

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

MARÍLIA NIEDJA SANTOS DA COSTA

**ESTUDOS ELETROQUÍMICOS DE DERIVADOS 5-NITROTIOFENO-
TIOSEMICARBAZÔNICOS – COMPOSTOS DE INTERESSE BIOLÓGICOS**

**MACEIÓ
2019**

MARÍLIA NIEDJA SANTOS DA COSTA

**ESTUDOS ELETROQUÍMICOS DE DERIVADOS 5-NITROTIOFENO-
TIOSEMICARBAZÔNICOS – COMPOSTOS DE INTERESSE BIOLÓGICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para à obtenção do grau de Doutora em Ciências.

Orientadora: Prof.Dra.Fabiane Caxico de Abreu Galdino

**MACEIÓ
2019**

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
1Biblioteca Central
2Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale – CRB4 - 661

C837e Costa, Marília Niedja Santos da.
Estudos eletroquímicos de derivados 5-nitrotiofeno-tiossemicarbazônicos
: compostos de interesse biológicos / Marília Niedja Santos da Costa. – 2019.
76 f. : il., grafs.

Orientadora: Fabiane Caxico de Abreu Galdino.
Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade
Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2019.

Bibliografia. f. 70-76.

1. Nitrocompostos. 2. Ciclodextrina. 3. Eletroquímica. I. Título.



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



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Doutoranda **MARÍLIA NIEDJA SANTOS DA COSTA** intitulada: **“ESTUDOS ELETROQUÍMICOS DE DERIVADOS 5-NITROTIOFENO-TIOSSEMICARBAZÔNICOS – COMPOSTOS DE INTERESSE BIOLÓGICOS”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 19 de março de 2019, às 9h, na sala de Reuniões do IQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Fabiane Caxico de Abreu Galdino
Prof^a Dr^a Fabiane Caxico de Abreu Galdino
(PPGQB/IQB/UFAL) Orientadora

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

Johnnatan Duarte de Freitas
Prof. Dr. Johnnatan Duarte de Freitas
(IFAL)

Emanuella Gomes da Silva
Dr^a Emanuella Gomes da Silva
(UPA)

DEDICATÓRIA

- A minha mãe (*in memoriam*) fonte inesgotável de inspiração.
- A minha orientadora pela paciência e incentivo que tornaram possível a conclusão desta etapa da minha vida.
- Ao meu filho Vinicius, a Nena, meu pai, meu irmão, minha família e as minhas amigas pelo carinho e apoio constante.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem ele nada seria possível.

A Universidade Federal de Alagoas e ao Instituto de Química e Biotecnologia, por toda estrutura.

À professora Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino por tornar possível a realização desse trabalho, pela paciência na orientação, compreensão, contribuição para o meu crescimento e amadurecimento. Serei eternamente grata pela confiança e por sempre me mostrar que eu seria capaz, mesmo passando por dias turbulentos.

A todos do LEMAN (Laboratório de eletroquímica e microssistemas de análise) no IQB-UFAL, que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, de forma direta ou indiretamente, em especial a Samaysa Lins, Marílya Palmeira, Carol, Sara, Renata, Emanuela, Ygor e Elvis Max vocês foram meus verdadeiros companheiros nessa etapa da minha vida.

A todos os professores que me acompanharam até hoje, através de seus ensinamentos e incentivos, em especial as professoras da minha graduação Ângela Froelich, Josiane Luna e Cida. Ao professor da pos-graduação Hugo Juarez que marcou com sua metodologia de dar aula, onde usei como inspiração durante a prova do concurso do Instituto Federal de Alagoas, na qual fui aprovada.

Ao meu filho Vinicius que me acompanhou, na minha barriga, durante as disciplinas e provas. Por ser um presente enviado por Deus, menino educado, carinhoso e esperto, que ficou diversas vezes no meu colo durante a escrita desse trabalho, com a melhor frase de motivação “mamãe termina logo o doutorado, pra gente brincar” essa frase fez toda a diferença nessa fase final, de tanto cansaço.

A minha mãe Maria (*in memoriam*), falecida quando eu estava terminando o memorial acadêmico para a seleção do doutorado, que com todas as dificuldades sempre fez o possível e um pouco mais, para me ver estudando e realizar um grande sonho dela, que seria sua filha doutora. Ao meu pai e ao meu irmão Mário Alberto, minha cunhada Jordana pelo conforto e apoio constante. A toda minha família em especial minha secretária Nena, minha Tia Gilvete, minhas primas Josiane e Neide que cuidam do meu filho com todo carinho e cuidado durante minha jornada no doutorado.

As minhas amigas Bruna Bernardes, Camila Calado e Sarah Bianca que acreditam nos meus sonhos e estão sempre dispostas a me escutar sempre que preciso me fazendo forte nos momentos de fraqueza e transmitido muito felicidade.

Ao meu psiquiatra Tadeu e minha psicóloga Clarissa por todo o suporte psicológico, tornando meus dias mais leves.

Ao Instituto Federal de Alagoas, pelo afastamento durante parte do meu doutorado.

RESUMO

Devido as suas conhecidas propriedades biológicas os nitrocompostos aromáticos são muito aplicados na indústria farmacêutica, principalmente pelos seus prováveis mecanismos de ação ocorrerem por meio de reações de oxirredução. A identificação do nitro e de seus produtos, por uma técnica simples, sensível e de baixo custo como as técnicas eletroquímicas, é fundamental, pois através delas é possível analisar o processo de solubilização desses compostos em associação com alguns agentes encapsulantes. O presente trabalho teve como objetivo estudos eletroquímicos de derivados 5-nitrotiofeno-tiossemicarbazônicos, compostos estes de comprovada atividades biológicas. Foram realizados estudos espectroscópicos no UV-Vis em meio aquoso-etanólico em diferentes tempos. O sistema eletroquímico utilizado foi composto por 3 eletrodos, Ag/AgCl/Cl⁻ saturado (referência), fio de platina (auxiliar), carbono vítreo e ouro (Au) (trabalho), em meio tamponado pH 7,0. Para o estudo de estabilidade, os derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos não sofreram degradação nas condições analisadas. Os derivados do 5-nitrotiofeno-tiossemicarbazônicos possuem mecanismo de redução padrão de nitroaromáticos com potencial dentro da faixa esperada para compostos com atividade biológica, onde as substituições não comprometeram o mecanismo base, apresentando pequenas mudanças de potencial. β -Ciclodextrina foi testado como agente encapsulante e demonstrou eficiência para formação do complexo com o composto em estudo, sendo o LNN5 o que apresentou melhor perfil eletroquímico e através da formação de uma monocamada auto-organizada (SAM) de β -CD-SH no eletrodo de Au, foi possível determinar a constante de associação aparente entre o complexo LNN5: β -CD com valor de $2,78 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ e valores de LD e LQ obtidos foram 0,20 e 0,68 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Quanto a interação dos compostos com DNA, os derivados LNN1, LNN5 e LNN6 reage com ssDNA em solução reduzindo seu sinal analítico e interage com dsDNA principalmente nas nucleobases guanina. Em presença de oxigênio o LNN5 e LNN6 apresentaram uma interação com oxigênio.

Palavras-chave: Nitrocompostos. Ciclodextrina. Eletroquímica.

ABSTRACT

Due to their known biological properties, aromatic nitrocompounds are widely applied in the pharmaceutical industry, mainly because of their likely mechanisms of action to occur through oxirreduction reactions. The identification of nitro and its products by a simple, sensitive and low cost technique as the electrochemical techniques is fundamental, because through them it is possible to analyze the solubilization process of these compounds in association with some encapsulating agents. The present work aimed at electrochemical studies of 5-nitrothiophene-thiosemicarbazonic derivatives, compounds of proven biological activities. UV-Vis spectroscopic studies were performed in aqueous-ethanolic medium at different times. The electrochemical system used was composed of 3 electrodes, Ag / AgCl / Cl⁻-saturated (reference), platinum wire (auxiliary), glassy carbon and gold (Au) (working), in pH 7.0 buffered medium. For the stability study, 2- (5-nitro-thiophene) thiosemicarbazonic derivatives did not suffer degradation under the conditions analyzed. The 5-nitrothiophene-thiosemicarbazonium derivatives have standard reduction mechanism of potential nitroaromatics within the expected range for compounds with biological activity, where substitutions did not compromise the base mechanism, presenting small potential changes. β -Cyclodextrin was tested as an encapsulating agent and demonstrated efficiency for complex formation with the test compound, with LNN5 presenting the best electrochemical profile and by forming a self-organized β -CD-SH monolayer (SAM). Au electrode, it was possible to determine the apparent association constant between the LNN5: β -CD complex with a value of $2.78 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ and obtained LD and LQ values were 0.20 and $0.68 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. As for the interaction of compounds with DNA, LNN1, LNN5 and LNN6 derivatives react with ssDNA in solution reducing their analytical signal and interact with dsDNA mainly in guanine nucleobases. In the presence of oxygen, LNN5 and LNN6 presented an interaction with oxygen.

Keywords: Nitro compounds. Cyclodextrin. Electrochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Subestruturas químicas fundamentais de nitrocompostos empregados em terapêutica.....	20
Figura 2 - Estrutura química básica das tiossemicarbazonas.	22
Figura 3 - Estrutura química dos derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos.	23
Figura 4 – Estrutura moleculares das α -, β - e γ -CDs	24
Figura 5 - Ilustração esquemática da ciclodextrina livre (hospede) e substrato (hospedeiro) para formar o complexo substrato-CD.	25
Figura 6 - Variação do potencial com o tempo em voltametria cíclica, mostrando o potencial inicial, E_i , o potencial final, E_f , os potenciais máximos, E_{max} , e mínimo, E_i . 29	
Figura 7 - (a) Perfil corrente-potencial esquemático para VPD e (b) representação esquemática da aplicação do potencial em função do tempo em VPD para instrumentos digitais, amostragem da corrente em S1 e S2, sendo registrada a diferença entre essas correntes.	31
Figura 8 – Voltamograma de pulso diferencial de picos de corrente de forma gaussiana.....	32
Figura 9 - DNA em dupla fita (double-strand DNA) com representação detalhada do interior hidrofóbico do DNA destacando as fitas formadas pelos nucleotídeos interligados e suas respectivas bases.....	33
Figura 10 - Constituintes de um biosensor analítico.....	34
Figura 11 - Voltamograma de pulso diferencial obtido com eletrodo de carbono vítreo modificado com DNA em solução de tampão acetato 0,1 M, pH 4,5: ciclo 1 voltamograma do ssDNA (linha vermelha) e dsDNA (linha preta) ciclo 40 voltamograma do dsDNA (linha pontilhada).	35

Figura 12 - Sistema com os três eletrodos para análises eletroquímicas.....	39
Figura 13 - Representação esquemática da interação de ácido ferrocenocarboxílico em eletrodo de ouro: (I) eletrodo limpo; (II) modificado com monocamada de MUA; (III) modificado com monocamada mista de β -MUA/CDSH.	41
Figura 14 – Espectros de absorção na região do Uv-Vis dos derivados 2-(5-nitrotiofeno)tiossemicarbazônicos ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão fosfato pH 7,03 contendo 10% de etanol, em função do tempo. A) LNN2; B) LNN5; C) LNN6; D) LNN7; E)LNN8 e F)LNN9.....	46
Figura 15 - Espectros de absorção na região do Uv-Vis dos derivados 2-(5-nitrotiofeno)tiossemicarbazônicos ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão fosfato pH 7,03 contendo 10% de etanol, em função do tempo. A) LNN1; B) LNN5 e C) LNN6.....	47
Figura 16 – Reações de oxirredução dos derivados 2-(5-nitrotiofeno)tiossemicarbazônicos.	49
Figura 17 - Voltametria cíclica dos derivados 2-(5-nitrotiofeno)tiossemicarbazônicos ($5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em meio prótico tamponado (etanol + tampão fosfato: 3:7, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), carbono vítreo (área = $7,065 \text{ mm}^2$) e $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$. A) LNN1; B) LNN2; C) LNN3; D) LNN4; E) LNN5 e F) LNN6	50
Figura 18 - Voltametria cíclica dos derivados 2-(5-nitrotiofeno)tiossemicarbazônicos ($5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em meio prótico tamponado (etanol + tampão fosfato: 3:7, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), carbono vítreo (área = $7,065 \text{ mm}^2$) e $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$. A) LNN7; B) LNN8 e C) LNN9.	51
Figura 19 - Intervalo de variação do potencial de redução dos nitrocompostos e do oxigênio.....	52
Figura 20 - Voltamogramas cíclicos do LNN1 em eletrodo de carbono vítreo e adição de β -CD sólida em diferentes concentrações.....	53
Figura 21 - Voltamogramas cíclicos do LNN5 em eletrodo de carbono vítreo e adição de β -CD sólida em diferentes concentrações.....	54

Figura 22 - Voltamogramas cíclicos do LNN6 em eletrodo de carbono vítreo e adição de β -CD sólida em diferentes concentrações.....	55
Figura 23 – A) Voltamogramas em tampão fosfato pH 7,0 em crescentes concentrações de LNN5 ($1,0 \times 10^{-5}$ a $9,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹) em eletrodo modificado com β -CDSH+MUA; B) Regressão linear dos valores de [LNN5]/I _{pa} vs [LNN5] para determinar K; C) curva analítica de [LNN5] vs I _{pa} , para determinar LD e LQ.	57
Figura 24 - Voltametria de Pulso Diferencial de 0,3 mg mL ⁻¹ de DNA e A) LNN1 B) LNN5 e C) LNN6 em tampão acetato pH = 4,5, após tratamento térmico (60 min) em função de tempo, em um eletrodo de carbono vítreo. Amplitude de pulso 50 mV; largura de pulso 70 ms; $v = 10$ mV s ⁻¹	59
Figura 25 - Voltamograma de pulso diferencial de biossensor de dsDNA em ausência e presença de 5×10^{-5} mol L ⁻¹ de LNN1.....	61
Figura 26 - Voltamograma de pulso diferencial de biossensor de dsDNA em ausência e presença de 5×10^{-4} mol L ⁻¹ de LNN5.....	61
Figura 27 - Voltamograma de pulso diferencial de biossensor de dsDNA em ausência e presença de 5×10^{-4} mol L ⁻¹ de LNN6.....	62
Figura 28 - Voltametria cíclica do LNN1 (5×10^{-4} mol L ⁻¹) em meio aprótico DMF + TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹ , carbono vítreo (área = 7,065 mm ²) e $v = 0,100$ V s ⁻¹	63
Figura 29 - Voltametria cíclica do LNN5 (5×10^{-4} mol L ⁻¹) em meio aprótico DMF + TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹ , carbono vítreo (área = 7,065 mm ²) e $v = 0,100$ V s ⁻¹	63
Figura 30 - Voltametria cíclica do LNN6 (5×10^{-4} mol L ⁻¹) em meio aprótico DMF + TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹ , carbono vítreo (área = 7,065 mm ²) e $v = 0,100$ V s ⁻¹	64
Figura 31 - Voltamogramas Cíclicos para Voltamogramas Cíclicos para LNN1 (1×10^{-4} mol L ⁻¹) em DMF/TBAP (0,1 mol L ⁻¹), eletrodo de carbono vítreo, em presença de diferentes concentrações de oxigênio.	65
Figura 32 - Voltamogramas Cíclicos para Voltamogramas Cíclicos para LNN5 (1×10^{-4} mol L ⁻¹) em DMF/TBAP (0,1 mol L ⁻¹), eletrodo de carbono vítreo, em presença de diferentes concentrações de oxigênio.	66

