode estar relacionado a oxidação que ocorre na região amidina da molécula. Já a onda de menor intensidade pode estar relacionada aos substituintes do anel aromático.

Os demais compostos apresentaram apenas um pico de oxidação. Isso indica que a oxidação dessas guanilhidrazonas é um processo totalmente irreversível.

Tabela 3 – Parâmetros eletroquímicos para os derivados aminoguanidínicos na maior concentração testada. Eletrodo de carbono vítreo, E Vs. Ag|AgCl|Cl-sat, $v = 50\text{mV s}^{-1}$.

Composto	EpIa (V)	EpIIa (V)	EpIc (V)	ipIa (μA)	ipIIa (μA)	ipIc (μA)
LQM 01	0,473	-	0,438	0,904	-	-0,45
LQM 02	0,933	-	-	0,275	-	-
LQM 03	0,919	-	-	0,209	-	-
LQM 04	0,238	0,575	0,175	0,101	0,279	-0,182
LQM 05	0,399	0,75	0,308	0,118	0,339	-0,177
LQM 06	0,372	-	0,329	0,159	-	-0,154
LQM 07	0,484	-	0,434	0,281	-	-0,201
LQM 08	0,944	-	-	0,466	-	-
LQM 09	0,781	-	-	0,54	-	-
LQM 10	0,287	-	0,243	0,335	-	-0,289
LQM 11	0,949	-	-	0,531	-	-
LQM 12	0,982	-	-	0,297	-	-
LQM 13	0,842	-	-	0,248	-	-
LQM 14	0,926	-	-	0,402	-	-
LQM 15	0,905	-	-	1,015	-	-
LQM 16	0,962	-	-	0,739	-	-
LQM 17	0,793	0,989	-	0,693	0,991	-
LQM 19	0,898	-	-	0,632	-	-
LQM 20	0,975	-	-	0,593	-	-

Para as guanilhidrazonas que possuem o anel aromático (fenil) em sua estrutura, os substituintes adicionados nesses anéis podem interferir nos valores dos potenciais de pico da oxidação por conta do efeito indutivo e de ressonância gerado (BRUICE, 2006; CAREY, 2011). Grupos doadores de elétrons tendem a diminuir os valores dos potenciais de oxidação, enquanto os grupos que retiram elétrons tem o efeito oposto, ou seja, tendem a aumentar os valores dos potenciais de oxidação (CAI; XIAN; WANG, 2002). Partindo deste princípio, os compostos que apresentam grupos retiradores de elétrons possuem o potencial de oxidação maior. Logo, observamos alguns substituintes que geram um maior aumento de potencial em relação a outros. A substância LQM 12 possui o maior potencial em relação aos outros derivados (0,982 V), isso é possível graças ao di-cloro (retiradores de elétrons) ligado ao anel aromático da molécula. Similarmente temos os compostos LQM's 2, 8 e 17 (Tabela 3, página 66) os quais possuem

halogênios ligados ao fenil (cloro e bromo). Os halogênios possuem uma maior eletronegatividade, aumentando o efeito indutivo da molécula e conseqüentemente o potencial de oxidação quando comparados com outros substituintes. As substâncias 3 e 11 possuem respectivamente uma nitrila e um ácido carboxílico ligados ao anel aromático, quando comparadas com os compostos halogenados estas apresentam menor potencial (0,912 V e 0,943 V). O composto LQM 10 apresentou o menor potencial de oxidação em relação as demais derivados, isso se deve aos substituintes alquil (di-terc-butil) da molécula, os quais são doadores de elétrons, resultando na diminuição do potencial de oxidação.

Figura 26 – Voltamogramas cíclicos para os compostos LQM's 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19 e 20 nas concentrações de $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (■), $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (●) e $3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (▲) em meio aquoso etanólico (10%), tampão fosfato pH 7. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (Continua)

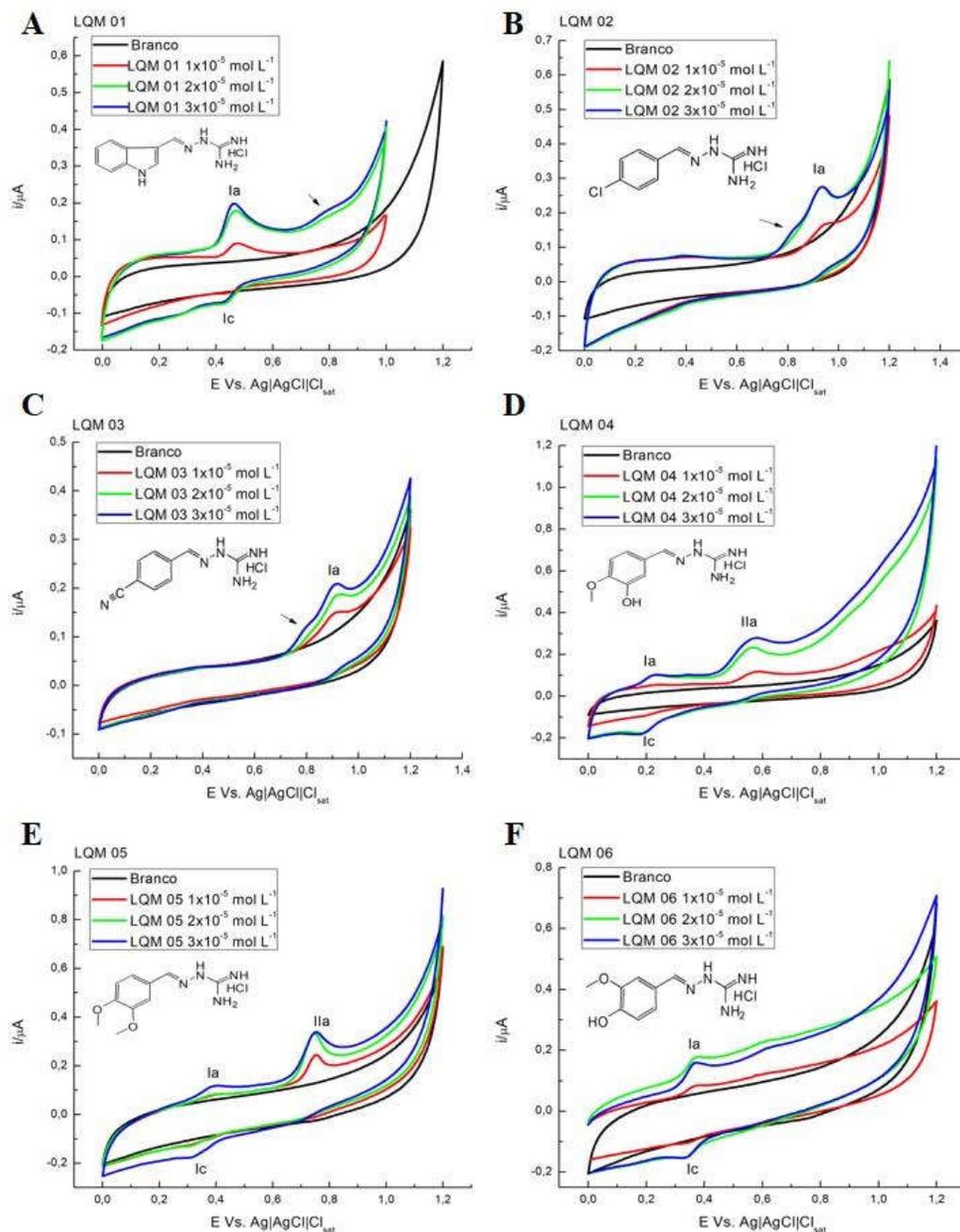


Figura 26 – Voltamogramas cíclicos para os compostos LQM's 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19 e 20 nas concentrações de $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (■), $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (●) e $3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (▲) em meio aquoso etanólico (10%), tampão fosfato pH 7. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (Continua)

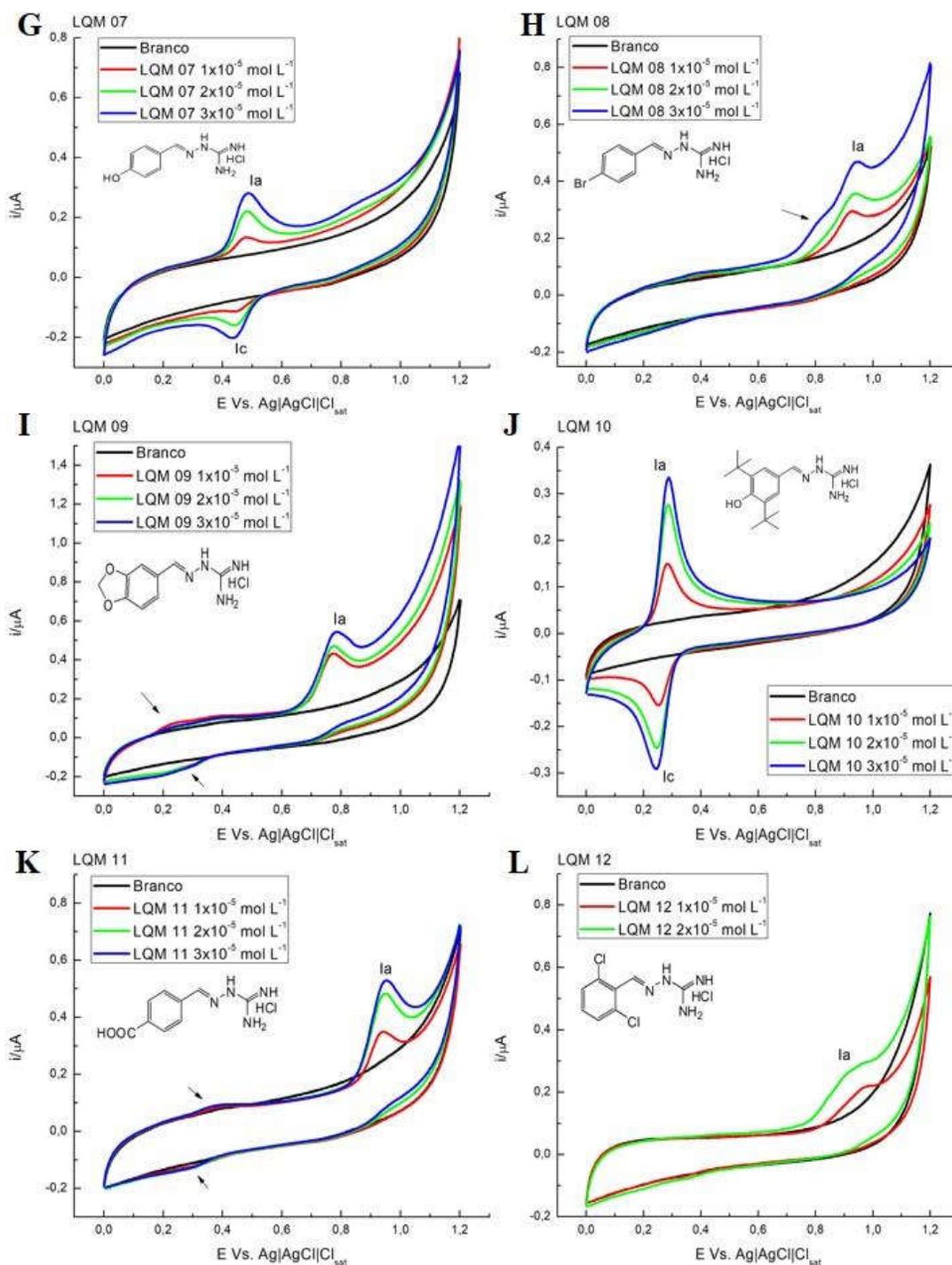


Figura 26 – Voltamogramas cíclicos para os compostos LQM's 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19 e 20 nas concentrações de $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (■), $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (●) e $3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (▲) em meio aquoso etanólico (10%), tampão fosfato pH 7. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (Continua)