Figura 33 - Voltamogramas Cíclicos para Voltamogramas Cíclicos para LNN6 (1×10^{-4} mol L⁻¹) em DMF/TBAP (0,1 mol L⁻¹), eletrodo de carbono vítreo, em presença de diferentes concentrações de oxigênio.67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades das α -, β - e γ -CDs.....	25
Tabela 2 - Representação esquemática do potencial aplicado ao eletrodo tem como resposta um sistema reversível e irreversível, com destaque para os parâmetros mais importantes, em VC.	30
Tabela 3 - Estrutura química dos derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos.	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6CN10	2-[(4-nitrofenil)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-4Hbenzo[b]tiofeno-3-carbonitrila
A	Ampère
A	Termo independente (equação da reta)
B	Coefficiente angular (equação da reta)
CD(s)	ciclodextrina(s)
CDSH	Ciclodextrina tiolada
DMF	Dimetilformamida
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dsDNA	Ácido Desoxirribonucléico em fita dupla (ou dupla hélice)
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_{pc}	Potencial de pico catódico
Eq.	Equação
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
H	Hora
H ₂ O	Água
<i>I</i>	Corrente
I_{max}	Corrente de pico máxima
I_{pa}	Corrente de pico anódica
I_{pc}	Corrente de pico catódico
LD	Limite de detecção
LNN1-9	5-nitrotiofeno-tiossemicarbazônicos 1-9
MUA	Ácido 11-mercaptoendecanóico
mV/s	millivolts por segundo
P.A.	Pureza Analítica
pH	Potencial hidrogeniônico
R ²	Coefficiente de determinação
rpm	Rotação por minuto
SAM	“Self Assembled Monolayers” (Monocamadas autoorganizadas)
ssDNA	Ácido Desoxirribonucléico em fita simples, do inglês single strand of DNA

TSC	Tiossemicarbozonas
UV-Vis	Espectroscopia no ultravioleta visível
V	Volts
VC	Voltametria Cíclica
VPD	Voltametria de Pulso Diferencial
α -CD	alfa-ciclodextrina
β -CD	beta-ciclodextrina
β -CDSH	beta-ciclodextrina tiolada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	Nitrocompostos.....	20
2.2	Tiossemicarbazonas	22
2.3	Derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos	23
2.4	Ciclodextrina.....	24
2.5	Importância da eletroquímica para química medicinal	26
2.6	Métodos eletroquímicos	28
2.6.1	Voltametria cíclica.....	28
2.6.2	Voltametria de pulso diferencial.....	30
2.6.3	Biossensores de DNA.....	32
3	OBJETIVOS.....	36
3.1	Objetivo Geral.....	36
3.2	Objetivos Específicos	36
4	METODOLOGIA	37
4.1	Reagentes e solventes.....	37
4.2	Preparo das soluções	38
4.3	Estudo de estabilidade no UV-vis.....	38
4.4	Estudos eletroquímicos.....	39
4.4.1	Limpeza padrão do eletrodo	39
4.4.2	Eletrodo de Ouro Modificado com SAM mista de β -CDSH + MUA.....	40
4.4.3	Estudo dos derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos em meio aprótico.....	41
4.4.4	Estudo em meio aprótico dos derivados 2-(5-nitrotiofeno)tiossemicarbazônicos em presença de oxigênio	41
4.4.5	Perfil eletroquímico dos derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos em meio prótico.....	42
4.4.6	Estudo de interação dos derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos com DNA.....	42
4.4.7	Estudos de interação dos derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos com β -CD	43

4.4.8	Estudo de interação dos derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos com SAM mista de β -CDSH + MUA	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	Estudo de estabilidade	45
5.2	Perfil voltamétrico em meio prótico	48
5.2.1	Estudos de encapsulação com β -CD.....	52
5.2.2	Estudo de interação com DNA.....	58
5.3	Perfil voltamétrico dos derivados em meio aprótico	62
5.4	Estudo de reatividade com oxigênio molecular	64
6	CONCLUSÃO	68
7	PERSPECTIVAS	69
8	REFERÊNCIAS	70

3 INTRODUÇÃO

Um grande problema de saúde pública em todo o mundo nos últimos anos tem sido o câncer, conhecido como um conjunto de mais de 100 tipos de diferentes doenças que, no entanto, tem em comum o crescimento desordenado de células com potencial invasivo.

Diante disso, uma série de novas pesquisas tem se desenvolvido na tentativa de compreender melhor os mecanismos das células neoplásicas e a quimioterapia tem se destacado como um dos principais tratamentos do câncer. No entanto, há uma série de problemas associados a esse tratamento, dentre eles: a resistência das células tumorais aos medicamentos utilizados e a citotoxicidade dos antineoplásicos em células normais, o que compromete a eficácia do tratamento.

Nesse cenário, muitos estudos têm se voltado para o desenvolvimento de agentes antitumorais mais eficazes, seguros e com menores efeitos colaterais. Com destaque para os nitrocompostos e os derivados tiossemicarbazonas por apresentarem variado espectro de atividades químicas e biológicas.

No entanto, um problema na descoberta de novas moléculas tem sido a baixa solubilidade em água, porque tem influência direta na farmacocinética de um composto com atividade biológica e causa problema desde adsorção a eliminação. Em vista disso, procura-se por alternativas que não intervenham na atividade farmacológica e que aumente a solubilidade desses compostos. Na literatura relata algumas alternativas, dentre elas a possibilidade de complexação entre moléculas orgânicas lipofílicas como a ciclodextrina.

E através das técnicas eletroquímicas, na qual assemelham-se as reações biológicas com relação às vias de transferência de elétrons, podem-se obter informações que auxiliam no mecanismo de ação dos fármacos e no planejamento de compostos biologicamente ativos, através do uso de novas metodologias que permitam elucidar processos que não podem ser feitos por meio de outras técnicas e a utilização de sensores.

Diante do exposto, o desenvolvimento de novos agentes com propriedades anticâncer se faz objeto de estudo do presente trabalho, afim de se analisar o perfil eletroquímico de novos derivados 5-nitro-tiofeno-tiossemicarbazônicos (compostos que contem na mesma estrutura química os dois farmacóforos: nitro-tiofenos e tiossemicarbazonas).

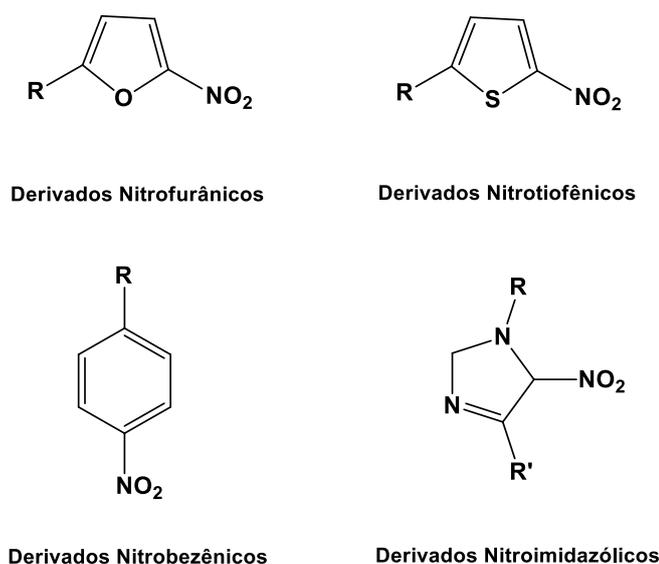
4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Nitrocompostos

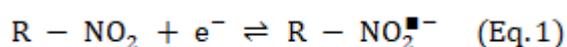
O emprego de nitrocompostos na terapêutica data de 1940, e o seu estudo teve maior interesse nos últimos anos devido a grande variedade de aplicações desses compostos. Diante disso, inúmeros compostos desta classe foram sintetizados e testados frente a muitas doenças, a exemplo da doença de chagas, leishmaniose, algumas infecções bacterianas, câncer, entre outras (HORROCKS et al., 2007; REMERS & BEARS, 1997).

É importante ressaltar que o emprego dos nitrocompostos não está limitado apenas a uma única classe terapêutica, possuindo também aplicação antianginosos (dinitrato de isossorbida, nitroglicerina), anticoagulante (acenocumarol), analgésico narcótico (clonitiazina), anti-inflamatório (nimesulida), anti-histamínico H-2 (ranitidina), antibacterianos (cloranfenicol, metronidazol, nitrofurais, nifuroxazida) (RANG et al., 2011; KOROLKOVAS & FRANÇA, 2007; KATZUNG et al., 2007; TAVARES et al., 1999). A Figura 1 apresenta as estruturas químicas fundamentais, das classes de nitrocompostos com atividade biológica de maior relevância.

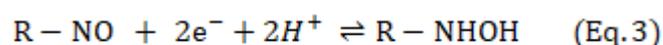
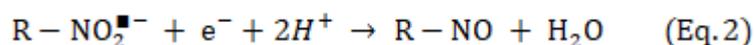
Figura 1 - Subestruturas químicas fundamentais de nitrocompostos empregados em terapêutica.



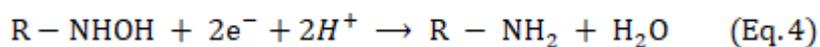
O grupo nitro presente na estrutura é fundamental para a atividade biológica desta classe de compostos. Com a presença de um anel aromático eles podem sofrer redução por duas vias diferentes, ligada diretamente a presença do oxigênio (meio aeróbio ou anaeróbio), no entanto independente da presença de oxigênio, a primeira etapa é a redução de um elétron para a formação do ânion radical nitro conforme ilustrado na Equação 1 (MOSCOSO et al., 2011; PAULAI, et al., 2009; BOELSTERLI et al., 2006; ABREU, et al., 2002; CAVALCANTI et al., 2004; NÚÑEZ-VERGARA, et al., 2001)



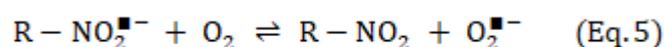
Observa-se nas equações abaixo, que em condições anaeróbicas, o nitro radical pode sofrer sucessivas reações e produzir os derivados nitroso (RNO) e hidroxilaminico (R-NHOH):



Ocorrendo a adição de mais dois elétrons pode forma a amina correspondente:



Em condições aeróbicas, o nitro ânion radical reage com oxigênio, regenerando o composto, conforme equação 5.



O nitro radical e a hidroxilamina formados são os principais metabólitos do processo de redução enzimático.

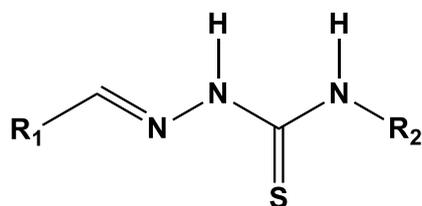
Sabe-se que o grupo nitro confere ao anel aromático maior estabilidade química e resistência à degradação microbiana (DENG et al., 2012), dentre os aromáticos destaca-se o grupo tiofeno por já apresentar atividade passível de ser melhor explorada (RODRIGUES et al., 2015).

4.2 Tiossemicarbazonas

São compostos orgânicos nitrogenados pertencentes à família das iminas, classificados como bases de Schiff. Assim como os nitrocompostos, essas também tem amplo emprego na química medicinal, devido as suas diversas atividades biológicas (ALMEIDA et al., 2015; EL-SHARIEF et al., 2013; SOUZA et al., 2013).

As tiossemicarbazonas (TSC) possuem estrutura $C = N - NH - CS - NH_2$ (Figura 2). Esses compostos apresentam muitas possibilidades de obtenção, o que leva a uma ampla gama aplicação. (SARNIGUET et al., 2014).

Figura 2 - Estrutura química básica das tiossemicarbazonas.



R_1 = Alquil
 R_2 = H, Alquil

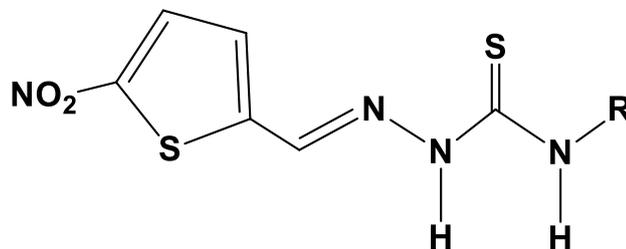
Fonte: Marques, 2017

Os novos derivados tiossemicarbazonas em avaliações têm mostrado a habilidade dessas moléculas em se ligar ao DNA (ALI, et al., 2014). Neste contexto, considerando a problemática do câncer e a necessidade do desenvolvimento de novos agentes antitumorais, se destaca o potencial antiproliferativo dos derivados tiofeno e tiossemicarbazonas.

4.3 Derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos

Os derivados 5-nitrotiofeno-tiossemicarbazônicos LNN1, LNN2, LNN3, LNN4, LNN5, LNN6, LNN7, LNN8 e LNN9 foram sintetizados no Laboratório de Química em Inovação Terapêutica (LQIT) da Universidade Federal de Pernambuco. A estrutura química principal do derivado 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos está representada na Figura 3 abaixo:

Figura 3 - Estrutura química dos derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos.



Fonte: Adaptado Araújo Neto et al., 2017.

Os novos derivados de 2- (5-nitro-tiofeno) -tiossemicarbazonas N-substituídos (LNN1-9) demonstraram ser potenciais agentes antifúngicos com atividade associada à inibição de enzimas relacionadas à biossíntese de ergosterol (ARAÚJO NETO et al., 2017). Também foram citotóxicos para todas as linhagens de células tumorais humanas e capazes de inibir o crescimento celular acima de 80%, em pelo menos uma linhagem tumoral testada com destaque para os compostos LNN-01, LNN-05, LNN-06, LNN-08 e LNN-09 os quais apresentaram melhor atividade inibitória em HT-29, K562 e MCF-7 quando comparados com a doxorrubicina (MARQUES, 2017).

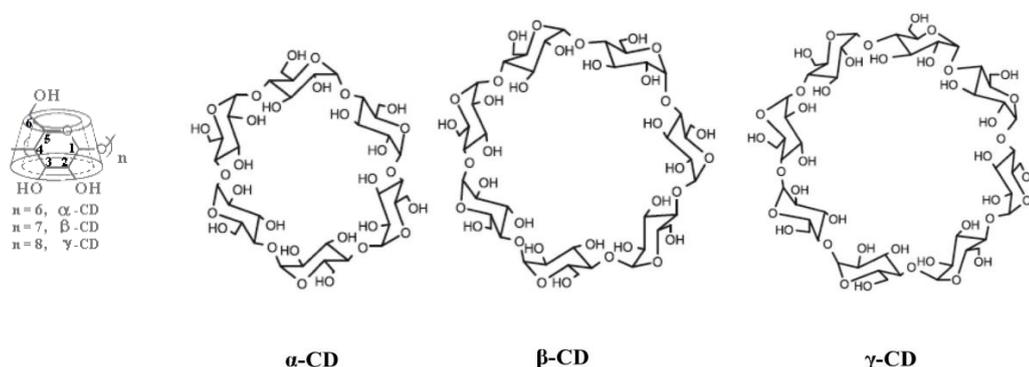
No entanto, no que tange a descoberta de novas moléculas a baixa solubilidade, tem sido um problema, porque tem influência direta na farmacocinética de um composto com atividade biológica e causa problema desde adsorção a eliminação. Em vista disso, procura-se por alternativas que não intervenham na atividade farmacológica e que aumente a solubilidade desses compostos. Na literatura relata algumas alternativas, dentre elas a possibilidade de complexação entre moléculas orgânicas lipofílicas como a ciclodextrina.

4.4 Ciclodextrina

As ciclodextrinas (CD) são compostos que pertencem à família dos oligossacarídeos cíclicos naturais ou semi-sintéticos. Trata-se de carboidratos complexos, composta por unidades de glicose (α -D-glucopiranosose) unidas por ligação α -1,4. Estão entre as CDs mais importantes de ocorrência natural, o que as diferencia são as unidades de glicose que as constituem, sendo respectivamente com 6, 7 e 8 unidades (Figura 4) (VENTURINI, et al., 2008; CEREDA, 2003).

A sua descoberta data de 1891, pelo pesquisador francês A. Villiers, ao descrever a ação de enzimas então denominadas CD glicosiltransferases, sobre o amido (VENTURINI et al., 2008; BREWSTER & LOFTSSON, 2007).

Figura 4 – Estrutura moleculares das α -, β - e γ -CDs



Fonte: Venturini et al., 2008; Rojas, et al, 1995.

Nesse sentido um enorme esforço tecnológico tem sido empreendido nos últimos anos para tornar viável do ponto de vista econômico, ou seja reduzir os custos de produção das CDs, afim de viabilizar sua aplicação farmacêutica. Esses compostas são uma nova classe de excipientes farmacêuticos, sendo possível encontrar mais de 35 medicamentos disponíveis no mercado, seja na forma sólida ou em solução, a exemplo: insulina, nimesulida, itraconazol e meloxicam, entre outros (ELEAMEN et al., 2016).

Sua estrutura química lhe confere propriedades físico-químicas únicas (Tabela 1) a exemplo da capacidade de solubilizar-se em meio aquoso, bem como encapsular no interior de sua cavidade moléculas hidrofóbicas, devido as hidroxilas

primárias do resíduo sacarídico. (CUNHA-FILHO & SÁ-BARRETO, 2009; LOFTSSON; MASSON, 2001; BREWSTER & LOFTSSON, 2007). Elas apresentam a capacidade de formar complexos por inclusão com moléculas orgânicas de tamanho apropriado e íons inorgânicos nos mais diversos meios. O processo de encapsulação ocorre sem que haja formação de ligações químicas ou mudanças estruturais. A formação desses complexos é de grande importância, principalmente pelas suas inúmeras aplicações, maior estabilidade, inclusive de radicais eletrogerados, a diminuição da volatilidade de perfumes, redução ou eliminação de gostos ou odores desagradáveis de fármacos e alimentos; o aumento na solubilidade de substratos lipofílicos em meio aquoso e, conseqüentemente, maior biodisponibilidade. (FERREIRA et al., 2010; WANG et al., 2006).

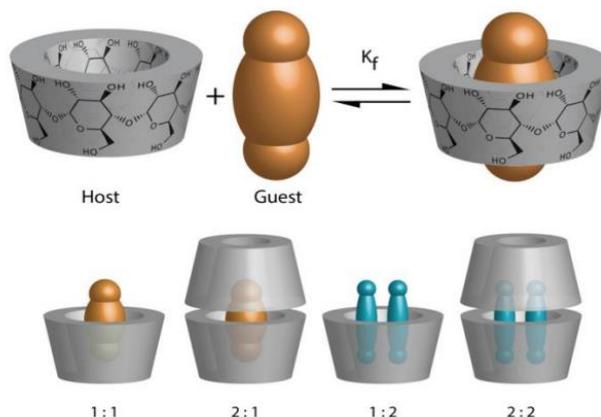
Tabela 1 - Propriedades das α -, β - e γ -CDs

Propriedades	α -Ciclodextrina	β -Ciclodextrina	γ -Ciclodextrina
Unidades de glucopirranose	6	7	8
Massa molar g/mol	972	1135	1297
Solubilidade em água 25°C (%)	14,5	1,85	23,2
Diâmetro exterior (Å)	14,6	15,4	17,5
Diâmetro da cavidade (Å)	4,7 – 5,3	6,0 – 6,5	7,5 – 8,3
Volume da cavidade (Å)	174	262	427

Fonte: Szejtli, 1998.

O estudo da formação de complexos (host-guest) com ciclodextrinas (Figura 5) pode ser feito por técnicas eletroquímicas que confirmam a formação dos mesmos através das mudanças observadas na corrente de pico, bem como no potencial de redução e/ou oxidação após inclusão do substrato (HROMADOVÁ et al, 2009).

Figura 5 - Ilustração esquemática da ciclodextrina livre (hospede) e substrato (hospedeiro) para formar o complexo substrato-CD.



Autor: Crini, 2014.

4.5 Importância da eletroquímica para química medicinal

De acordo com Barreiro & Fraga (2001) a química medicinal é um ramo que se dedica à compreensão das razões moleculares da ação dos fármacos, da relação entre estrutura química e atividade farmacológica dos mesmos, considerando fatores farmacodinâmicos e farmacocinéticos que se traduzam em propriedades farmacoterapeuticamente úteis e, portanto, represente um novo composto-protótipo, candidato efetivo a novo fármaco.

A maioria dos fármacos são micromoléculas bioativas, que exercem seu efeito terapêutico graças a interações específicas com uma biomacromolécula ou receptor (Jr, Bolzani, & Barreiro, 2006). E através das técnicas eletroquímicas podem-se obter informações que auxiliam na elucidação dos mecanismos de ação dos fármacos e no planejamento de compostos biologicamente ativos (SILVA et al., 2017).

A necessidade de simular as condições biológicas é um fator relevante para as análises eletroquímicas, visto que diversos processos fisiológicos importantes são baseados nas cadeias de oxirredução envolvendo sucessivos processos catalisados por enzimas, onde se encontra muita similaridade entre reações eletroquímicas e biológicas, com relação às vias de transferência de elétrons (SQUELLA, et al., 2006).

Os processos de redução/oxidação podem ser realizados em meio não-aquoso ou aquoso, isso porque o ambiente celular pode apresentar caráter tanto hidrofílico quanto lipofílico. Os sistemas lipofílicos são simulados pelo meio não-

aquoso e o meio aquoso simula muitos fluídos biológicos (Livertoux et al., 1996; De Abreu et al., 2002; Hillard et al., 2008).

É importante também considerar o conteúdo de O_2 da célula que, já que em tumores sólidos, contem regiões com baixa quantidade de oxigênio (hipóxia), devido a um pobre e desorganizado suprimento de sangue nas células. Alguns tumores são hipóxicos e seu ambiente redox é mais reduzido, enquanto outros proliferam-se em condições de desbalanço redox pró-oxidativo (Wardman et al., 2001; Asche, 2006). Assim, o pH do meio e a quantidade de oxigênio influenciam diretamente as reações eletroquímicas biológicas.

No que tange os parâmetros eletroquímicos, os potenciais de redução ou de oxidação de algumas substâncias fornecem importantes informações sobre a viabilidade dos processos de transferência de elétrons (TE) *in vivo* ou *in vitro*, e essas são obtidas por meio de técnicas eletroquímicas (SILVA et al., 2017; SQUELLA, et al., 2006).

A simulação de uma grande variedade de ambientes biológicos, tais como valores de pH, conteúdo de oxigênio na célula eletroquímica e solventes de propriedades diversas, comprovam de uma forma geral a versatilidade destas metodologias eletroquímicas.

O comportamento eletroquímico das substâncias pode ser alterado devido à mudança estrutural e isso afeta as curvas voltamétricas de diferentes maneiras, podendo causar deslocamentos nos potenciais redox, provocar mudanças no mecanismo eletródico, na reversibilidade química e eletroquímica e na cinética reacional. (SILVA et al., 2017; SQUELLA, et al., 2006).

As técnicas eletroanalíticas têm sido amplamente utilizadas com o objetivo de esclarecer os mecanismos de ação de fármacos, e nesse sentido é que se destaca a eletroquímica no estudo destes sistemas devido principalmente ao uso de sistemas químicos considerados limpos, além de ser relativamente fácil de controlar, podendo ser estudados em soluções tanto não-aquosas, quanto aquosas, permitindo deste modo avaliar o comportamento de radicais livres gerados nos sistemas biológicos (Squilla et al., 2006).

4.6 Métodos eletroquímicos

A eletroquímica estuda os fenômenos químicos associados à transferência de elétrons, que podem ocorrer de duas maneiras: heterogênea (superfície do eletrodo) e homogênea (solução) (BRETT & BRETT, 1996).

Todo processo eletroquímico tem fundamentação na aplicação de um potencial, potencial esse capaz de oxidar ou reduzir os substratos de interesse. Frente a química convencional, a eletroquímica apresenta como principal vantagem o baixo gasto de reagentes (MELLO, 2007; MOURA, 2008).

Sendo importante ressaltar também que a eletroquímica tem a capacidade de mimetizar as principais reações oxidativas que ocorrem no corpo humano, proporcionando uma boa aproximação do que ocorre *in vivo* (KOVACIC & SOMANATHAN, 2014), logo o estudo de processos em meio biológico se aproxima muito dos estudos que envolvem a transferência de elétrons, assim esses estudos são capazes de levar a compreensão dos variados processos que ocorrem nesse meio.

Os processos de oxirredução tem relação com vários e principais mecanismos desenvolvidos na célula viva, abrangendo desde processos de defesa do organismo até o processo metabólico, sendo sempre intermediados por enzimas presentes nesses organismos vivos (MOURA, 2008).

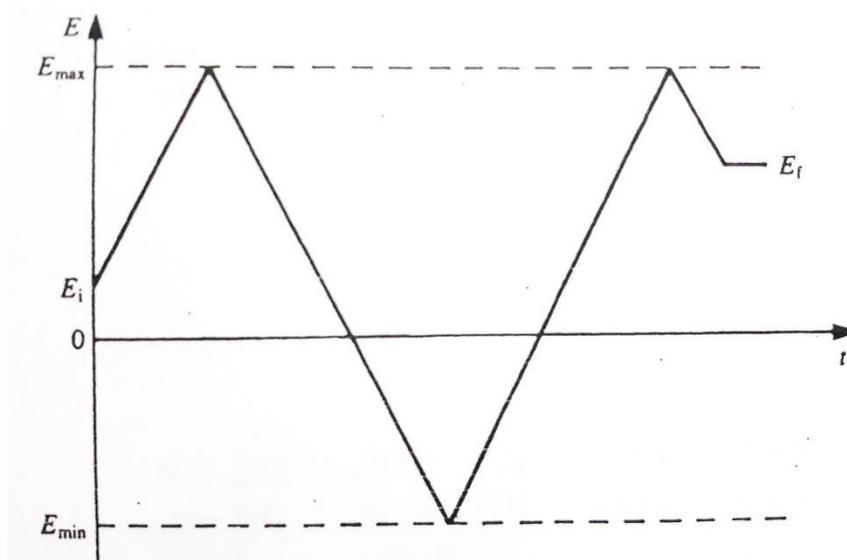
4.6.1 Voltametria cíclica

Dentre as técnicas eletroquímicas existentes, a mais empregada, com vistas à obtenção de informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos, é a voltametria cíclica (VC). Ela se destaca por sua habilidade em fornecer, rapidamente, informações sobre as reações de transferência de elétrons, sobre a termodinâmica de processos redox, sobre a cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons, a possibilidade de investigar a reatividade química das espécies eletrogeradas, auxilia na elucidação do mecanismo eletródico analisado, na detecção de intermediários de reação e no acompanhamento de reações

envolvendo produtos formados nos eletrodos (SKOOG et al., 2007; BARD, 2001; BRETT & BRETT, 1996).

Na voltametria cíclica para a corrente ser medida, um pequeno eletrodo estacionário em uma solução mantida em repouso é excitada na forma de uma onda triangular. Esta onda triangular produz a varredura no sentido direto e depois no sentido inverso, ou seja a direção do varredura é invertida, como se demonstra na Figura 6. Em ambas as direções a velocidade de varredura se mantiveram constante. Os parâmetros importantes a ser considerado na voltametria cíclica é o potencial inicial, E_i , a direção do varredura inicial, a velocidade de varrimento, o potencial final, E_f , os potenciais máximos, E_{max} , e mínimo, E_i . (BRETT & BRETT, 1996).

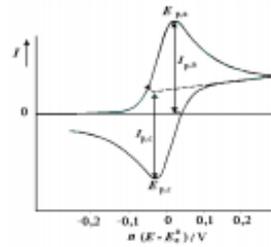
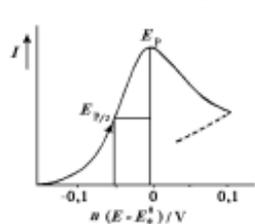
Figura 6 - Variação do potencial com o tempo em voltametria cíclica, mostrando o potencial inicial, E_i , o potencial final, E_f , os potenciais máximos, E_{max} , e mínimo, E_i .



Fonte: Brett & Brett, 1996.

Essa é uma técnica de varredura de potencial, em que o potencial aplicado ao eletrodo é variado numa velocidade conhecida e, ao atingir o potencial final desejado, a varredura é revertida para o valor inicial, na mesma velocidade. Como resposta a essa perturbação, é possível observar o processo eletródico através das informações obtidas como 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 pico de meia altura de onda (E_{p2}) (Tabela 3) (SKOOG, 2007; GREEF et al., 1985).

Tabela 2 - Representação esquemática do potencial aplicado ao eletrodo tem como resposta um sistema reversível e irreversível, com destaque para os parâmetros mais importantes, em VC.

Forma do Potencial Aplicado	Voltamogramas Cíclicos Resultantes	
	Processo Reversível	Processo Irreversível
		

Fonte: Greef et al., 1985.

A depender das propriedades químicas da substância em análise, os sistemas podem apresentar uma natureza reversível ou irreversível. Quando o produto da redução é todo consumido no processo de oxidação, o sistema apresenta uma transferência eletrônica reversível apresentando um par de picos catódico e um par anódico. No entanto, para uma transferência eletrônica de natureza irreversível, este apresentará apenas um par de picos (SKOOG, 2009 GREEF et al., 1985).