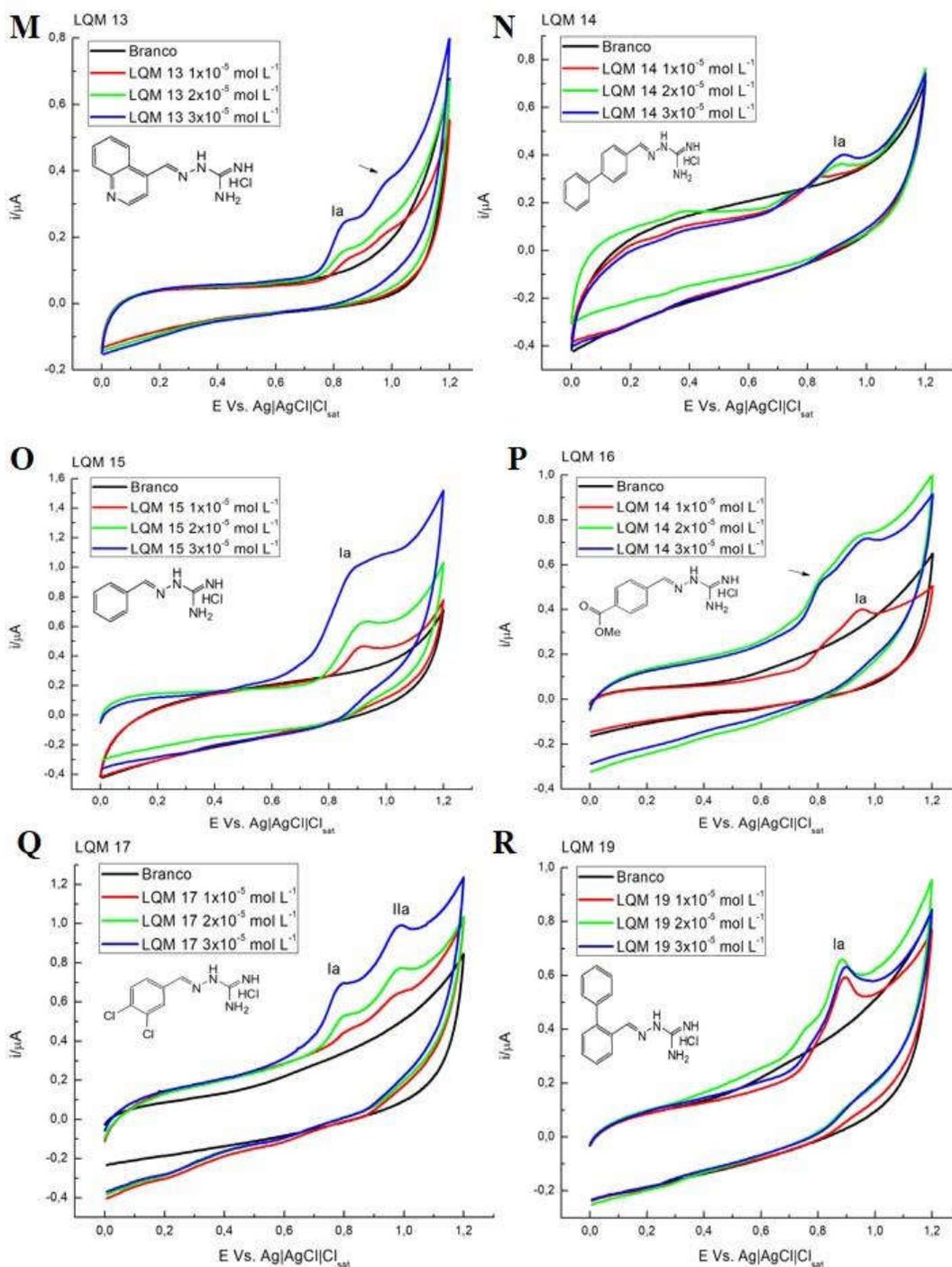
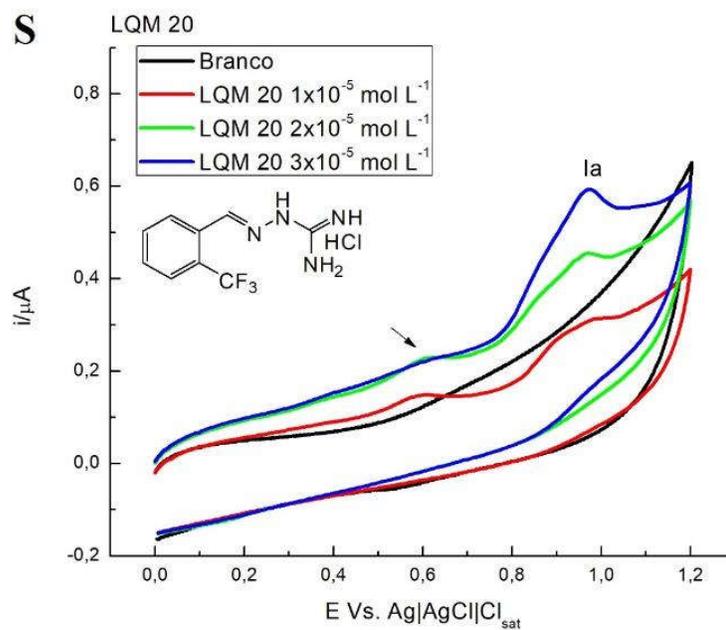


Figura 26 – Voltamogramas cíclicos para os compostos LQM's 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19 e 20 nas concentração de $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (-), $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (-) e $3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (-) em meio aquoso etanólico (10%), tampão fosfato pH 7. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (Conclusão)



FONTE: O AUTOR

Na tabela 4 relacionamos os potenciais de oxidação dos compostos testados com a toxicidade dos mesmos frente aos embriões de zebrafish. A toxicidade foi classificada por uma escala de intensidade para melhor compreensão que se divide nas seguintes abreviaturas:

- **B**: baixa toxicidade (mortalidade de 1 a 50% dos embriões de zebrafish);
- **M**: toxicidade moderada (mortalidade de 50 a 75% dos embriões de zebrafish);
- **A**: alta toxicidade (mortalidade de 75 a 100% dos embriões de zebrafish).

Tabela 4 – Relação entre os potenciais redox e toxicidade das guanilhidrazonas testadas.

Composto	E_{pIa} (V)	E_{pIIa} (V)	E_{pIc} (V)	20 μ M	50 μ M
LQM 02	0,933	-	-	M	A
LQM 03	0,919	-	-	B	B
LQM 04	0,238	0,575	0,175	B	M
LQM 05	0,399	0,75	0,308	B	B
LQM 06	0,372	-	0,329	B	B
LQM 07	0,484	-	0,434	B	B
LQM 08	0,944	-	-	B	A
LQM 09	0,781	-	-	B	B
LQM 10	0,287	-	0,243	A	A
LQM 11	0,949	-	-	B	B
LQM 12	0,982	-	-	B	B
LQM 13	0,842	-	-	B	B
LQM 14	0,926	-	-	A	A
LQM 15	0,905	-	-	B	B
LQM 16	0,962	-	-	B	M
LQM 17	0,793	0,989	-	A	A
LQM 19	0,898	-	-	A	A
LQM 20	0,975	-	-	B	A

B: baixa toxicidade; M: moderada toxicidade; A: alta toxicidade

Já em relação ao potencial de oxidação e toxicidade (Tabela 4, página 72) observamos que os compostos que possuem maior potencial de oxidação tendem a apresentar menor toxicidade nas concentrações testadas. A substância 3, 5, 9, 11, 12, 13 e 15 apresentaram maiores valores de potencial e apresentaram baixa toxicidade nas duas concentrações testadas. Já os compostos 2 e 8 apesar de também apresentarem valores de potenciais mais altos apresentaram toxicidade moderada e baixa, respectivamente, na menor concentração testada. A guanilhidrazona LQM 10 apresentou o menor potencial de oxidação (0,28 V) e foi a substância que apresentou a maior toxicidade em relação as demais. Em contra partida as LQM's 14, 17 e 19 apresentam potenciais de oxidação altos ($E_p > 0,8$ v) e possuem alta toxicidade nos embriões de *D. rerio*. Nesse cenário podemos afirmar que os valores dos potenciais de oxidação não possuem relação com a toxicidade em embriões de zebrafish.

5.2.2 Estudo da interação dos compostos com o biossensor de DNA utilizando VPD

As técnicas com biossensores eletroquímicos de DNA são ferramentas de grande utilidade para investigação rápida e barata dos efeitos das diferentes fontes responsáveis pelos danos oxidativos ao DNA e dos mecanismos de interação entre substância-DNA (OLIVEIRA-BRETT et al., 2004).