A voltametria cíclica é uma técnica experimentalmente simples e precisa para auxiliar na elucidação do mecanismo de ação de fármacos ou até mesmo pode colaborar no planejamento de compostos biologicamente ativos. É uma das principais técnicas utilizadas no estudo eletroquímico de uma infinidade de compostos, dentre eles, podemos destacar os nitrocompostos (SILVA et al., 2017)

4.6.2 Voltametria de pulso diferencial

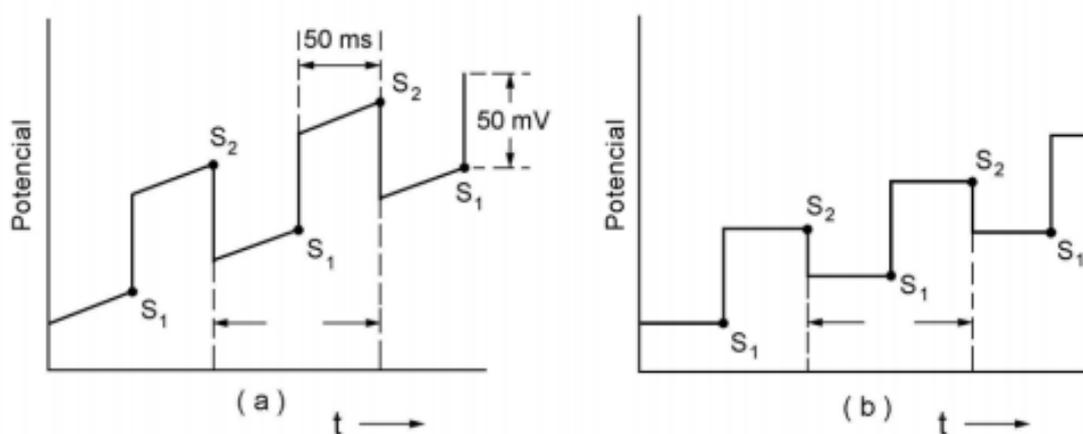
O princípio dessa técnica eletroquímica são pulsos de igual amplitude aplicados sobre uma rampa linear de potencial, sendo a corrente medida antes do pulso ser aplicado e ao final do pulso. Dessas duas correntes medidas é feita então a subtração, já que a primeira é a contribuição da corrente capacitiva e a segunda é

a contribuição da corrente faradaica e que contra o potencial da rampa linear, gerando um voltamograma de pulso diferencial, com a forma de uma curva gaussiana (SOUZA et al., 2003).

A sua aplicação tem maior destaque em medidas em níveis traço, podendo ser de espécies orgânicas e inorgânicas, e tem como base o degrau de potencial (Wang, 2000).

Na voltametria de pulso diferencial, no eletrodo de trabalho pulsos de amplitude fixos sobrepostos a uma rampa de potencial crescente são aplicados, sendo importante chamar a atenção para que a forma e os sinais de excitação captados dependem do tipo de aparelho utilizado (analógico ou digital). A diferença entre os equipamentos analógicos e digitais, é que nos analógicos há uma sobreposição de pulsos periódicos sobre uma rampa linear é verificada como mostrado na Figura 7a, enquanto em equipamentos digitais, há uma combinação de um pulso de saída com um sinal em degrau conforme mostrado na Figura 7b.

Figura 7 - (a) Perfil corrente-potencial esquemático para VPD e (b) representação esquemática da aplicação do potencial em função do tempo em VPD para instrumentos digitais, amostragem da corrente em S1 e S2, sendo registrada a diferença entre essas correntes.

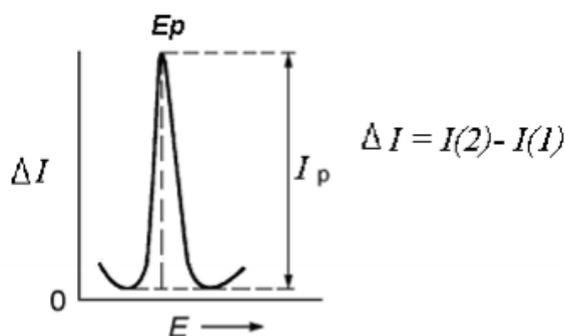


Fonte: Bard, 2001; Brett e Brett, 1996

Assim, a corrente é medida duas vezes, a primeira antes da aplicação do pulso (1) e a segunda ao final do pulso (2), sendo que o instrumento automaticamente subtrai primeira corrente da segunda. Em seguida, a diferença das

correntes é plotada em função do potencial aplicado, e o voltamograma resultante consiste de picos de corrente de forma gaussiana (Figura 10), cujas áreas são diretamente proporcionais à concentração do analito (BRETT & BRETT, 1996).

Figura 8 – Voltamograma de pulso diferencial de picos de corrente de forma gaussiana



Fonte: Skoog, 2005

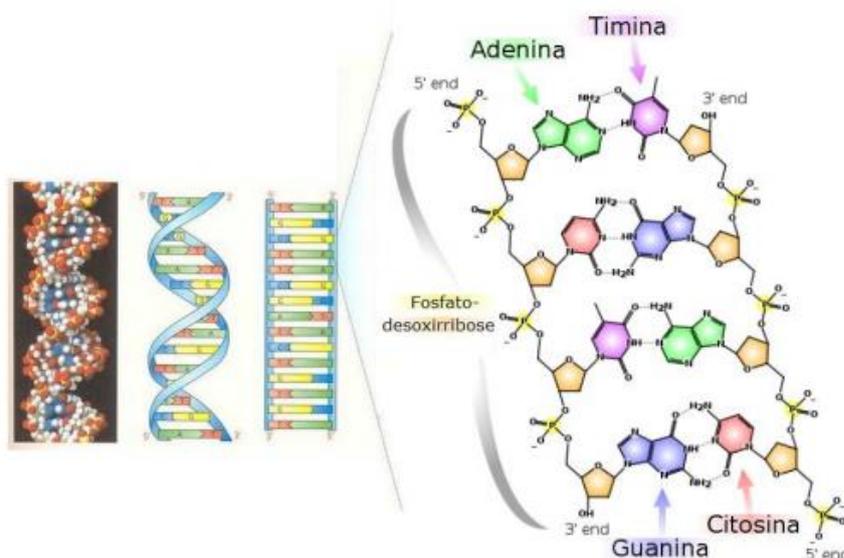
4.6.3 Biossensores de DNA

O DNA conforme pode ser visto na (

Figura 9) é uma macromolécula estruturalmente polimórfica, que pode adotar uma variedade de conformações, dependendo da sequência de nucleotídeos e/ou condições-ambientes. A estrutura de dupla hélice consiste de duas fitas, formadas por grupos fosfatos e pentoses ligadas alternadamente por uma ponte fosfodiéster (RAUF et al., 2005; BRETT & BRETT, 1996).

As duas cadeias da dupla fita estão associadas por ligações de hidrogênio entre as bases púricas (adenina e guanina) e pirimídicas (citosina e timina), formando assim, os nucleotídeos. Assim, cada nucleotídeo é formado por um grupo fosfato, um açúcar (desoxirribose) e uma das quatro bases nitrogenadas (RAUF et al., 2005; BRETT & BRETT, 1996).

Figura 9 - DNA em dupla fita (double-strand DNA) com representação detalhada do interior hidrofóbico do DNA destacando as fitas formadas pelos nucleotídeos interligados e suas respectivas bases.



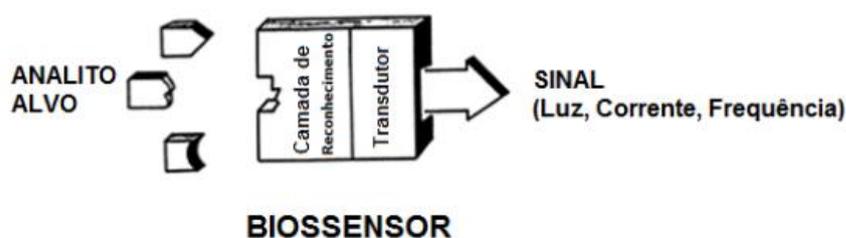
Fontes: Adaptado de <http://manipulacaodavida.blogspot.com> e <http://theuniversalmatrix.com/ptbr/artigos/?p=639>, acessado em 15/12/2018).

Esse estudo das interações dos diversos fármacos com o DNA é peça fundamental para o desenvolvimento racional de fármacos. O fármaco pode interagir com o DNA de três maneiras: através do controle de fatores de transcrição e polimerases, onde fármacos interagem com proteínas que se ligam ao DNA, por meio da ligação com RNA, que pode ocorrer com o DNA de dupla fita, formando uma tripla hélice, ou por expor uma fita simples de DNA, formando híbridos que podem interferir na atividade de transcrição e por meio da interação que consiste na ligação direta de moléculas pequenas a dupla hélice do DNA. Na interação há maior destaque de estudos eletroquímicos, pois as interações podem ser de natureza eletrostática devido às cargas negativas do açúcar-fosfato (RAUF et al., 2005; HELI et al., 2005).

Assim foram desenvolvidos biossensores eletroquímicos de DNA, para entender o mecanismo de ação biológica de fármacos, como as interações do DNA com moléculas pequenas ou íons, análises da sequência de genes entre outras coisas (BRETT; CHIORCEA, 2003).

Biossensor eletroquímico de DNA (Figura 10) é um dispositivo cujo elemento de reconhecimento biológico é o DNA fita dupla ou fita simples imobilizado sobre um transdutor eletroquímico, que permite mensurar processos onde ocorrem ligações específicas com o DNA (MOUSTY, 2004; BRETT; CHIORCEA, 2003). Biossensores são uma excelente alternativa, pois eliminam a necessidade de preparação da amostra permitindo aplicações analíticas *in situ* com medidas rápidas e relativo baixo-custo.

Figura 10 - Constituintes de um biossensor analítico

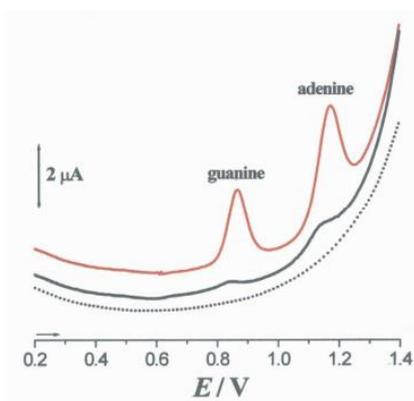


Fonte: Wang, 2000.

O processo de oxidação eletroquímica do DNA em eletrodo de carbono vítreo usando voltametria de pulso diferencial mostra dois picos de oxidação referente às bases guanina e adenina (

Figura 11). Em relação ao DNA fita simples, observa-se dificuldade de oxidação das bases referentes ao DNA fita dupla, o que se deve a maior flexibilidade dessa fita (DICULESCU et al., 2005).

Figura 11 - Voltamograma de pulso diferencial obtido com eletrodo de carbono vítreo modificado com DNA em solução de tampão acetato 0,1 M, pH 4,5: ciclo 1 voltamograma do ssDNA (linha vermelha) e dsDNA (linha preta) ciclo 40 voltamograma do dsDNA (linha pontilhada).



Fonte: Silva, 2010.

Os biossensores de DNA se destacam pela sua possibilidade de emprego tanto para obtenção de interações específicas de certos fármacos com algumas bases de DNA, como também para elucidar o mecanismo de interação (BRETT et al., 2002).

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Realizar estudos eletroquímicos dos derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos que apresentam potencial atividade farmacológica.

5.2 Objetivos Específicos

✓ Investigar o comportamento eletroquímico dos derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos em meio aquoso e não-aquoso, visando a obtenção de parâmetros eletroquímicos que possam ser correlacionados com atividades biológicas, em busca do entendimento do mecanismo de ação.

✓ Avaliar a interação dos derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos com β -ciclodextrina;

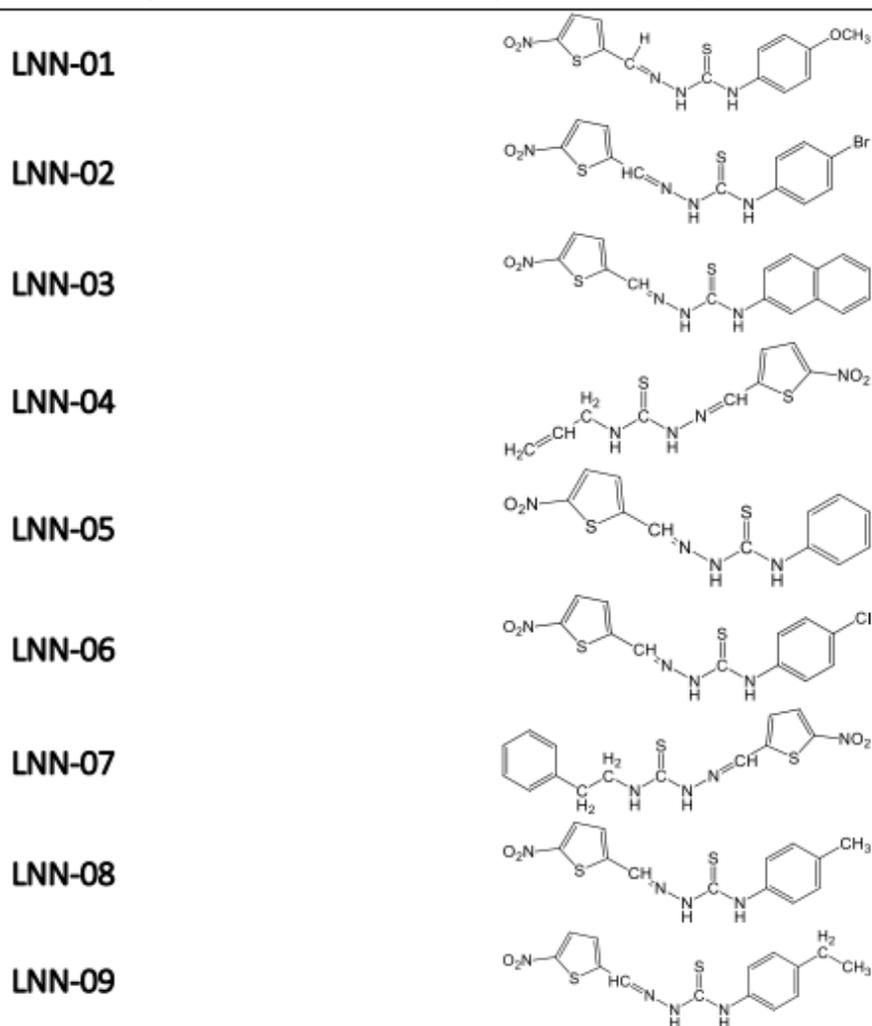
✓ Estudar a interação dos derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos com o DNA, fazendo-se do uso de biossensores com detecção eletroquímica.

6 METODOLOGIA

6.1 Reagentes e solventes

Os derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos LNN-01, LNN-02, LNN-03, LNN-04, LNN-05, LNN-06, LNN-07, LNN-08 e LNN-09 (Figura 3) foram sintetizados no Laboratório de Química em Inovação Terapêutica LQIT/UFPE e cordialmente cedidos pelo Professor Doutor Thiago de Mendonça Aquino do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas.

Tabela 3 - Estrutura química dos derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos.



Fonte: Adaptado Araújo Neto et al, 2017.

A β -ciclodextrina (β -CD) foi adquirida da Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). O ácido acético (CH_3COOH) foi obtido da Cromoline® (Diadema, Brasil). O acetato de sódio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$), hidróxido de sódio (NaOH), N,N-dimetilformamida (DMF), fosfato de sódio diidratado (Na_2HPO_4) e fosfato de sódio monoidratado (NaH_2PO_4) têm procedência da Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil). Ácido clorídrico (HCl) e o ácido ferrocenocarboxílico ($\text{Fc-CO}_2\text{H}$) foram obtidos da Alfa Aesar (Tewksbuty, MA, USA). Ácido 11-mercaptoendecanóico (MUA) foi obtido da Merck. Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas em água ultrapura ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) obtidos de um sistema de purificação Milli-Q da Millipore Inc.

6.2 Preparo das soluções

Para os estudos em meio aquoso, utilizou-se uma solução tampão fosfato preparada com fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e fosfato de sódio dibásico (NaH_2PO_4), na concentração de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 e força iônica de $0,222 \text{ mol L}^{-1}$.