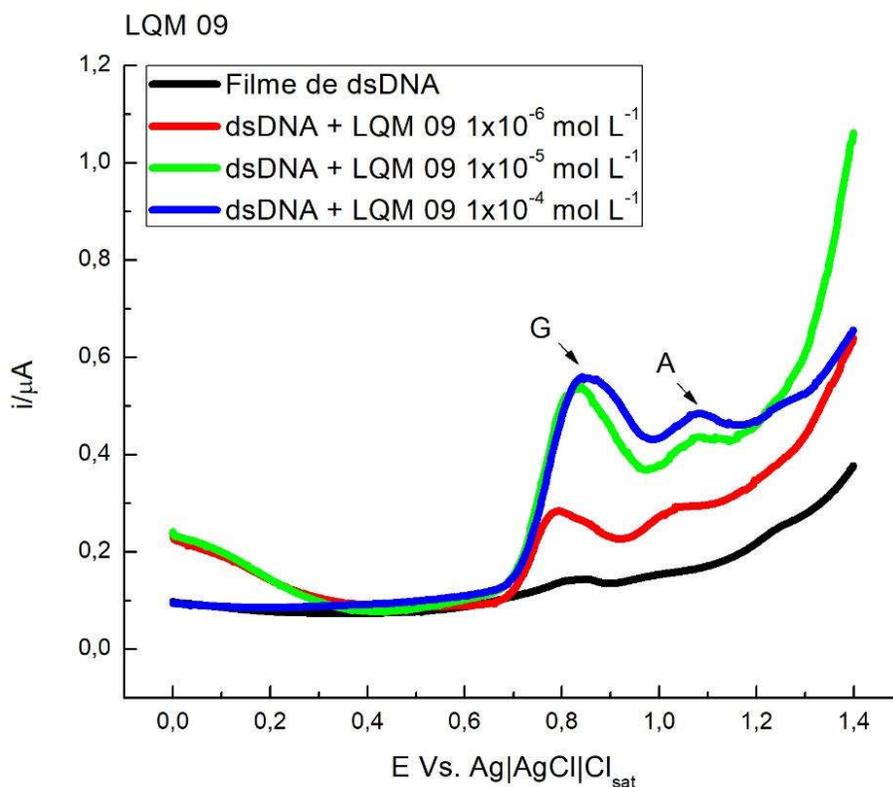
Existe na literatura estudos que indicam que a classe das guanilhidrazonas possuem a capacidade de gerar danos ao DNA. O grupo guanidínico na estrutura das guanilhidrazonas possui a capacidade de gerar citotoxicidade através de vários mecanismos devido a sua atividade antiproliferativa. Podemos citar a inibição da respiração mitocondrial, que consequentemente reduz a produção de “ATP” (trifosfato de adenosina) o que leva a uma inibição da ativação dependente de energia da fragmentação do DNA mediada por caspase (EKELUND; NYGREN; LARSSON, 2001). Outros efeitos antiproliferativos estão associados ao bloqueio da progressão do ciclo celular (G2), reduzindo o potencial transmembrana mitocondrial ou diminuindo a quantidade de ATP intracelular (ANDREANI et al., 2000). Em seus estudos Rodrigues et al., (2016) avaliou os efeitos mutagênicos e genotóxicos de dois derivados guanidínicos. O estudo indicou que os compostos induzem a quebra das cadeias de DNA, através de radicais livres, consequência do estresse oxidativo que causa danos nas bases do DNA. Desta maneira, os derivados das guanilhidrazonas possuem efeitos genotóxicos e mutagênicos devido ao seu potencial oxidativo e uma possível interação com o DNA.

No presente estudo, investigou-se a interação de dois derivados em destaque (LQM 09 e 19) com o DNA. O eletrodo de carbono vítreo foi revestido na superfície com um filme a partir do gel de dsDNA e posteriormente foi investigado o comportamento das substâncias usando como técnica a voltametria de pulso diferencial em tampão acetato com valor de pH 4,5.

A figura 27 mostra o efeito de diferentes concentrações do derivado LQM 09 determinada após 15 minutos de exposição do composto ao eletrodo de dsDNA-GC. Ao realizar a VPD do biossensor + tampão acetato sem a adição da amostra não pode ser observada a oxidação das bases (guanina e adenina). Os picos correspondentes à oxidação da guanina e adenina aparecem em +0,815V e +1,164V, respectivamente. Desta forma, foi observado evidências de danos ao DNA na menor concentração ($1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e a medida em que se aumentou a concentração foi observado o aumento da intensidade do sinal da oxidação da

guanina (G) e adenina (A). O sinal correspondente a oxidação da guanina pode ter sido ampliado devido a associação da oxidação da LQM 09 a qual ocorre em um potencial de +0,781.

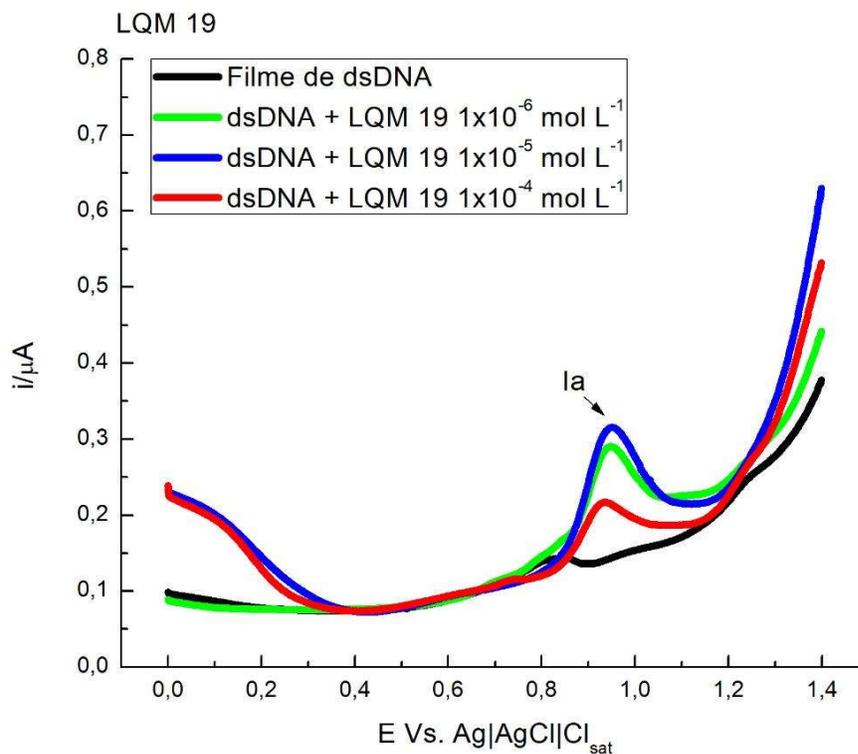
Figura 27 – Voltamogramas de pulso diferencial registrado após 15 minutos de exposição de um biossensor de dsDNA a diferentes concentrações da LQM 09 em tampão acetato (pH 4,5). Amplitude do pulso de 50 mV, largura do pulso de 70 ms e taxa de varredura de 0,005 V s⁻¹.



FONTE: O AUTOR

A figura 28 mostra as interações entre o eletrodo de dsDNA-GC e a substância LQM 19 em diferentes concentrações em tampão acetato. Passado o tempo de contato de 15 minutos, o pico relacionado a oxidação do derivado 19 foi observado (I_a , $E_{pIa} = +0,951$) e à medida que foi aumentada a concentração o sinal se tornou maior. Nessas condições (tempo de contato e concentrações) o pico I_a (figura 28, página 75) pode ter obscurecido os sinais das bases e nenhuma informação referente ao dano no DNA pôde ser observada.

Figura 28 – Voltamogramas de pulso diferencial registrado após 15 minutos de exposição de um biossensor de dsDNA a diferentes concentrações da LQM 19 em tampão acetato (pH 4,5). Amplitude do pulso de 50 mV, largura do pulso de 70 ms e taxa de varredura de 0,005 V s⁻¹.



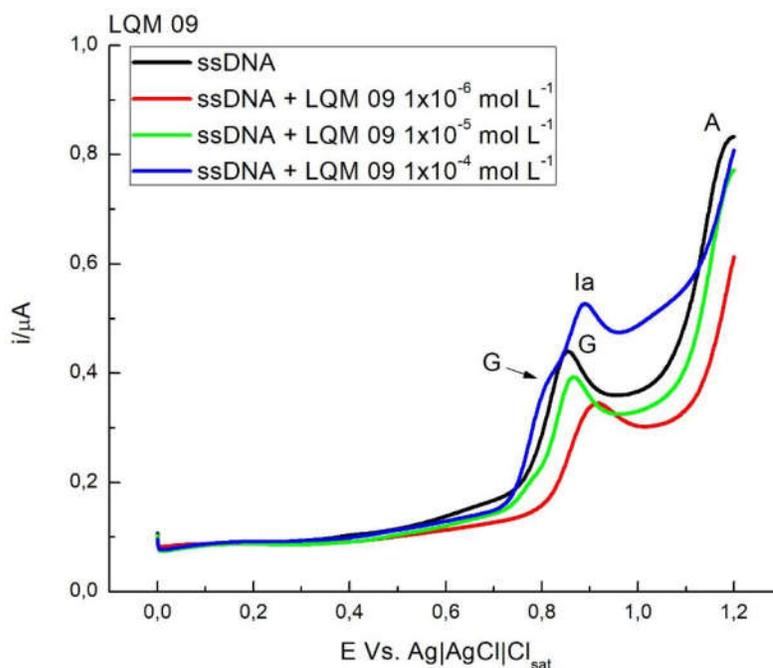
FONTE: O AUTOR

5.2.3 Estudo da interação dos compostos com o sensor de ssDNA utilizando VPD

Com o intuito de se obter mais dados sobre a reatividade dos compostos frente ao DNA, também foi avaliada a capacidade das LQM's 09 e 19 gerar danos por VPD a partir da solução de ssDNA em tampão acetato (pH 4,5). Os voltamogramas de pulso diferencial para os dois derivados estão representados nas figuras 29 e 30. Os resultados mostram que os dois interagem com a solução de ssDNA. Os picos anódicos G (+0,87) e A (+1,21) são típicos do ssDNA antes da adição das amostras, os quais correspondem respectivamente a guanina e adenina. Quando é adicionado a amostra, ocorre a diminuição e o deslocamento dos picos (G e A) e a diminuição é diretamente proporcional ao aumento da concentração.

As interações entre a LQM 09 e o ssDNA em solução estão ilustradas na figura 29. Os sinais referentes à oxidação das bases guanina (G) e adenina (A) são intensos, porém na presença da substância 09 a intensidade da corrente dos picos de oxidação diminuem nas duas primeiras concentrações avaliadas. Na concentração de $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, além de haver uma diminuição na intensidade é visível o deslocamento do pico G de +0,854 para +0,914. Na concentração de $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ foi observada uma menor diminuição nos picos das duas bases do que na concentração de $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, porém ainda pode-se destacar a interação do mesmo com a solução de ssDNA. Quando a concentração foi novamente elevada observou-se o pico de oxidação da LQM 09 (Ia, $E_{pIa} = +0,890$) o qual suprimiu o pico da base guanina na concentração testada, porém é notório um ombro (seta na figura 29) a um $E_{pa} = +0,812$, que pode está relacionado a oxidação da guanina.

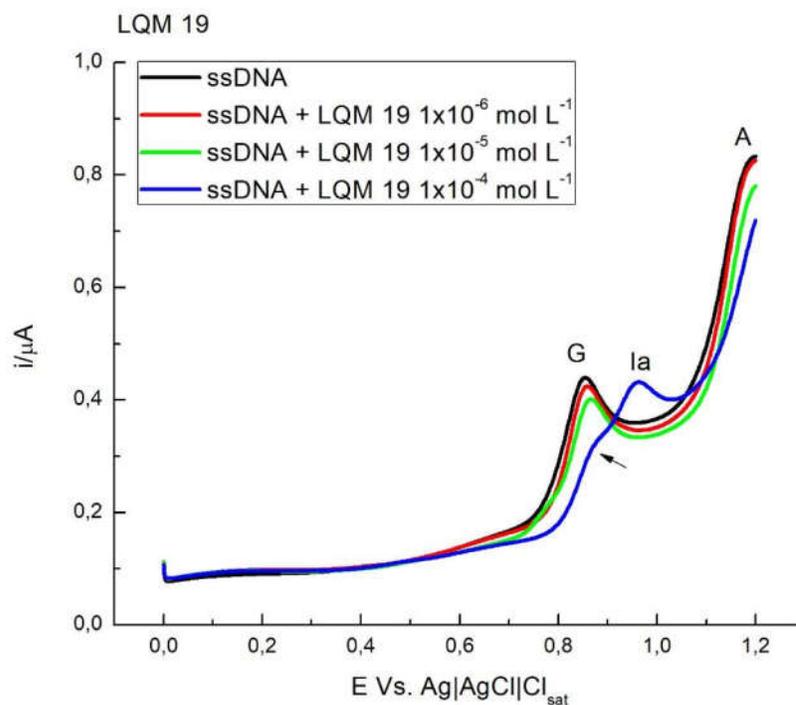
Figura 29 – Voltamogramas de pulso diferencial da LQM 09, presente em diferentes concentrações, em tampão acetato (pH 4,5) em solução de ssDNA. O pico Ia está relacionado a oxidação do composto e os picos marcados com G e A estão relacionados com a oxidação de guanina e adenina respectivamente.



FONTE: O AUTOR

A interação entre a substância LQM 19 e a solução de ssDNA estão demonstrados na figura 30. A LQM 19 interage com o ssDNA e esse comportamento é confirmado pela diminuição da amplitude das correntes de oxidação das bases de guanina e adenina (G e A). Nas concentrações $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a intensidade da corrente diminui de forma proporcional na faixa de oxidação das duas bases. Já na maior concentração é visível o pico de oxidação da substância 19 (Ia, na figura 30) com um $E_{paIa} = 0,962$ e um ombro (seta na figura 30) com potencial de $+0,874$ que possivelmente corresponde a oxidação da guanina.

Figura 30 – Voltamogramas de pulso diferencial da LQM 19, presente em diferentes concentrações, em tampão acetato (pH 4,5) em solução de ssDNA. O pico Ia está relacionado a oxidação do composto e os picos marcados com G e A estão relacionados com a oxidação de guanina e adenina respectivamente.



FONTE: O AUTOR

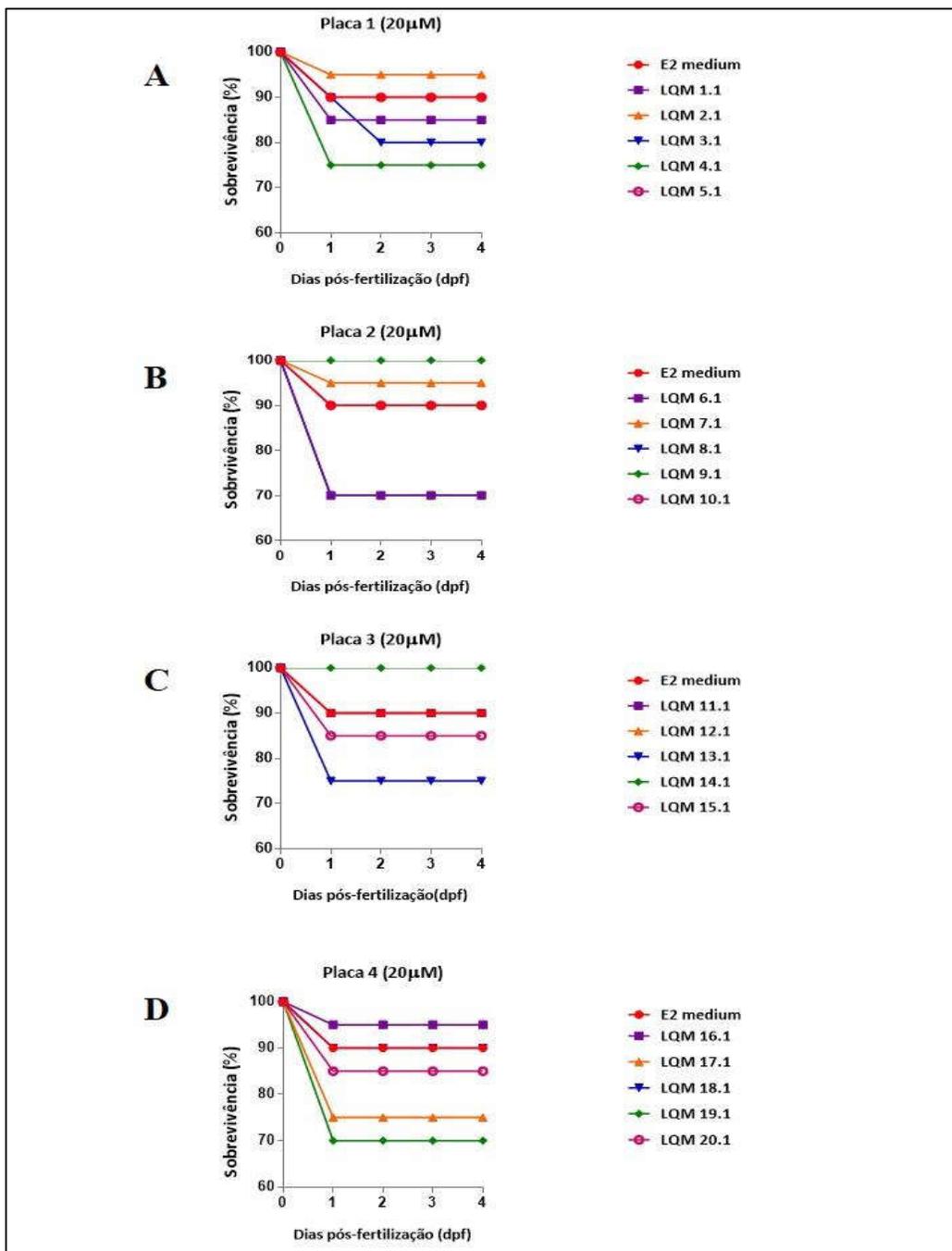
5.3 Avaliação da Toxicidade Aguda da Série LQM.1 em embriões de Zebrafish (FET TEST)

No teste de toxicidade (FET TEST) com embriões expostos a segunda série de substâncias na concentração de 20 μ M por 96 horas, foram observados os parâmetros de mortalidade (coagulação do embrião, falta de formação da somite, ausência de desprendimento do rabo-cauda do saco vitelino e falta de batimentos cardíacos) para determinar a taxa de sobrevivência dos embriões. A concentração testadas apresentou a capacidade de provocar efeitos tóxicos decorrente da exposição em embriões de *D. rerio*. Após os testes de toxicidade aguda, foi possível determinar a porcentagem da sobrevivência dos embriões e larvas após 96 horas da série de substâncias LQM's 1.1-20.1 (Figura 31, página 79).

De um modo geral, a toxicidade das substâncias frente ao *D. rerio* diminuíram assim como é visto na figura 31. Não foi evidenciado nenhum composto com sobrevivência menor que de 70%. As substâncias LQM's 2.1, 5.1, 7.1, 9.1, 10.1, 11.1, 14.1, 16.1, 18.1 apresentaram um perfil de sobrevivência maior ou igual ao controle (meio E2), $\geq 90\%$. Em comparação com a primeira série, a segunda (LQM.1) conseguiu desencadear menor toxicidade. Podemos citar os compostos 9.1 e 14.1 os quais mantiveram todos os embriões vivos após o experimento. Os derivados, da primeira série, que foram altamente tóxicos aos embriões (LQM's 10, 14, 17 e 19) após as alterações estruturais nas moléculas apresentaram uma grande diminuição de toxicidade, apresentando taxas de sobrevivência maiores que 70%.