A solução de tampão acetato foi preparada utilizando acetato de sódio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) e ácido acético (CH_3COOH), na concentração de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5 e força iônica de $0,100 \text{ mol L}^{-1}$. A verificação do pH das soluções tampão foram realizadas em pHmetro modelo Quimis Q400A.

A solução tampão usada nos estudos em biossensor de DNA foi preparada com água fervida ultrapura, para eliminação da possível presença de microorganismos que possam causar algum dano à molécula de DNA.

6.3 Estudo de estabilidade no UV-vis

O estudo de estabilidade foi realizada para todos os derivados 2-(5-nitrotiofeno)tiossemicarbazônicos (LNN1-9).

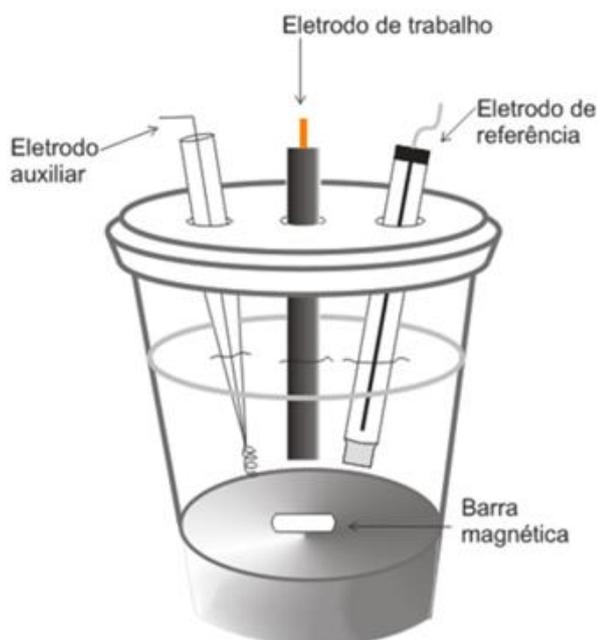
Uma solução estoque na concentração de $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em etanol PA foi preparada para cada amostra. Em seguida, uma alíquota de $250 \mu\text{L}$ dessa solução foi misturada com quantidades apropriadas de tampão fosfato para obter soluções na concentração de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de LNN1-9, a 20% de etanol. Os sistemas foram homogeneizados e alíquotas de 3 mL foram adicionadas em cubetas de quartzo ($10\text{mm}/3,5 \text{ mL}$) da Agilent® para análise no tempo 0, 10, 20, 30 e 60 minutos, sendo

o tempo zero considerado após homogeneização. Os valores de absorção foram medidos na faixa de comprimento de onda de 200 a 800 nm. Todas as análises foram realizadas em um espectrômetro Shimadzu Multispec-1501 UV-VIS, a 25 ± 1 °C.

6.4 Estudos eletroquímicos

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PGSTAT (AUT73222) da Autolab® em um sistema contendo três eletrodos (Figura 12). Utilizou-se o carbono vítreo (BAS, 3 mm de diâmetro, área $7,065 \text{ mm}^2$) ou eletrodo de ouro como eletrodo de trabalho; fio de platina, como eletrodo auxiliar e o sistema $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{Cl}^-$ (saturado) da BAS, como eletrodo de referência. As medidas foram realizadas à temperatura de 25 ± 1 °C. O tratamento posterior dos gráficos foi realizado através do programa Origin 8.0.

Figura 12 - Sistema com os três eletrodos para análises eletroquímicas.



Fonte: Autora, 2019

6.4.1 Limpeza padrão do eletrodo

O eletrodo de carbono vítreo foi submetido à limpeza mecânica de polimento com alumina ($0,3 \mu\text{m}$) e lavado abundantemente com água milliQ, em seguida foi

levado ao ultrassom por 30 s em etanol P.A. Após o procedimento de limpeza, foi realizado o teste com uma solução de ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$)/ ferrocianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$) $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, para verificar a área eletroativa dos eletrodos e a eficiência do polimento. Para isto utilizou-se uma faixa de potencial de -0,3 a 0,6 V e velocidade de 50 mV/s.

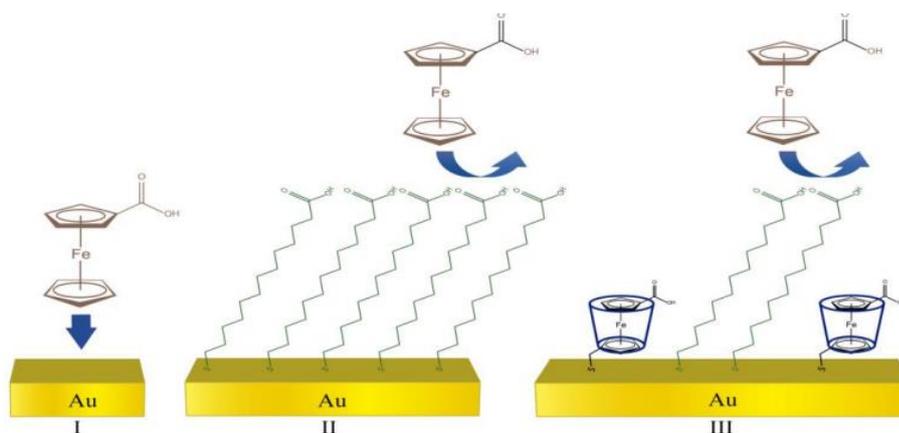
Já o eletrodo de fio de ouro por não possuir uma área plana foi submetido a uma limpeza química, onde o eletrodo foi exposto à chama azul de maçarico até o rubor, após uns segundos sob vapor de clorofórmio é imerso em clorofórmio, para evitar processo de oxidação do ouro.

6.4.2 Eletrodo de Ouro Modificado com SAM mista de β -CDSH + MUA

A metodologia utilizada no preparo da SAM a monocamada de β CDSH (

Figura 13) foi construído no eletrodo de ouro, que depois de limpo, o eletrodo foi introduzido em uma solução contendo β -CDSH:Fc-CO₂H:MUA (2:2:1 m/m/m) em uma mistura dos solventes DMSO:EtOH:H₂O (5:3:2 v/v/v). Inicialmente, o eletrodo foi imerso numa solução de β -CDSH dissolvida em DMSO, desaerada com N₂ sob agitação. Em seguida adicionou-se o Fc-CO₂H solubilizado em EtOH. O eletrodo permaneceu na solução por 1 hora para formação do complexo entre Fc-CO₂H e a cavidade da β -CDSH. Depois disso, a MUA e a água foram adicionadas, sendo novamente desaerada com N₂. O eletrodo permaneceu em repouso nessa solução por 24h. Antes dos experimentos voltamétricos os eletrodos foram lavados abundantemente com EtOH e água (FERREIRA et al., 2010).

Figura 13 - Representação esquemática da interação de ácido ferrocenocarboxílico em eletrodo de ouro: (I) eletrodo limpo; (II) modificado com monocamada de MUA; (III) modificado com monocamada mista de β -MUA/CDSH.



Fonte: Adaptado de Damos et al., 2007.

6.4.3 Estudo dos derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos em meio aprótico

No estudo em meio aprótico utilizou-se a solução de DMF + TBABF₄ (0,1 mol L⁻¹) como eletrólito suporte. A concentração final foi de 5,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ dos derivados de 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos LNN1, LNN3 ou LNN5, contido em uma célula eletroquímica. Em seguida, N₂ foi borbulhado na solução por ao menos 5 minutos para a retirada de oxigênio, mantendo o fluxo de gás acima da solução, durante as análises. As varreduras eletroquímicas, em VC, foram realizadas na faixa de potencial compreendida entre 1,2 a -0,4 V, utilizando a velocidade de varreduras de 50 mV s⁻¹.

6.4.4 Estudo em meio aprótico dos derivados 2-(5-nitrotiofeno)tiossemicarbazônicos em presença de oxigênio

Estudos eletroquímicos em meio aprótico (DMF + TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹) foram realizados em presença e ausência de oxigênio para averiguar a reatividade, após redução dos derivados de 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos LNN1, LNN3 ou

LNN5, frente a oxigênio. Analisaram-se os parâmetros eletroquímicos, como o potencial e corrente de pico para a primeira onda de redução. Cada componente foi adicionado ao eletrólito suporte e a solução foi desaerada com N₂ antes das medidas por voltametria cíclica. O oxigênio foi então borbulhado dentro da célula e sua concentração foi monitorada com oxímetro (Digimed DM-4). Voltamogramas cíclicos foram registrados em diferentes concentrações de oxigênio.

6.4.5 Perfil eletroquímico dos derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos em meio prótico

Os estudos eletroquímicos em meio prótico foram realizados em meio aquoso etanólico tamponado (30%), pH 7,0, para promover a melhor solubilização dos derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos LNN-01, LNN-02, LNN-03, LNN-04, LNN-05, LNN-06, LNN-07, LNN-08 e LNN-09. Carbono vítreo foi utilizado como eletrodo de trabalho e as varreduras eletroquímicas, em VC, foram realizadas na faixa de potencial compreendida entre 0,5 a -1,2 V, utilizando a velocidade de varreduras de 50 mV s⁻¹.

6.4.6 Estudo de interação dos derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos com DNA

6.4.6.1 ssDNA

Para o preparo da solução de ssDNA pelo método ácido-base, foi utilizado o dsDNA (1,5 mg) desnaturado pela adição de 1,0 mL de ácido clorídrico (0,1 mol L⁻¹) e aquecimento a 100 °C em banho-maria até solubilização. Em seguida, para neutralização do meio, foi adicionado 1,0 mL de solução de NaOH (0,1 mol L⁻¹), completando-se o volume para 10,0 mL com tampão acetato (pH 4,5), para finalização do procedimento. O eletrodo de carbono vítreo polido foi imerso em solução contendo a solução de ssDNA e submetido a varredura na região de 0 a +1,4 V usando a técnica de voltametria de pulso diferencial, no tempo 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos.

6.4.6.2 dsDNA

Para a produção do gel de dsDNA, fez-se necessário 15 mg de dsDNA em um Eppendorf com 2 mL de tampão acetato pH 4,5 para dissolver, em seguida foi colocado na geladeira por 24 h para homogeneização e evitar degradação pelo calor. Depois de transcorrido o tempo, foi aplicado 10 μL sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo que foi seco mediante fluxo de N_2 (biossensor de dsDNA) antes da realização dos experimentos.

O biossensor de dsDNA é imerso na solução de tampão acetato pH 4,5 e submetido a varredura na região de 0 a +1,2 V usando a técnica de voltametria de pulso diferencial. Simultaneamente, um outro eletrodo com filme de dsDNA foi imerso em uma solução contendo derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos LNN-01, LNN-05 ou LNN-06 na concentração de $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ onde permaneceu por 1h 15 minutos.

6.4.7 Estudos de interação dos derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos com $\beta\text{-CD}$

A interação dos derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos (LNN1, LNN5 e LNN6) com $\beta\text{-CD}$ foi realizada em experimentos de transferência de fase, em que massas correspondentes a 0,5 mmol L^{-1} de LNN1, LNN5 e LNN6 foram adicionadas à cela eletroquímica contendo tampão fosfato pH 7,0 em atmosfera inerte obtida por desaeração com nitrogênio. Após 15 minutos de agitação, a resposta eletroquímica foi registrada. Em seguida, foram adicionadas massas de $\beta\text{-CD}$ correspondentes às proporções (LNN: $\beta\text{-CD}$) de 1:0,5, 1:0,1, 1:1, 1:10, 1:50 sendo a solução agitada e desaerada, a cada adição de $\beta\text{-CD}$, por 15 minutos, para então ser realizada a medida eletroquímica. A interação e consequente formação de complexos de inclusão foram avaliadas através das mudanças observadas nos parâmetros eletroquímicos de potencial e corrente de pico, em cada procedimento.

6.4.8 Estudo de interação dos derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos com SAM mista de β -CDSH + MUA

O eletrodo de ouro modificado descrito no item 6.4.2 é imerso na solução aquosa etanólico tamponado (10%), pH 7,0. Posteriormente foi adicionado alíquotas de um estoque de etanol e derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos LNN1, LNN5 ou LNN6 onde permaceram sob agitação e desaerada com N_2 por 5 minutos antes de submetido a varredura na região de 1,2 a $-0,4$ V, utilizando a velocidade de varreduras de 50 mV s^{-1} usando a técnica de voltametria cíclica.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

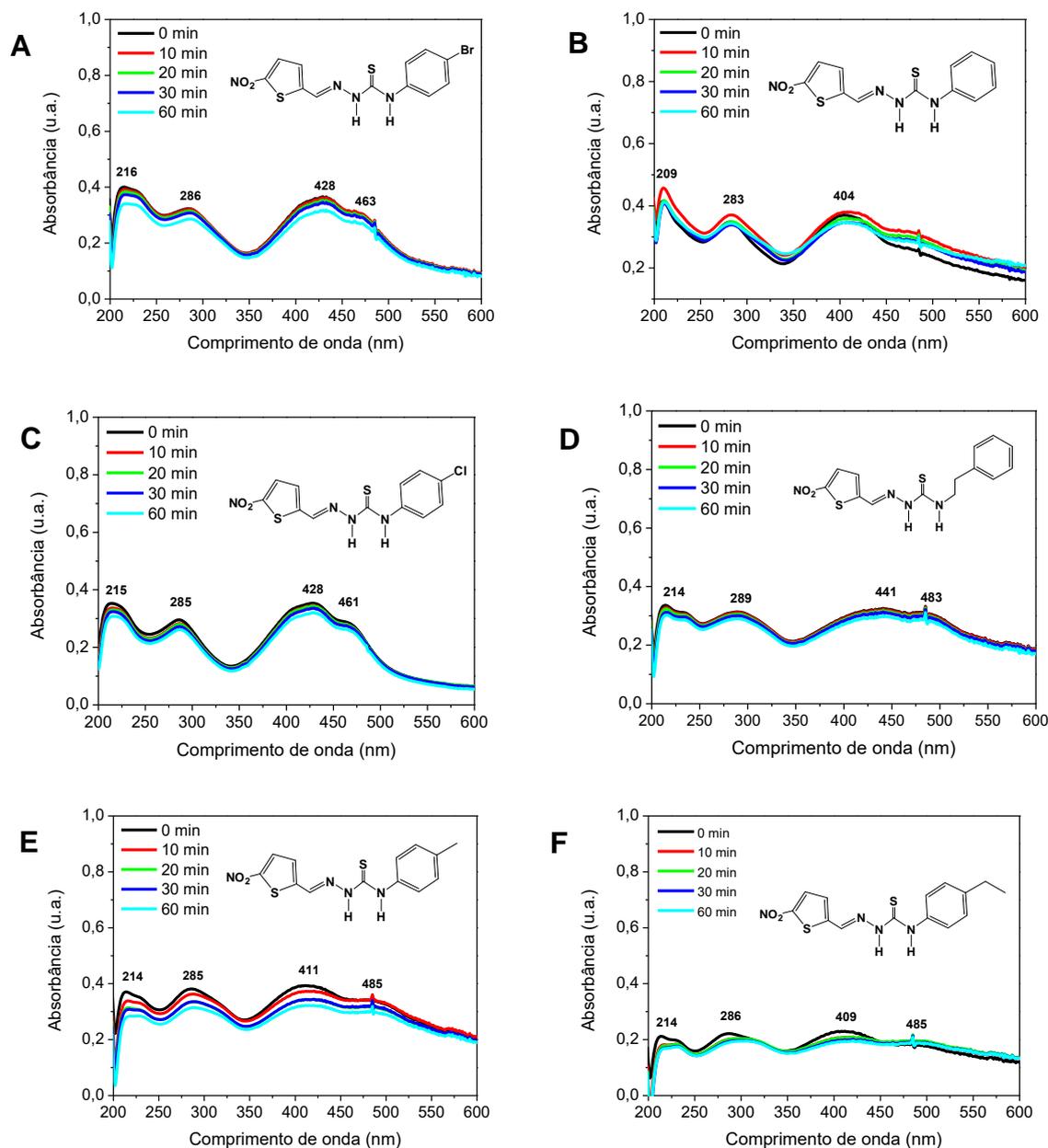
Com o propósito de descobrir as melhores atividades biológicas de novos moléculas, estão apresentados os resultados experimentais para os derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos LNN1, LNN2, LNN3, LNN4, LNN5, LNN6, LNN7, LNN8 e LNN9 na qual foram realizados estudos de estabilidade, estudo em meio prótico, estudos de encapsulação com β -CD onde foi avaliado a interação dos derivados LNN1, LNN5 e LNN6 com β -CD em solução e em eletrodo de ouro modificado com a formação da SAM de β -CDSH + MUA. Bem como estudo em meio aprótico na presença e ausência de oxigênio.

7.1 Estudo de estabilidade

A proposta do estudo de estabilidade foi fornecer evidências que durante os experimentos eletroquímicos a qualidade da substância ativa não variasse por meio de uma possível degradação com o tempo, que pode ter influência de uma variedade de prováveis fatores ambientais, tais como temperatura, umidade presença de oxigênio e luz. Para tal, os derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos foram estudados em tampão fosfato pH 7,0 contendo 10% de etanol utilizando a espectroscopia no UV-Vis.

Na Figura 14 mostra os espectros de UV-Vis obtido para o LNN2, LNN5, LNN6, LNN7, LNN8 e LNN9. Na qual apresentaram quatro bandas principais de absorção com máximo aproximado em 216, 286 , 428 e 463 nm para o LNN2 (Figura 14A), quatro bandas de absorção com máximo aproximado em 209, 283, 404 e 474 nm para o LNN5 (Figura 14B), quatro bandas de absorção com máximo aproximado em 215, 285, 428 e 461 nm para o LNN6 (Figura 14C), quatro bandas de absorção com máximo aproximado em 214, 289, 441 e 483 nm para o LNN7 (Figura14D), quatro bandas de absorção com máximo aproximado em 214, 285, 411 e 485 nm para o LNN8 (Figura 14E) e quatro bandas de absorção com máximo aproximado em 214, 286, 409 e 485 nm para o LNN9 (Figura 14F). Todos esses derivados apresentaram comportamento semelhates, com um discreto decrescimo de absorbância, provavelmente causado pela baixa solubilidade.

Figura 14 – Espectros de absorção na região do Uv-Vis dos derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos (1×10^{-5} mol L⁻¹) em tampão fosfato pH 7,03 contendo 10% de etanol, em função do tempo. A) LNN2; B) LNN5; C) LNN6; D) LNN7; E)LNN8 e F)LNN9

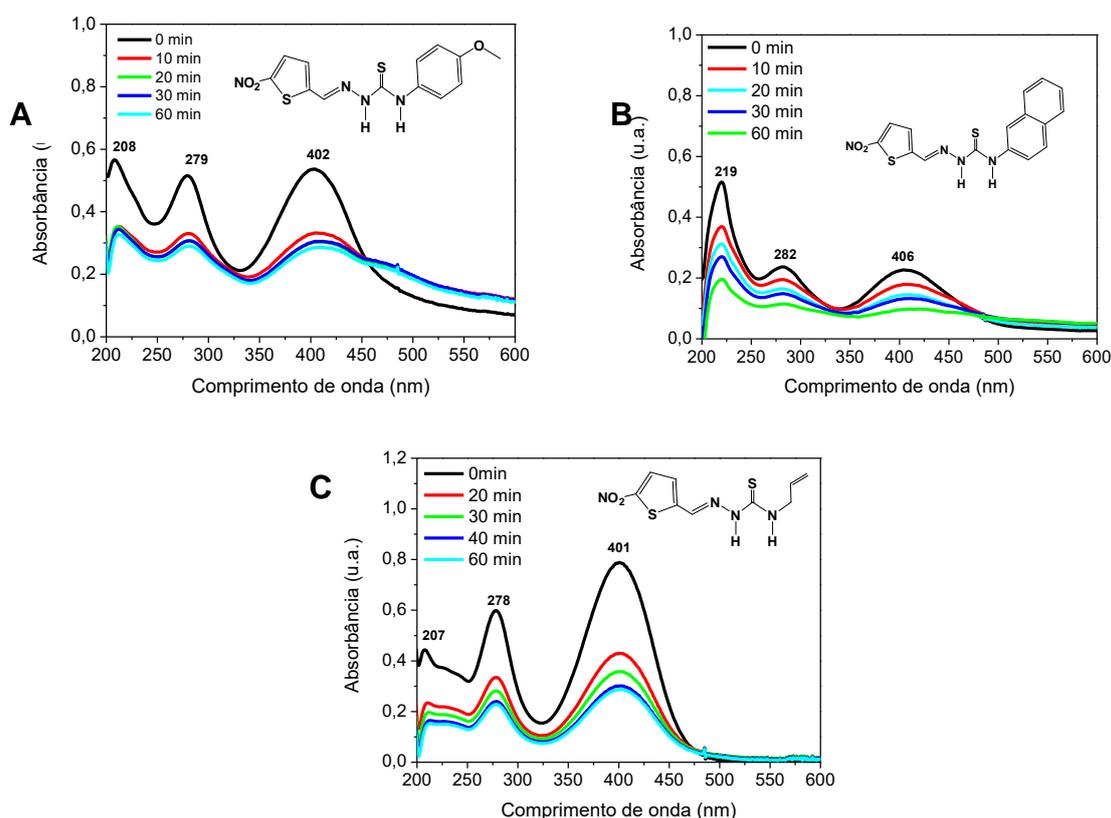


Fonte: Autora, 2019.

Nos espectros de UV-Vis para o LNN1, LNN3 e LNN4 mostrado na Figura 15, onde apresentou três bandas de absorção com máximo em 208, 279 e 402 nm para o LNN1 (Figura 15A), três ondas de absorção com máximo aproximado em 219, 282 e 406 nm para o LNN3 (Figura 15B) e 3 bandas de absorção com máximo aproximado em 207, 278 e 401 nm para o LNN4 (Figura 15C). Esses três derivados apresentaram maiores decréscimos na absorbância em função de tempo,

provavelmente decorrente a baixa solubilidade, já que foi possível visualizar um sobrenadante na solução.

Figura 15 - Espectros de absorção na região do Uv-Vis dos derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos (1×10^{-5} mol L⁻¹) em tampão fosfato pH 7,03 contendo 10% de etanol, em função do tempo. A) LNN1; B) LNN5 e C) LNN6.



Fonte: Autora, 2019.

Todos os materiais apresentaram absorções nas regiões de 208 a aproximadamente 300 nm que correspondem a grupos cromóforos simples tipicamente conjugados de NO₂, e de heteroátomo devido a transição $n \rightarrow \pi^*$.

Os derivados LNN2, LNN5, LNN6, LNN7, LNN8 e LNN9 apresentaram os menores decréscimos na absorbância, diferente dos compostos LNN1, LNN3, e LNN4 que apresentaram as maiores variações, apesar da baixa solubilidade é importante ressaltar que todos os derivados apresentam-se estáveis nas condições avaliadas. Diante disso os estudos em meio prático foram realizados com maiores concentrações de etanol.

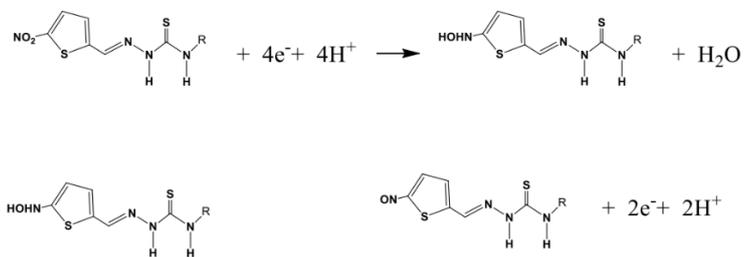
7.2 Perfil voltamétrico em meio prótico SILVA

A voltametria cíclica é uma técnica experimentalmente simples e precisa para auxiliar na elucidação do mecanismo de ação de fármacos ou até mesmo pode colaborar no planejamento de compostos biologicamente ativos. É uma das principais técnicas utilizadas no estudo eletroquímico de uma infinidade de compostos, dentre eles, podemos destacar os nitrocompostos (et al., 2017)

Estudos eletroquímicos em meio prótico foram realizados em meio aquoso etanólico tamponado (30%), pH 7,0, para promover a melhor solubilização dos derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos, LNN1 LNN2, LNN3, LNN4, LNN5, LNN6, LNN7, LNN8 e LNN9. Já que, a baixa solubilidade em água é característica comum a alguns nitrocompostos (SILVA et al., 2017; LIU et al. 2013; PÉREZ-CRUZ et al., 2009).

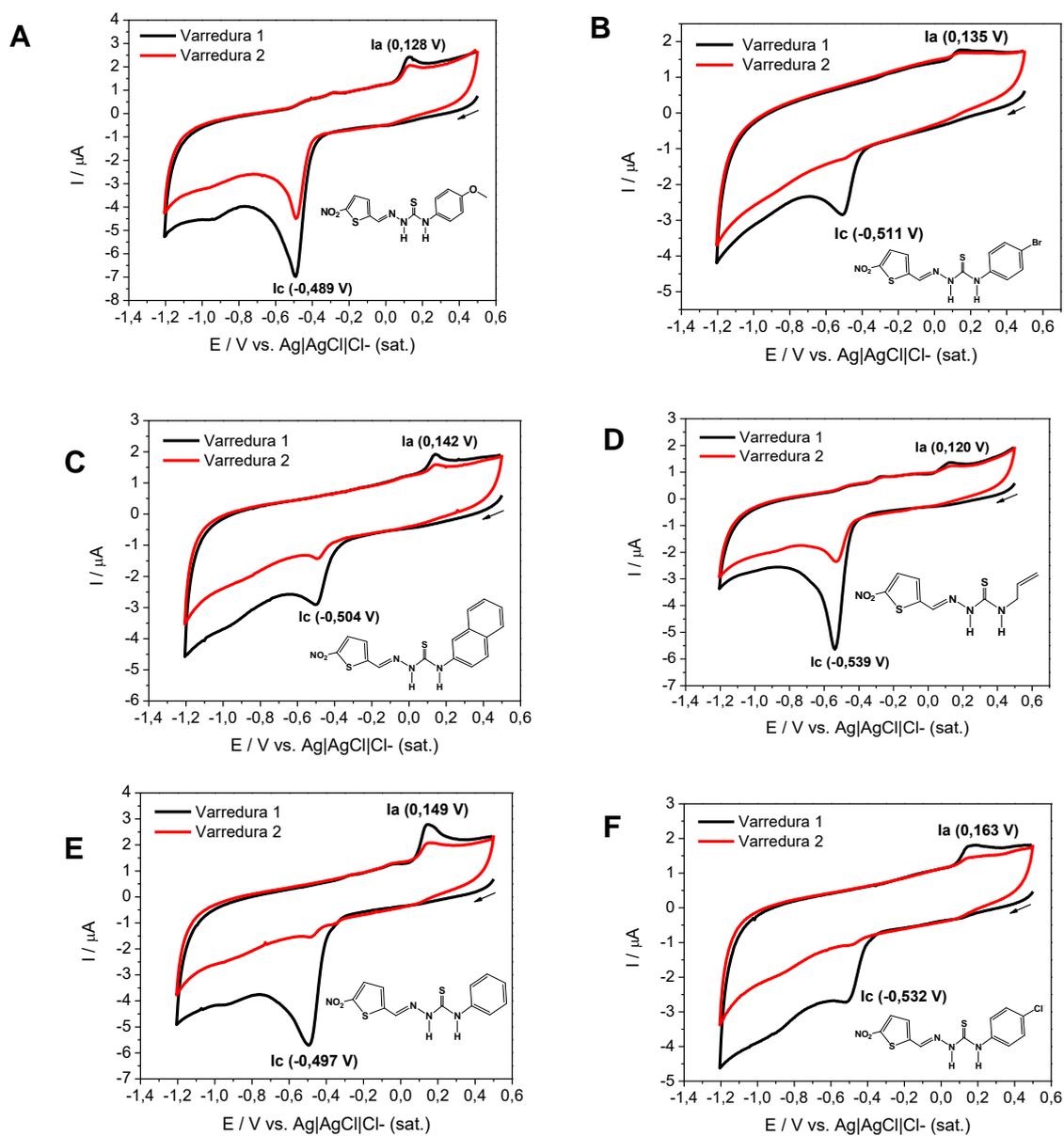
Nas Figuras 17 e 18 estão representados os estudos por voltametria cíclica em meio aquoso-etanólico relacionados aos derivados da 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos (LNN1-9). Na ausência de oxigênio, para todos os compostos, evidenciaram a presença de pico de redução bem definido, com Epc de -0,489, -0,511, -0,504, -0,539, -0,497, -0,532, -0,532, -0,553 e -0,546 V, respectivamente, referente a redução do grupo nitro – que é um processo envolvendo o consumo de quatro elétrons e quatro prótons – e pico de oxidação em Epa de 0,128, 0,135, 0,142, 0,120, 0,149, 0,163, 0,114, 0,156 e 0,121 V, respectivamente, referente a oxidação da hidroxilamina que em varredura anódica é oxidada ao derivado nitroso de caráter reversível (Figura 16).

Figura 16 – Reações de oxirredução dos derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos.