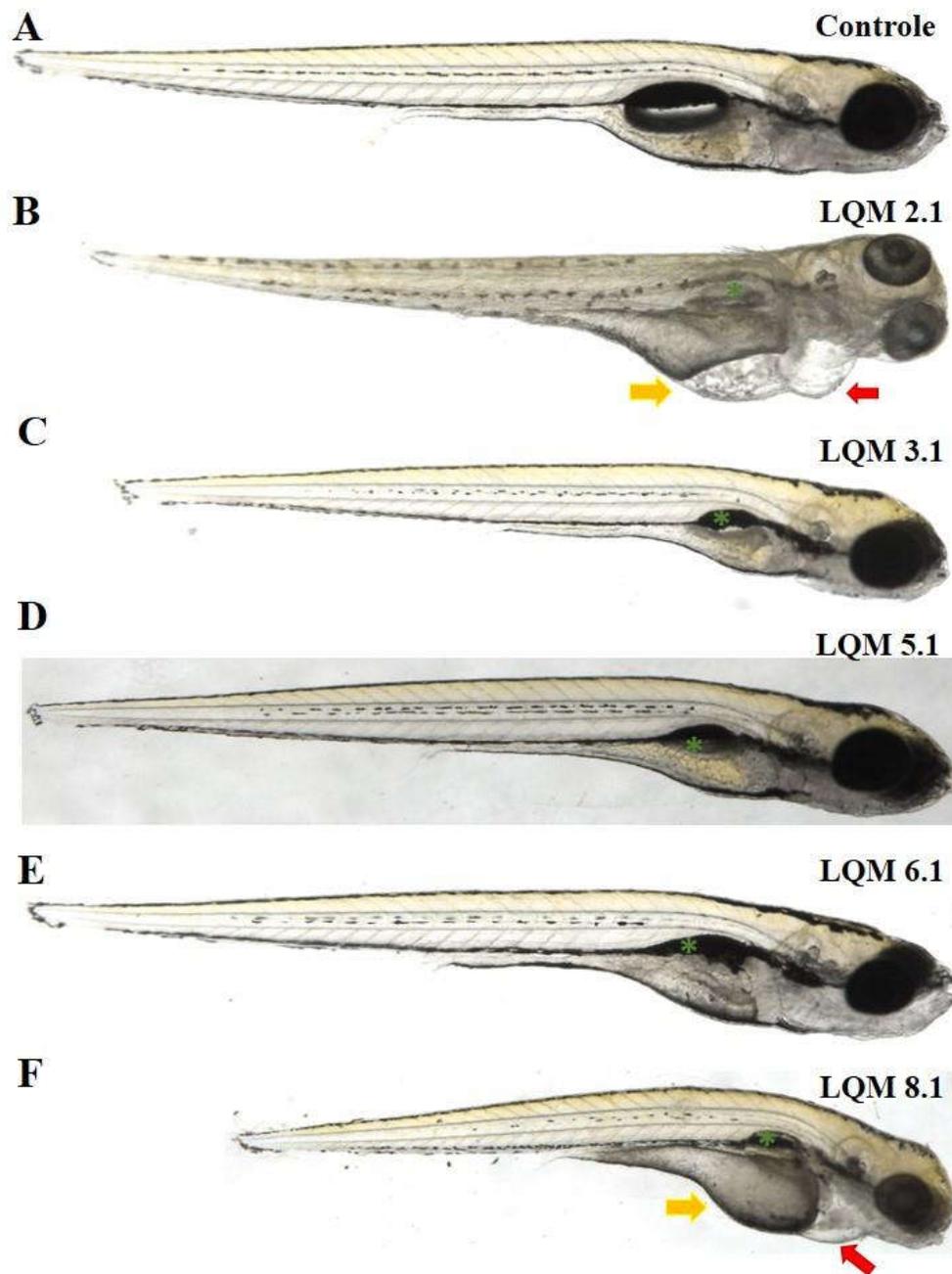
As substâncias da segunda série (LQM.1) também desencadearam teratogenicidade, ou seja, alterações morfológicas que foram observadas durante o desenvolvimento dos embriões no experimento. Os compostos apesar de diminuírem a mortalidade frente aos embriões, apresentaram mais alterações morfológicas do que a primeira série (LQM). As figuras 32, 33 e 34 ilustram as alterações morfológicas e as os compostos responsáveis pelas alterações. Analisando as figuras 32- 34: a maioria dos derivados causaram má formação ou ausência da bexiga natatória, órgão responsável pela sustentação e nado das larvas; os embriões expostos as substâncias 2.1, 8.1, 9.1, 10.1, 16.1 e 17.1 apresentaram edema de pericárdio e edema de saco vitelino; a LQM 13.1 promoveu edema de pericárdio; as larvas que apresentaram desvio de coluna (escoliose) foram expostas as substâncias 9.1, 13.1, 17.1, e 19.1.

Figura 31 – Sobrevivência de embriões de *D. rerio* expostos aos derivados aminoguanidínicos LQM's 1.1-5.1 (A), LQM's 6.1-10.1 (B), LQM's 11.1-15.1 (C) e LQM's 16.1-20.1 (D) na concentração de 20 μ M.



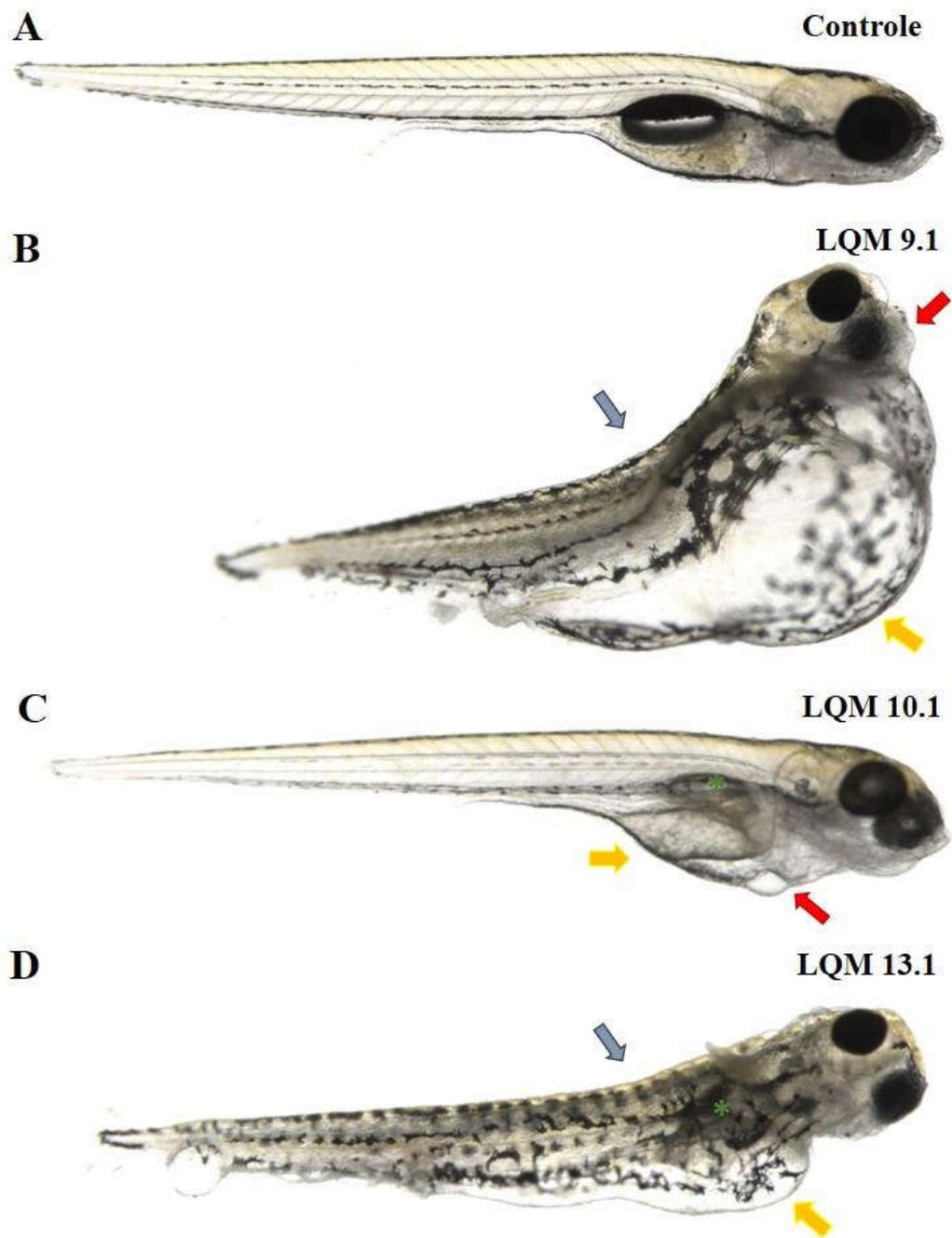
FONTE: O AUTOR

Figura 32 – Efeitos teratogênicos dos derivados aminoguanidínicos após 96 hpf de exposição em 20 μ M. Controle (A), LQM 2.1 (B), LQM 3.1 (C), LQM 5.1 (D), LQM 6.1 (E) e LQM 8.1 (F). Seta vermelha: edema de pericárdio, seta amarela: edema de saco vitelino e asterisco verde: ausência de bexiga natatória.



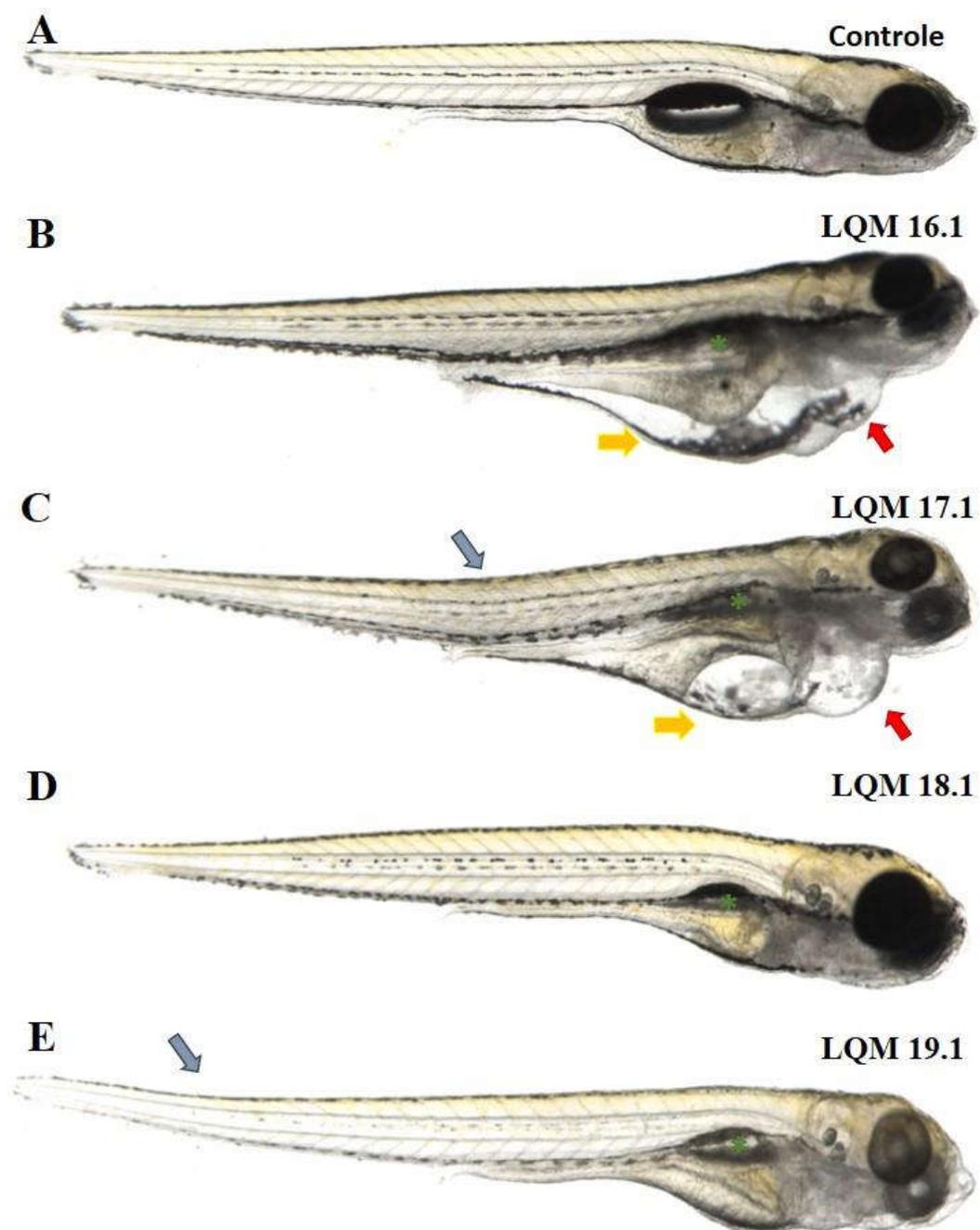
FONTE: O AUTOR

Figura 33 – Efeitos teratogênicos dos derivados aminoguanidínicos após 96 hpf de exposição em 20 μ M. Controle (A), LQM 9.1 (B), LQM 10.1 (C) e LQM 13.1 (D). Seta vermelha: edema de pericárdio, seta amarela: edema de saco vitelino, seta azul: escoliose e asterisco verde: ausência de bexiga natatória.