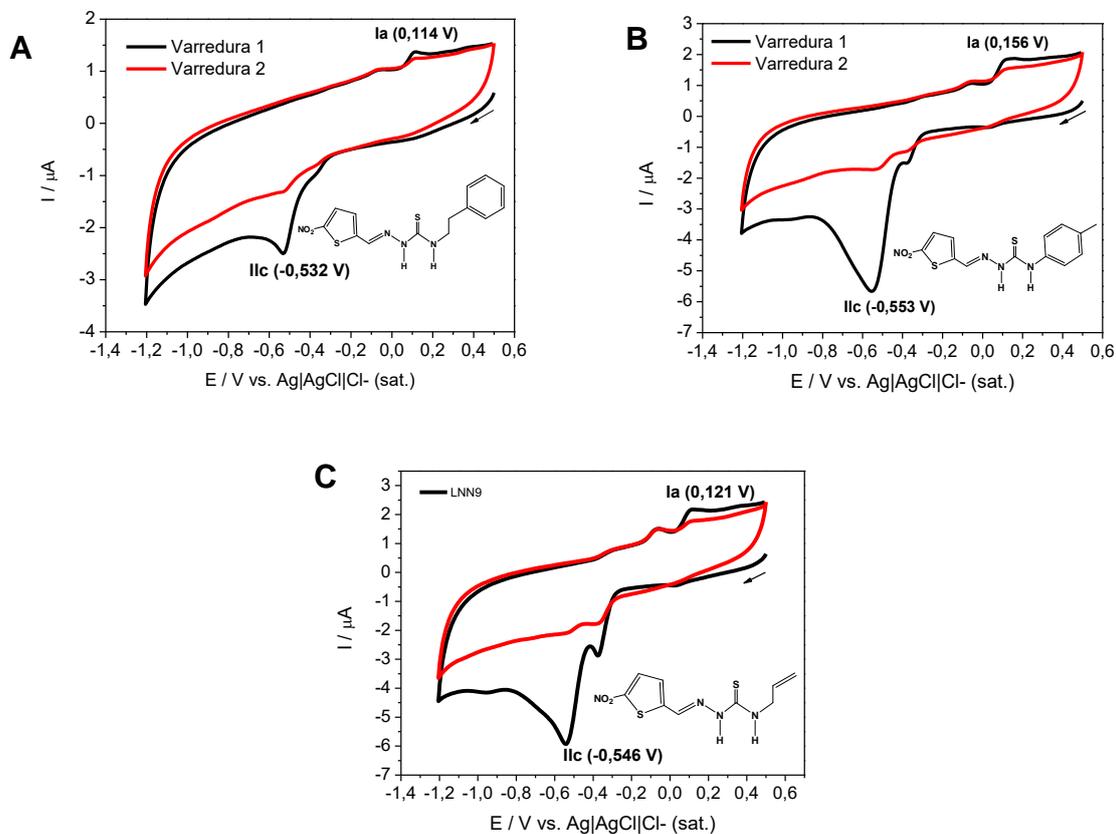
Fonte: Autora, 2019.

Figura 17 - Voltametria cíclica dos derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos ($5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em meio prótico tamponado (etanol + tampão fosfato: 3:7, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), carbono vítreo (área = $7,065 \text{ mm}^2$) e $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$. A) LNN1; B) LNN2; C) LNN3; D) LNN4; E) LNN5 e F) LNN6



Fonte: Autora, 2019

Figura 18 - Voltametria cíclica dos derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos (5×10^{-4} mol L⁻¹) em meio prótico tamponado (etanol + tampão fosfato: 3:7, 0,1 mol L⁻¹), carbono vítreo (área = 7,065 mm²) e $v = 0,050$ V s⁻¹. A) LNN7; B) LNN8 e C) LNN9.

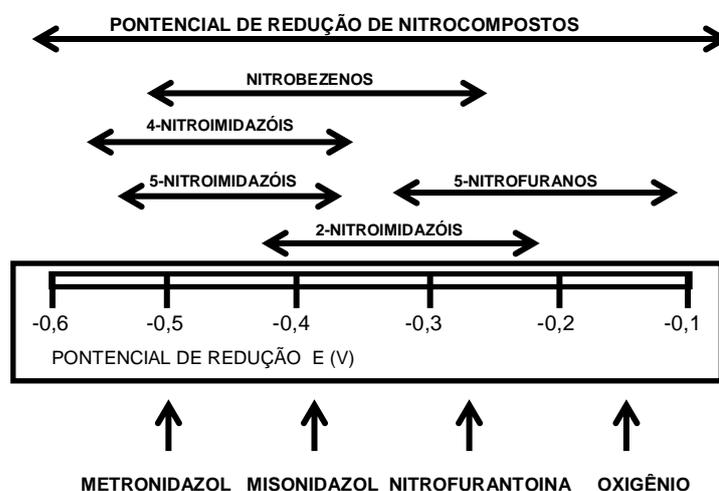


Fonte: Autora, 2019

Apesar dos diferentes substituintes na estrutura dos derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos os valores de potenciais apresentaram-se próximos, com uma variação de 0,057 V. Sendo os derivados LNN1 e LNN2 os que apresentaram os potenciais mais próximos de zero.

A diferença de potencial de redução entre os diversos nitrocompostos resulta numa base importante para o entendimento da toxicidade seletiva para os microrganismos. Adicionalmente, a ativação redutiva em anaeróbios somente é possível em intervalo limitado de potencial de certos sistemas enzimáticos, o que comprova a seletividade de alguns compostos (Figura 19) (PAULAI; SERRANO; TAVARES, 2009).

Figura 19 - Intervalo de variação do potencial de redução dos nitrocompostos e do oxigênio.



Fonte: Adaptado de Tavares et al., 1999.

Devido a baixa solubilidade das amostras, mesmo em meio misto etanólico, os estudos mais detalhados como a variação da velocidade de varredura, para determinar qual o processo envolvido na dupla camada eletrônica (difusão ou adsorção) ficou impossibilitado. Na continuidade dos estudos, para minimizar ou solucionar a baixa solubilidade, utilizou-se a um carreador que apresenta uma característica de formar complexos de inclusão e/ou entre interações.

7.2.1 Estudos de encapsulação com β -CD

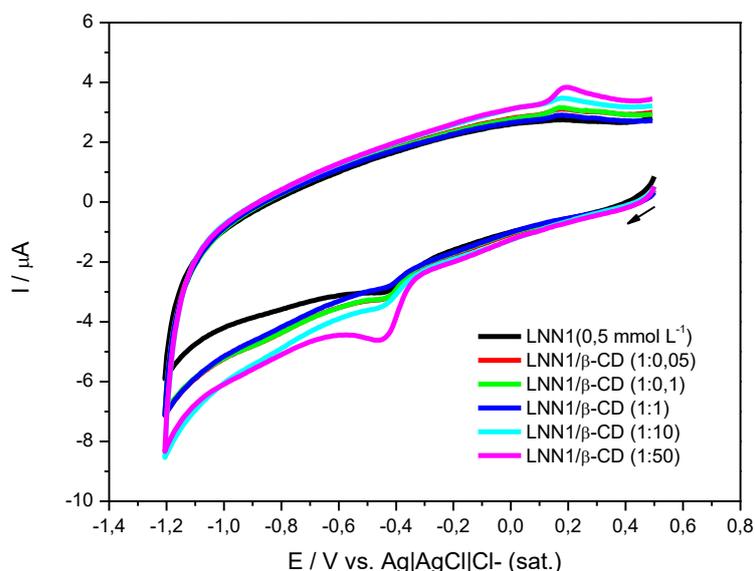
7.2.1.1 Avaliação da interação de 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos com β -CD em solução

A β -ciclodextrina (β -CD) apresenta uma importante propriedade de formação de complexos por inclusão com moléculas orgânicas, sendo então estudada sua capacidade de encapsular os derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos (LNN1, LNN5 e LNN6) em meio tamponado, pH 7,0, para aumentar a solubilidade dos mesmos.

Na Figura 20 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para LNN1 em eletrodo de carbono vítreo, na ausência e presença de β -CD sólida, ambos em solução. O comportamento eletroquímico (voltametria cíclica, VC) de LNN1 mostrou

uma onda de redução e oxidação em $E_{p_c} = -0,43$ e $E_{p_a} +0,18$ V vs. Ag|AgCl|Cl⁻ (sat.). Observa-se um aumento na corrente de pico quando se introduz β -CD, como também um deslocamento de potencial de pico para valores maiores que a amostra sozinha; este comportamento está relacionado inicialmente, ao aumento da solubilidade da LNN1 no meio. Quando se aumenta a concentração de β -CD para um valor 1:1, observa-se uma diminuição na corrente de pico, ocasionado pelo encapsulamento de LNN1 na cavidade da β -CD e conseqüentemente, o desfavorecimento do processo de oxi-redução.

Figura 20 - Voltamogramas cíclicos do LNN1 em eletrodo de carbono vítreo e adição de β -CD sólida em diferentes concentrações.

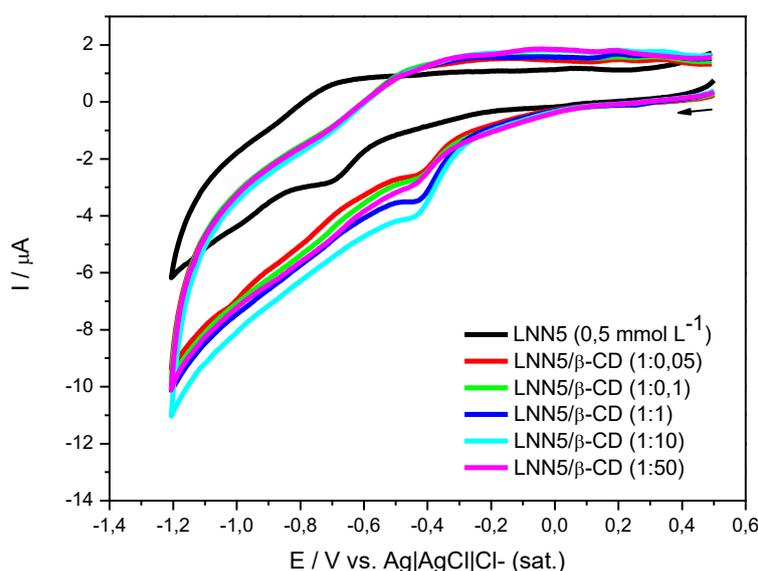


Fonte: Autora, 2019

Na Figura 21 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para LNN5 em eletrodo de carbono vítreo, na ausência e presença de β -CD sólida, ambos em solução. O comportamento eletroquímico de LNN5 mostrou uma onda de redução e oxidação em $E_{p_c} = -0,43$ e $E_{p_a} +0,19$ V vs. Ag|AgCl|Cl⁻ (sat.). Observa-se um aumento na corrente de pico quando se introduz β -CD, como também um deslocamento de potencial de pico favoráveis a redução; este comportamento está relacionado, inicialmente, ao aumento da solubilidade da LNN5 no meio. Quando se aumenta a concentração de β -CD para um valor 1:50, observa-se uma diminuição na corrente de pico, ocasionado pelo encapsulamento de LNN5 na cavidade da

β -CD e conseqüentemente o desfavorecimento do processo de oxi-redução. Diferente do derivado anterior (LNN1) este comportamento é indicativo de uma proporção de encapsulamento maior, levando em consideração que o equilíbrio de encapsulação é dinâmico a proporção 1:10 deveria apresentar uma corrente menor, porém esse efeito só foi observado do 1:50.

Figura 21 - Voltamogramas cíclicos do LNN5 em eletrodo de carbono vítreo e adição de β -CD sólida em diferentes concentrações.

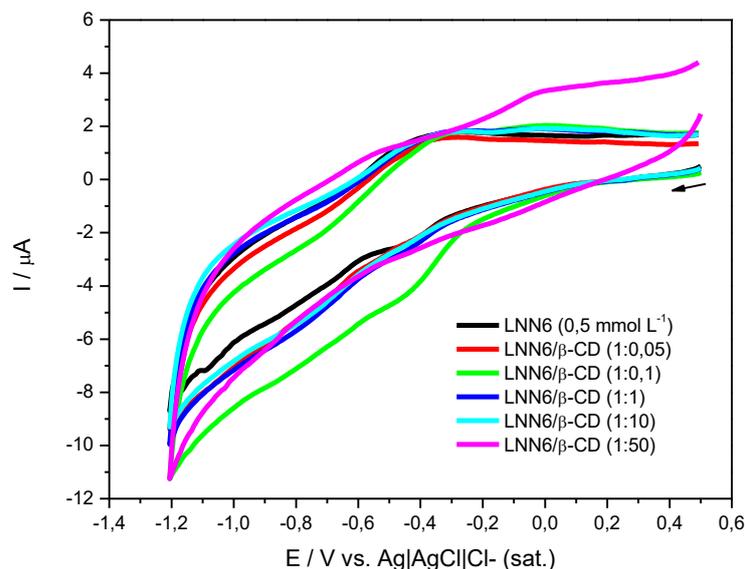


Fonte: Autora, 2019

Já para

Figura 22 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para LNN6 em eletrodo de carbono vítreo, na ausência e presença de β -CD sólida, ambos em solução. O comportamento eletroquímico do LNN6 mostrou baixa interação com a β -CD, onde a mudança mais perceptível esta para proporção 1:0,1, ou seja a baixa concentração do agente encapsulante. De modo que em concentrações maiores não há a presença da onda de redução em -0,4V, sendo esta, presente apenas na proporção citada acima.

Figura 22 - Voltamogramas cíclicos do LNN6 em eletrodo de carbono vítreo e adição de β -CD sólida em diferentes concentrações.



Fonte: Autora, 2019

No estudo realizado por Silva *et al.* (2017) onde utiliza o composto 2-[(4-nitrofenil)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-4Hbenzo[b]tiofeno-3-carbonitrila, observaram picos de redução da substância, com adições definidas de β -ciclodextrina, também no estado sólido, segundo os autores esse comportamento demonstra um processo de transferência de fase, que foi observado pela mudança de cor da solução, sugerindo a interação do composto com β -ciclodextrina.

Liu *et al.* (2013) e Pérez-Cruz *et al.* (2009) avaliaram a capacidade das β -CDs de encapsular nitrocompostos e sugeriram o processo de interação, onde houve o deslocamento do pico de redução do grupo nitro para potenciais mais negativos, pois a β -CD dificulta o processo de redução.

Observa-se um deslocamento de pico na presença β -CD, esse é atribuído à mudança no ambiente do grupo nitro quando inserido dentro da cavidade β -CD, levando a estabilização da porção nitro e tornando-o mais difícil sua redução, isso se deve provavelmente a perda da reversibilidade do composto, uma vez na cavidade da β -CD o comportamento eletroquímico de oxidação do nitro é dificultado

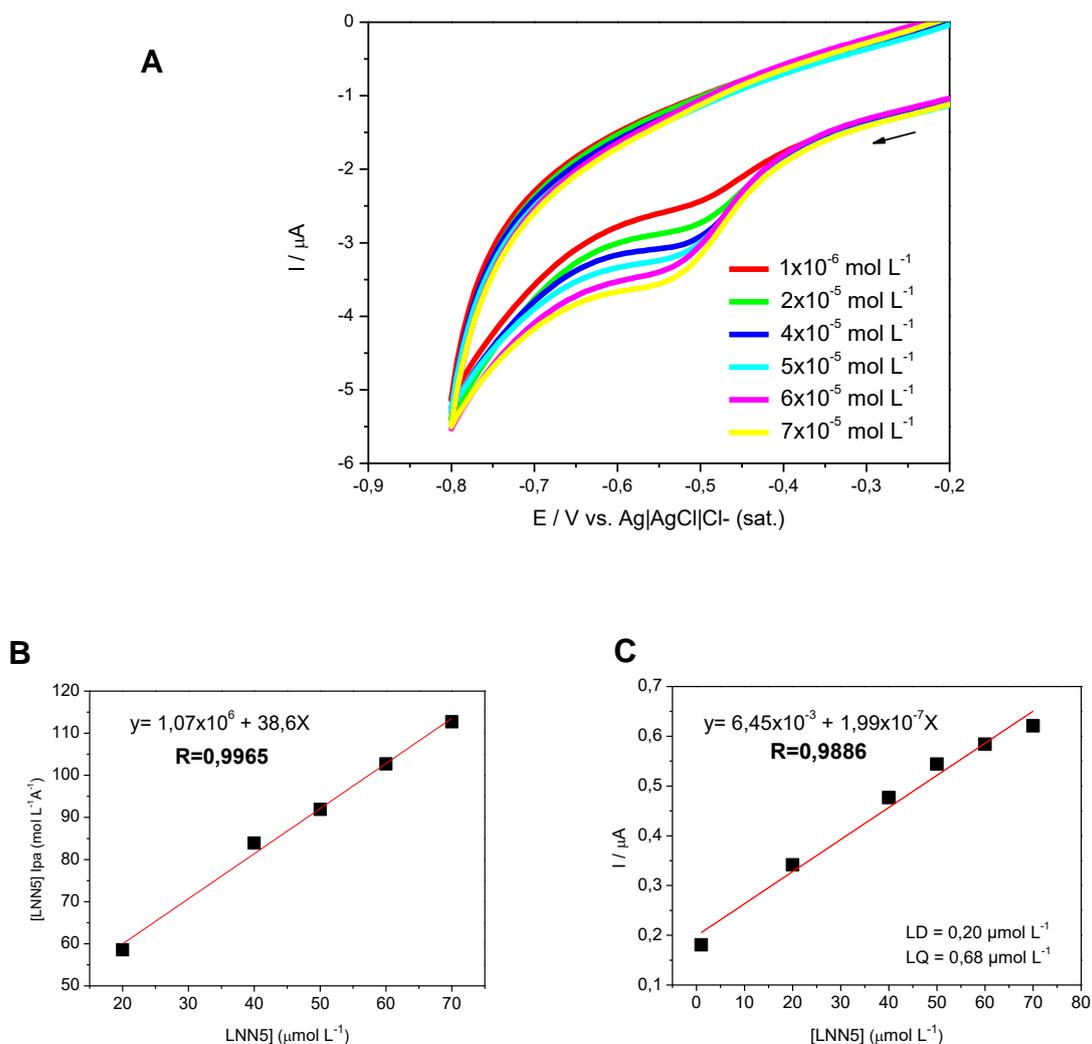
(SRINIVASAN; STALIN; SIVAKUMAR; 2012) uma vez que seu produto da redução passa a ser mais estável no interior da β -CD.