FONTE: O AUTOR

Figura 34 – Efeitos teratogênicos dos derivados aminoguanidínicos após 96 hpf de exposição em 20 μ M. Controle (A), LQM 16.1 (B), LQM 17.1 (C), LQM 18.1 (D) e LQM 19.1 (E). Seta vermelha: edema de pericárdio, seta amarela: edema de saco vitelino, seta azul: escoliose e asterisco verde: ausência de bexiga natatória.



5.4 Comportamento Eletroquímico da série LQM.1 por Voltametria Cíclica (VC) em meio prótico

Assim como na primeira série os voltamogramas cíclicos em meio prótico foram realizados em tampão fosfato, pH 7, e devido à baixa solubilidade das substâncias, trabalhamos em uma concentração de $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ utilizando etanol a 10% como co-solvente, para aumentar a solubilidade dos compostos no meio. Os voltamogramas estão representados na figura 35.

As voltametrias ciclicas foram realizadas com a série LQM.1 as quais nasceram de alterações na estrutura molecular da série de guanilhidrazonas LQM, conseqüentemente os potenciais de oxidação sofreram alterações. As LQM 1.1 e 7.1 apresentaram apenas um potencial de oxidação ($E_{pa} = + 0,428\text{v}$ e $E_{pa} = + 0,443\text{v}$, respectivamente) ao contrário dos seus compostos mãe que apresentavam duas ondas de oxidação (Ia e Ic). A substância LQM 10.1 apresentou um perfil semelhante ao da LQM 10, apresentando os picos de oxidação em uma faixa semelhante, além de aparecer um ombro em um potencial de $+0,220\text{v}$.

A maioria dos compostos apresentaram potenciais de oxidação acima de $+0,7\text{v}$ (figura 35, página 84) assim como na primeira série e não apresentaram nenhum sinal de reversibilidade, indicando que o processo de oxidação ocorre de forma irreversível. Na concentração testada ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) a intensidade da corrente foi baixa e alguns ombros (apontados com setas na figura 35) foram perceptíveis, que podem indicar algum processo redox que está ocorrendo.

Figura 35 – Voltamogramas cíclicos para os compostos LQM's 1.1, 2.1, 3.1, 4.1, 5.1, 7.1, 9.1, 10.1, 11.1, 12.1, 13.1, 14.1, 16.1, 17.1, 18.1 e 20.1 na concentração de $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio aquoso etanólico (10%), tampão fosfato pH 7. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (Continua)

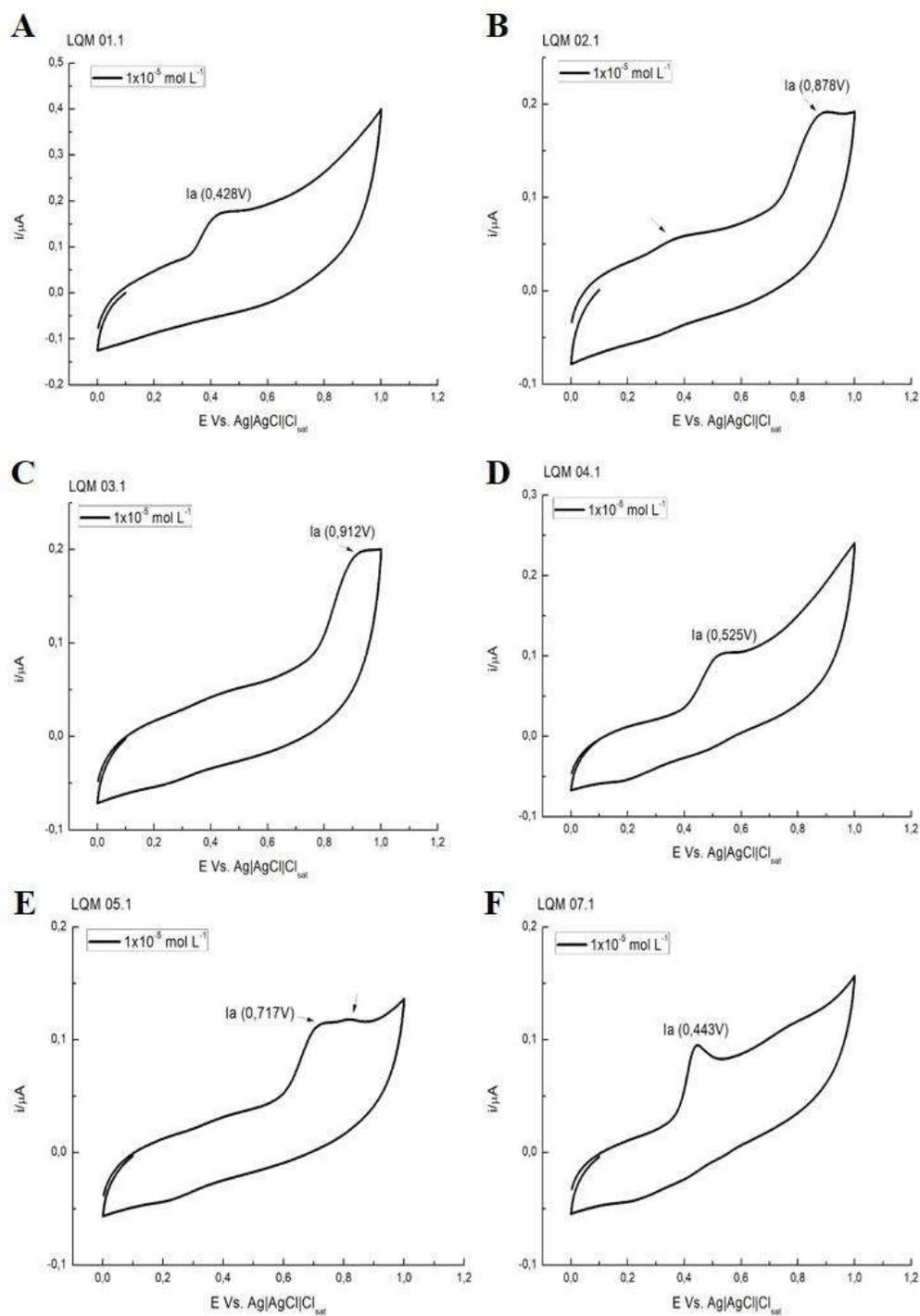


Figura 35 – Voltamogramas cíclicos para os compostos LQM's 1.1, 2.1, 3.1, 4.1, 5.1, 7.1, 9.1, 10.1, 11.1, 12.1, 13.1, 14.1, 16.1, 17.1, 18.1 e 20.1 na concentração de $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio aquoso etanólico (10%), tampão fosfato pH 7. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (Continua)

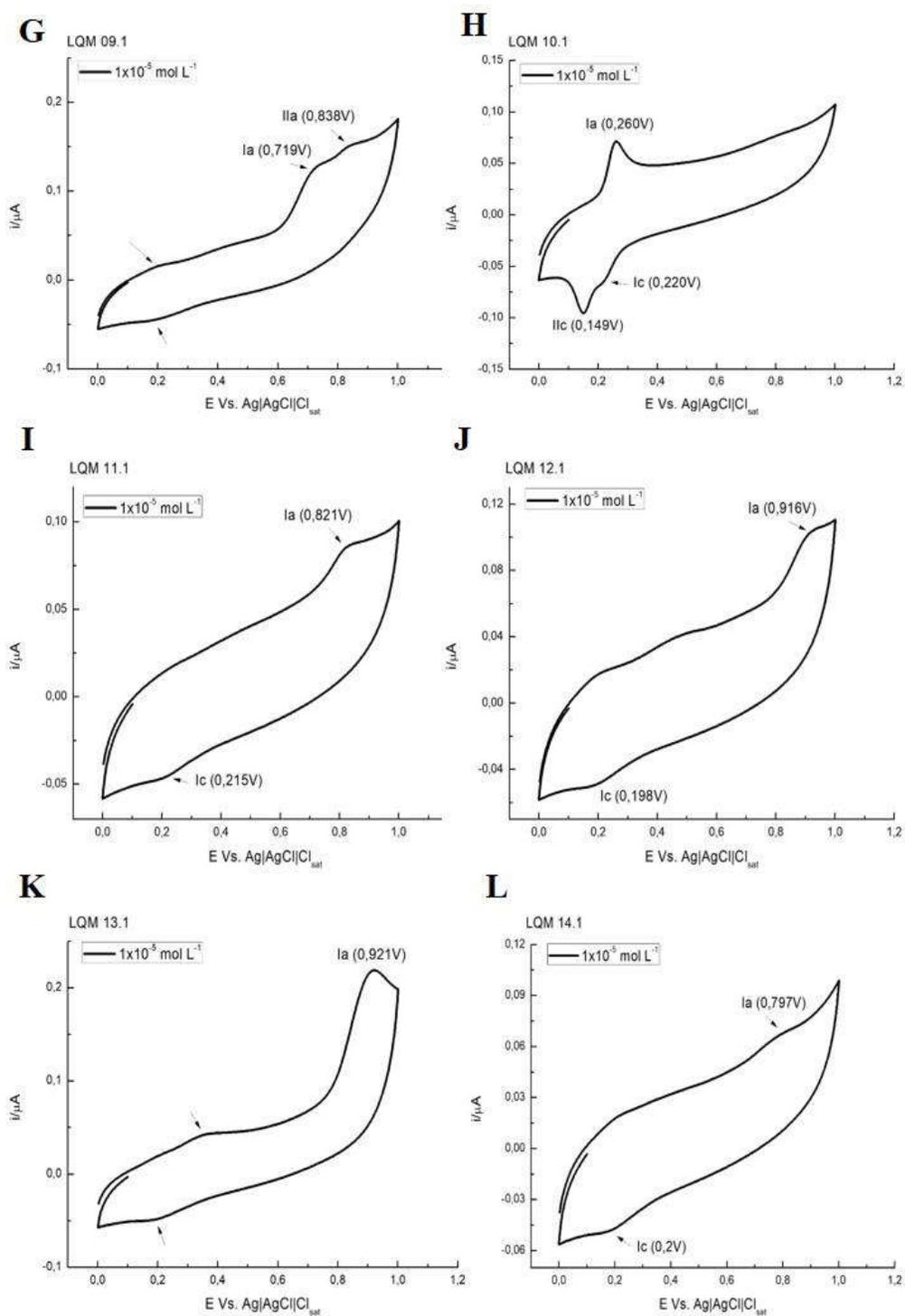
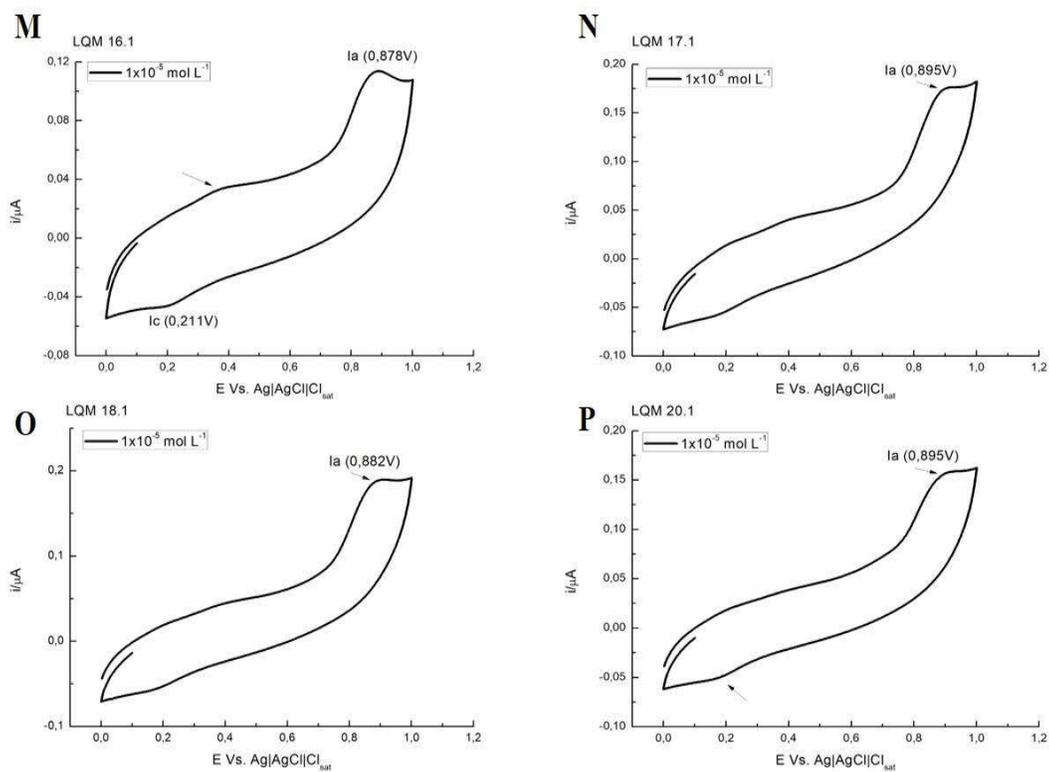


Figura 35 – Voltamogramas cíclicos para os compostos LQM's 1.1, 2.1, 3.1, 4.1, 5.1, 7.1, 9.1, 10.1, 11.1, 12.1, 13.1, 14.1, 16.1, 17.1, 18.1 e 20.1 na concentração de $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio aquoso etanólico (10%), tampão fosfato pH 7. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (Conclusão)



FONTE: O AUTOR

6. CONCLUSÃO

A exposição do *D. rerio* as concentrações de 20 e 50 μ M da série de substâncias guanilhidrazonas (LQM) durante 96h nos permite concluir que:

- As substâncias 10, 14, 17 e 19 apresentaram alta toxicidade nas duas concentrações testadas, causando a morte de 100% dos embriões;
- As substâncias 3, 6, 7, 9, 11 e 13 apresentaram baixa toxicidade nas duas concentrações testadas;
- As substâncias 5, 8 e 12 desencadearam um delay de desenvolvimento no embriões;
- Foram observados efeitos teratogênicos: curvatura na coluna (substâncias 2, 5, 8, 18 e 20), edema de saco vitelino (substância 5), edema de pericárdio (substância 7) e má formação da bexiga natatória (substância 18).

A exposição do *D. rerio* as concentrações de 20 μ M da série de substâncias LQM.1 durante 96h nos permite concluir que:

- A toxicidade das substâncias frente ao *D. rerio* diminuíram após as alterações moleculares, onde a sobrevivência dos embriões ficaram acima de 70%.
- Foram observados efeitos teratogênicos: edema de pericárdio e/ou edema de saco vitelino (2.1, 8.1, 9.1, 10.1, 13.1, 16.1 e 17.1), desvio de coluna (9.1, 13.1, 17.1, e 19.1) e ausência de bexiga natatória.

Através dos estudos eletroquímicos por voltametria cíclica das guanilhidrazonas (LQM) podemos concluir que:

- O processo de transferência de elétrons dessas substâncias ocorre na faixa de potencial da oxidação.
- As substâncias que possuem substituintes retiradores de elétrons no anel aromático possuem o maior potencial de oxidação;
- Não foi evidenciado a relação direta dos potenciais de oxidação e a toxicidade em embriões de *D. rerio*.

- Através do estudo da interação das LQM 09 e 19 com o biossensor de dsDNA por VPD podemos concluir que o composto LQM 09 interage e causa dano ao DNA de forma dependente da concentração. Já a LQM 19 não apresentou de forma clara a interação com o DNA nas condições propostas, uma vez que seu potencial de oxidação obscureceu o sinal da oxidação das bases guanina e adenina.

- Através do estudo da interação das LQM 09 e 19 com a solução de ssDNA por VPD concluímos que os composto LQM 09 e 19 interagem e consequentemente causam danos ao DNA pela diminuição da intensidade do sinal das bases guanina e adenina.

Os estudos eletroquímicos por voltametria cíclica da série LQM.1 podemos concluir que:

- O processo de transferência de elétrons dessas substâncias ocorre na faixa de potencial da oxidação de forma irreversível e apresentam potenciais de oxidação em uma faixa parecida dos compostos mãe (série LQM)

7. PERSPECTIVAS

Durante o desenvolvimento deste trabalho de dissertação surgiram ideias de novos trabalhos que podem ser desenvolvidos no futuro. Uma possibilidade é a determinação da toxicidade em peixes adultos de *D. rerio*. Outra possibilidade seria investigar a toxicidade em órgãos específicos do mesmo através de análise histológica e realizar mais estudos eletroquímicos para melhor elucidação dos mecanismos redox que essas substâncias podem promover.

8. REFERÊNCIAS

ABREU, F. C. DE. Some Applications of Electrochemistry in Biomedical Chemistry. Emphasis on the Correlation of Electrochemical and Bioactive Properties. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 1, p. 19–35, 2002.

ABREU, F. C. DE; PAULA, F. S. DE; FERREIRA, D. C. M. The Application of DNA-Biosensors and Differential Scanning Calorimetry to the Study of the DNA-Binding Agent Berenil. **Sensors**, v. 8, p. 1519–1538, 2008.

AÏT-AÏSSA, S. et al. Activation of the hsp 70 promoter by environmental inorganic and organic chemicals : relationships with cytotoxicity and lipophilicity. v. 145, p. 147–157, 2000.

ALEIXO, L. M. **Voltametria : Conceitos e Técnicas**. Disponível em: <<http://chemkeys.com/br/wp-content/themes/chemkeysbr/articleI.php?u=dm9sdGFtZXRyaWEtY29uY2VpdG9zLWUtdGVjbmljYXM=>>>. Acesso em: 30 set. 2018.

ANDRADE, M. N. S. DA C. **Desenvolvimento de um biossensor para ácido lático a base de nanomateriais eletródicos**. [s.l.] Universidade Federal de Alagoas, 2013.

ANDREANI, A. et al. Potential Antitumor Agents . Part 29 : Synthesis and Potential Coanthracyclinic Activity of Imidazo [2 , 1-b] thiazole Guanylhydrazones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 2359–2366, 2000.

ANDREANI, A. et al. Imidazo[2,1-b]thiazole guanylhydrazones as RSK2 inhibitors [1]. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 4311–4323, 2011.

ANDRES, T.; ECKMANN, L.; SMITH, D. K. Voltammetry of nitrobenzene with cysteine and other acids in DMSO. Implications for the biological reactivity of reduced nitroaromatics with thiols. **Electrochimica Acta**, v. 92, p. 257–268, 2013.

AŠMONAITE, G. et al. Behavioural toxicity assessment of silver ions and nanoparticles on zebrafish using a locomotion profiling approach. **Aquatic Toxicology**, v. 173, p. 143–153, 2016.

BARBAZUK, W. B. et al. The synthenic relationship of the zebrafish and human genomes. **Genome Research**, v. 10, p. 1351–1358, 2000.

BARROS, T. P. et al. Zebrafish: An emerging technology for in vivo pharmacological assessment to identify potential safety liabilities in early drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, n. 7, p. 1400–1413, 2008.

BERTOLETTI, E. **Ensaio biológicos com organismos aquáticos e sua aplicação no controle da poluição**. São Paulo: Cetesb, 1990.

BRAUNBECK, T. et al. The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 21, p. 16247–16261, 2014.

BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Eletroquímica: princípios, métodos e aplicações**. [s.l.] Oxford University Press, 1996.

BRUICE, P. Y. Aromaticidade - Reações do benzeno. In: **Química Orgânica**. 4. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006. p. 2–29.

BUSQUET, F. et al. OECD validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 69, n. 3, p. 496–511, 2014.

CAI, T.; XIAN, M.; WANG, P. G. Electrochemical and peroxidase oxidation study of N'-Hydroxyguanidine derivatives as NO donors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, n. 11, p. 1507–1510, 2002.

CAREY, F. A. Arenos e Aromaticidade. In: **Química Orgânica**. 7. ed. Porto Alegre: AMGH, 2011. p. 448–497.

CAVALCANTE, M. F. et al. Síntese de 1,3,5-Triazinas preparadas e utilizadas no bioensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 20–22, 2000.

CAVALCANTI, J. C. M. et al. Effect of the leaving group on the electrodic reduction mechanism of anti-*Helicobacter pylori* metronidazole derivatives, in aprotic and protic media. **Bioelectrochemistry**, v. 63, n. 1–2, p. 353–357, 2004.

CHAOYONG, M. A. Animal models of disease: These systems are becoming increasingly important secondary screens of in vitro. hits. **American Chemical Society Modern Drug Discovery**, n. June, p. 30–36, 2004.

COSTA, C. DE O. **Estudos bioeletroquímicos de quinonas**. [s.l.] Universidade Federal de Alagoas, 2011.

CRONIN, M. T. D.; DEARDEN, J. C. QSAR in Toxicology. 1. Prediction of Aquatic Toxicity. **Quantitative Structure-Activity Relationships**, v. 14, n. 1, p. 1–7, 1995.

DAMMSKI, A. P. et al. **Zebrafish - Manual de criação em biotério**. 1ª edição ed. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2011.

DE PAIVA, Y. G. et al. Correlation between electrochemical and theoretical studies on the leishmanicidal activity of twelve Morita-Baylis-Hillman adducts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 5, p. 894–904, 2012.

DE SOUZA, A. A. **Estudos bioeletroquímicos de nitroquinonas derivadas da nor- β -lapachona**. [s.l.] Universidade Federal de Alagoas, 2011.

DICULESCU, V. C.; PAQUIM, A. M. C.; BRETT, A. M. O. Electrochemical DNA sensors for detection of DNA damage. **Sensors**, v. 5, n. 6–10, p. 377–393, 2005.

EKELUND, S.; NYGREN, P.; LARSSON, R. Guanidino-containing drugs in cancer chemotherapy : biochemical and clinical pharmacology. v. 61, p. 1183–1193, 2001.

ELIEZER, J. B.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

ENSAFI, A. A. et al. Bioelectrochemistry Electrochemical study of quinone redox cycling : A novel application of DNA-based biosensors for monitoring biochemical reactions. **Bioelectrochemistry**, v. 111, p. 15–22, 2016.

EPIFANIO, W. A. N. **Síntese e avaliação citotóxica de derivados aminoguanidínicos como protótipos de fármacos antineoplásicos**. [s.l.] Universidade Federal de Alagoas, 2011.

FONSECA, I.; PROENÇA, L.; CAPELO, S. A Voltametria Cíclica E De Varrimento Linear Unidirecional: Suas Potencialidades Na Caraterização De Processos De Corrosão. **Corros. Prot. Mater**, v. 34, n. 1, p. 12–21, 2015.

FOYE, W. O. et al. Synthesis and biological activity of guanylhydrazones of 2- and 4-pyridine and 4-quinoline carboxaldehydes. **J Pharm Sci**, v. 79, n. 6, p. 527–530, 1990.

GOESSLING, W.; SADLER, K. C. Zebrafish: An Important Tool for Liver Disease Research. **Gastroenterology**, v. 149, n. 6, p. 1361–1377, 2015.

GOLDSMITH, P. Zebrafish as a pharmacological tool: The how, why and when. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, n. 5, p. 504–512, 2004.

GREEF, R.; PEAT, R.; GROUP., S. ELECTROCHEMISTRY. **Instrumental methods in electrochemistry**. Chichester; New York; Toronto: Horwood, Wiley, 1985.

GROSELL, M.; WOOD, C. M. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. **The Journal of experimental biology**, v. 205, n. Pt 8, p. 1179–1188, 2002.

GUYON, J. R. et al. Modeling human muscle disease in zebrafish. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1772, n. 2, p. 205–215, 2007.

HOFFMAN, B. B. Catecolaminas, fármacos simpaticomiméticos e antagonistas dos receptores adrenérgicos. In: **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. p. 163–203.

KARI, G.; RODECK, U.; DICKER, A. P. Zebrafish: An emerging model system for human disease and drug discovery. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 82, n. 1, p. 70–80, 2007.

KIDD, K. R.; WEINSTEIN, B. M. Fishing for novel angiogenic therapies. **British Journal of Pharmacology**, v. 140, n. 4, p. 585–594, 2003.

LEMKE, T. L. et al. **Foye's principles of Medicinal Chemistry**. 6. ed. [s.l.] Baltimore: Wolter Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, 2008.

LIEBER, E.; SMITH, G. B. L. The chemistry of aminoguanidine and related substances. **Chemical Reviews**, v. 25, n. 2, p. 213–271, 1939.

LOESBERG, C. et al. bis (guanylhydrazone) [methylGAG] was studied in human neuroblastoma SK-N-SH, mouse neuroblastoma N,E115 and mouse lymphosarcoma S49 cells. Proliferation of SK-N-SH cells was insensitive to. **Biochemical Pharmacology**, v. 42, n. 4, p. 793–798, 1991.

LOMBARDI, J. V. Fundamentos de toxicologia aquática. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M. A. P. (Eds.). . **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Varela, 2004. p. 263–272.

LU, X.; WANG, Q.; LIU, X. Review: Recent applications of scanning electrochemical microscopy to the study of charge transfer kinetics. **Analytica Chimica Acta**, v. 601, n. 1, p. 10–25, 2007.

LU, Z. G. et al. Developmental toxicity and neurotoxicity of two matrine-type alkaloids, matrine and sophocarpine, in zebrafish (*Danio rerio*) embryos/larvae. **Reproductive Toxicology**, v. 47, p. 33–41, 2014.

MANDEWALE, M. C. et al. Synthesis and Biological Evaluation of New Hydrazone Derivatives of Quinoline and Their Cu(II) and Zn(II) Complexes against *Mycobacterium tuberculosis*. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2015, p. 1–14, 2015.

MARTINS, T. L. C. **Síntese de guanilhidrazonas, atividade antibiótica e estudos de interação com DNA por RMN**. [s.l.] Instituto Militar de Engenharia, 2004.

MESSEDER, J. C. et al. Aromatic guanyl hydrazones: Synthesis, structural studies and in vitro activity against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, n. 24, p. 3079–3084, 1995.

NILSSON, B. O. Biological effects of aminoguanidine: An update. **Inflammation Research**, v. 48, n. 10, p. 509–515, 1999.

OECD. **Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test**. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-236-fish-embryo-acute-toxicity-fet-test_9789264203709-en>. Acesso em: 30 jul. 2018.

OGA, S.; CAMARGO, M. M.; BATISTUZZO, J. A. **Fundamentos de Toxicologia**. 3 edição ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008.

OLIVEIRA-BRETT, A. M. et al. Electrochemical detection of in situ adriamycin oxidative damage to DNA. v. 56, p. 959–970, 2002.

OLIVEIRA-BRETT, A. M. et al. Voltammetric determination of all DNA nucleotides. **Analytical Biochemistry**, v. 332, n. 2, p. 321–329, 2004.

PACHECO, W. F. et al. Artigo Voltametrias : Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Revista virtual de química**, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.

PARNG, C. et al. Zebrafish: A Preclinical Model for Drug Screening. **ASSAY and Drug Development Technologies**, v. 1, n. 1, p. 41–48, 2002.

PINDUR, U.; JANSEN, M.; LEMSTER, T. Advances in DNA-Ligands with Groove Binding , Intercalating and / or Alkylating Activity : Chemistry , DNA-Binding and Biology. p. 2805–2847, 2005.

ROCHA, E. S. B. et al. Gestão do conhecimento na saúde: revisão sistemática de literatura. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 20, n. 2, p. 392–400, 2012.

RODRIGUES, V. et al. Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis Cytotoxic , mutagenicity , and genotoxicity effects of guanylhydrazone derivatives. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 806, p. 1–10, 2016.

RUIZ, R.; AVIADO, M. Pharmacology of new antimalarial drugs—3 guanylhydrazones. **Pharmacology**, v. 4, p. 45, 1970.

SACHIDANANDAN, C. et al. Identification of a novel retinoid by small molecule screening with zebrafish embryos. **PLoS ONE**, v. 3, n. 4, 2008.

SCHOLZ, S. et al. A European perspective on alternatives to animal testing for environmental hazard identification and risk assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 67, n. 3, p. 506–530, 2013.

SEKUTOR, M.; GLASOVAC, Z.; MLINARIC-MAJERSKI, K. Neighboring Effect in Fragmentation Pathways of Cage Guanylhydrazones in the Gas Phase. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 41–42, p. 28–34, 2013.

SILVA, F. P. L. et al. Synthesis and anticancer activities of novel guanylhydrazone and aminoguanidine tetrahydropyran derivatives. **Molecules**, v. 21, n. 6, p. 1–11, 2016.

SITTARAMANE, V. et al. Discovery of quinoline-derived trifluoromethyl alcohols, determination of their in vivo toxicity and anticancer activity in a zebrafish embryo model. **ChemMedChem**, v. 10, n. 11, p. 1802–1807, 2015.

SKOOG, D. A. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: Pioneira, 2005.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SOUZA, G. C. **ESTUDO DA TOXICIDADE DA NANOEMULSÃO DE ÁLCOOL PERÍLICO (NPOH) SOBRE ZEBRAFISH (Danio rerio Hamilton, 1822)**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ, 2015.

STERN, H. M.; ZON, L. I. Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 7, p. 533–539, 2003.

VALENTE, C. O. **Desenvolvimento de um biossensor a base de hemina para análise de amodiaquina em leite materno**. [s.l.] Universidade Federal de Sergipe, 2010.

VAN DEN BRANDHOF, E. J.; MONTFORTS, M. Fish embryo toxicity of carbamazepine, diclofenac and metoprolol. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 8, p. 1862–1866, 2010.

WANG, J. **Electrochemical biosensors : Towards point-of-care cancer diagnostics**. [s.l.: s.n.]. v. 21

WANG, J. **Analytical electrochemistry**. 3^a ed. USA: John Wiley & Sons, 2006b.

WANG, Q. et al. Enhancement of the bioavailability of a novel anticancer compound (acetyltanshinone IIA) by encapsulation within mPEG-PLGA nanoparticles: a study of formulation optimization, toxicity, and pharmacokinetics. **Oncotarget**, v. 8, n. 7, p. 12013–12030, 2017.

XUE, J. Y. et al. An assessment of the impact of SiO₂ nanoparticles of different sizes on the rest/wake behavior and the developmental profile of zebrafish larvae. **Small**, v. 9, n. 18, p. 3161–3168, 2013.

YANG, X. et al. Toxicity of hemimethyl-substituted cucurbit[7]uril. **Food and Chemical Toxicology**, v. 108, p. 510–518, 2017.

YUAN, Z. et al. Chitosan nanoparticles and their Tween 80 modified counterparts disrupt the developmental profile of zebrafish embryos. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 515, n. 1–2, p. 644–656, 2016.