Avaliando a interação dos derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos LNN1, LNN5 e LNN6 com β -CD em solução, observamos que o derivado LNN5 apresentou um melhor perfil eletroquímico em presença do agente encapsulante, no entanto, não foi possível construir uma curva analítica. Desta forma, foi realizada a modificação na superfície do eletrodo de ouro, com uma SAM mista de MUA e β -CDSH.

4.2.2 Eletrodo de ouro modificado com a formação da SAM de β -CDSH + MUA

A Figura 23 mostra os voltamogramas obtidos por VC do complexo de interação LNN5: β -CH+MUA, para a faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-6}$ a $7,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de LNN5. Pode-se observar um aumento na I_p em função do aumento da concentração do analito, com deslocamento de potencial de pico catódico para valores mais negativos.

Figura 23 – A) Voltamogramas em tampão fosfato pH 7,0 em crescentes concentrações de LNN5 ($1,0 \times 10^{-5}$ a $9,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) em eletrodo modificado com β -CDSH+MUA; B) Regressão linear dos valores de [LNN5]/I_{pa} vs [LNN5] para determinar K; C) curva analítica de [LNN5] vs I_{pa}, para determinar LD e LQ.



Fo

nte: Autora, 2019.

A formação do complexo leva a um aumento da solubilidade do 2-(5-nitrotiofeno)tiossemicarbazônicos (LNN5) com ciclodextrina e a camada mista não promove a supressão do processo redox do composto de estudo (BOLLO et al., 2003; DAMOS et al., 2007).

7.2.2 Estudo de interação com DNA

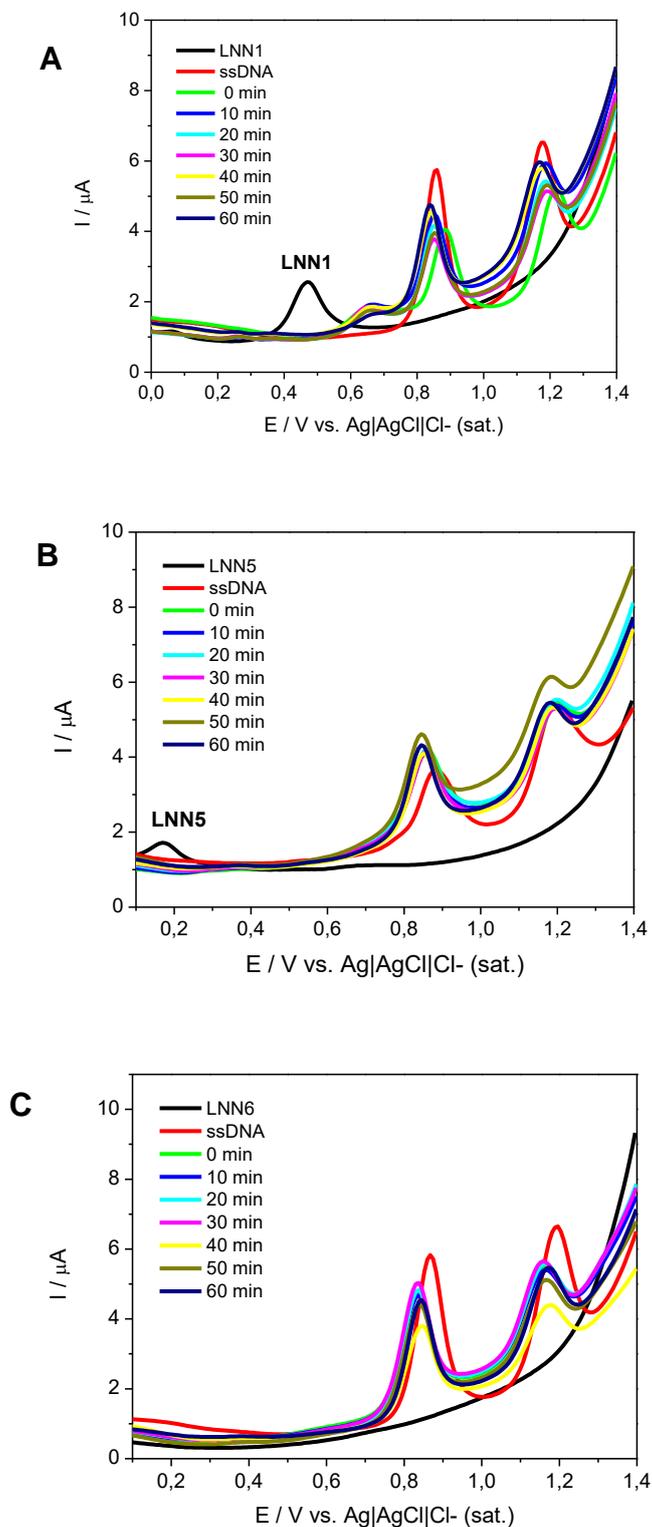
A guanina e adenina são as principais bases do DNA a serem oxidadas em meio ácido, pH 4,5, utilizando-se eletrodos de carbono vítreo. O dsDNA e ssDNA, apresentam comportamento eletroquímico distintos, devido à disponibilidade das bases para a oxidação, já que o ssDNA se encontra em uma forma flexível, desta forma, suas bases estão mais suscetíveis a processos de oxidação e, portanto, apresenta correntes de pico de alta intensidade em relação ao dsDNA que apresenta uma estrutura rígida devido às ligações hidrogênio formadas entre suas bases. Deste modo, os derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos foram estudados em presença de ssDNA e biossensor de dsDNA.

7.2.2.1 ssDNA

Nos estudos de interação dos compostos com a solução de ssDNA (Figura 24) antes da adição do analito, os sinais associados à oxidação das bases guanina (G) e adenina (A) no ssDNA se mostraram intensos e bem definidos nos respectivos potenciais de + 0,86 e +1,18 V.

Com a adição do LNN1, LNN5 e LNN6 (Figura 24A, B e C) ao passar do tempo foi observado a diminuição da intensidade de corrente de oxidação de ambas as bases adenina e guanina, principalmente para os derivados LNN1 e LNN6. No entanto, este ssDNA não apresenta um comportamento eletroquímico adequado, visto que com o passar do tempo, ocorre diminuição e deslocamento do potencial de pico anódico correspondente às bases guanina e adenina, sugerindo um reanelamento das simples fitas. Em seguida, ocorre um aumento do potencial de pico e deslocamento em sentido catódico. Este comportamento pode levar a uma análise de interação substância/DNA falsopositiva.

Figura 24 - Voltametria de Pulso Diferencial de $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$ de DNA e A) LNN1 B) LNN5 e C) LNN6 em tampão acetato pH = 4,5, após tratamento térmico (60 min) em função de tempo, em um eletrodo de carbono vítreo. Amplitude de pulso 50 mV; largura de pulso 70 ms; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.



Quando uma substância interage com essas bases expostas, é observado uma menor intensidade de corrente (LA-SCALEA, SERRANO; GUTZ, 1998; DICULESCU, PAQUIM; BRETT, 2005; DE MOURA, 2008; DE SOUZA, 2011)

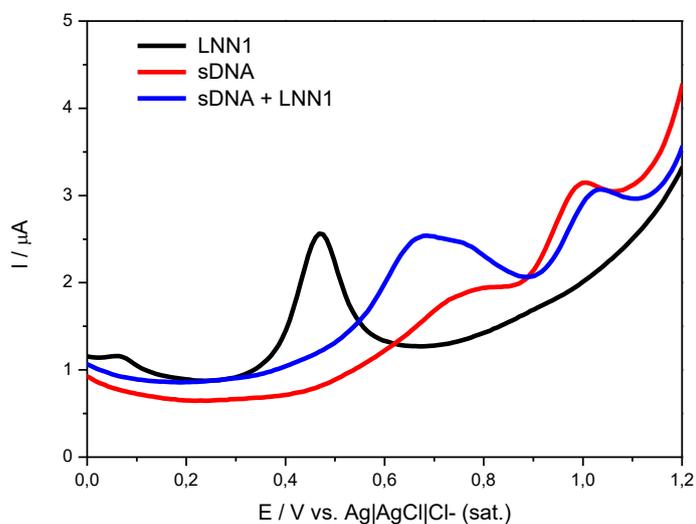
7.2.2.2 dsDNA

O 5-nitro-tiofeno-tiossemicarbazônicos é uma substância de interesse biológico, que além da atividade antioxidante, apresenta efeitos genotóxico, e neste trabalho, o biossensor eletroquímico de DNA foi utilizado para observar a interação deste nitrocomposto com DNA.

Nas Figuras 25, 26 e 27, estão representados os voltamogramas de pulso diferencial do biossensor de dsDNA, na região anódica e quando em presença de 5-nitro-tiofeno-tiossemicarbazônicos é possível observar que o dsDNA apresenta picos de oxidação, apesar da rigidez da dupla fita de DNA, e ser esperado a não observação destes picos de oxidação para o dsDNA, este comportamento, pode estar relacionado a modificações na conformação ou reorientação da dupla fita durante imobilização na superfície do eletrodo ou mesmo degradação (LA-SCALEA, SERRANO; GUTZ, 1998; DICULESCU, PAQUIM; BRETT, 2005).

Como mostra a figura 25 o derivado LNN1 sofre processo de oxidação em potencial anterior às bases do DNA. Pode-se observar que a varredura anódica do biossensor de dsDNA após 10 min em contato com o LNN1 apresentou mudança no comportamento voltamétrico do dsDNA, com aumento de intensidade de corrente em presença do LNN1 principalmente para a guanina.

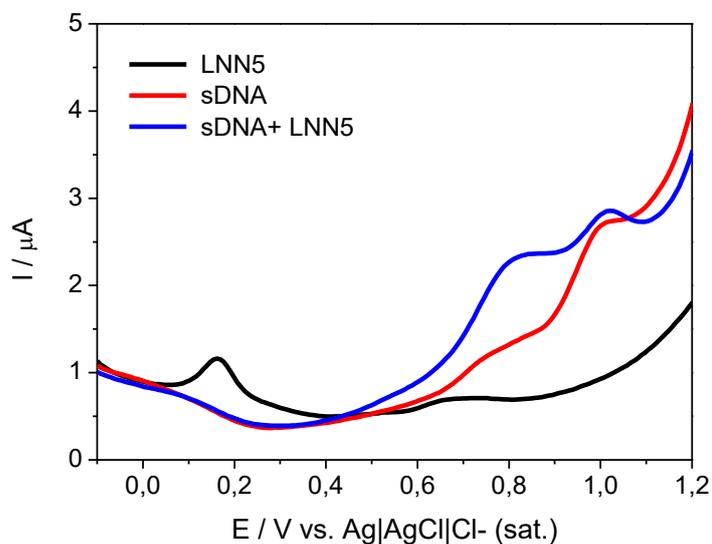
Figura 25 - Voltamograma de pulso diferencial de biossensor de dsDNA em ausência e presença de 5×10^{-5} mol L⁻¹ de LNN1.



Fonte: Autora, 2019.

Já na figura 26 o derivado LNN5 também sofre processo de oxidação em potencial anterior às bases do DNA. Observando-se que a varredura anódica do biossensor de dsDNA após 10 min em contato com o LNN5 apresentou mudança no comportamento voltamétrico do dsDNA, parecido com o LNN1, com aumento de intensidade de corrente principalmente para a guanina.

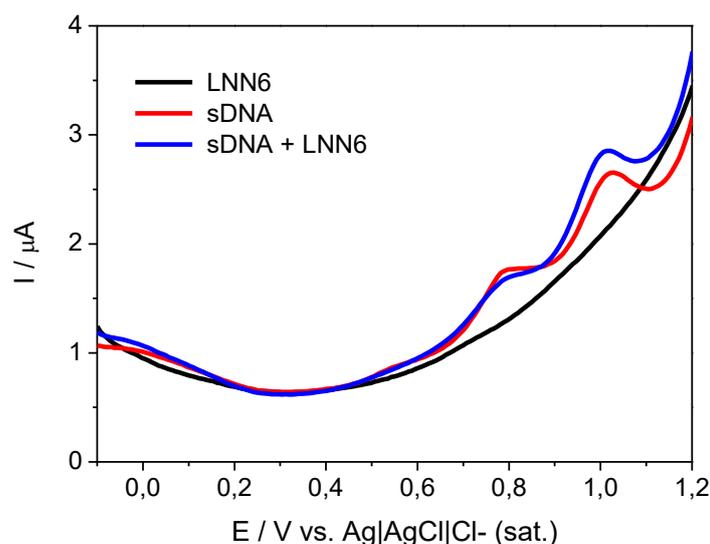
Figura 26 - Voltamograma de pulso diferencial de biossensor de dsDNA em ausência e presença de 5×10^{-4} mol L⁻¹ de LNN5.



Fonte: Autora, 2019.

No entanto, para o derivado LNN6 que não sofre processo de oxidação no potencial estudado. Observando-se que a varredura anódica do biossensor de dsDNA após 10 min em contato com o LNN5 apresentou mudança no comportamento voltamétrico do dsDNA, com um leve aumento de intensidade de corrente no potencial de aproximadamente 1,02 V.

Figura 27 - Voltamograma de pulso diferencial de biossensor de dsDNA em ausência e presença de 5×10^{-4} mol L $^{-1}$ de LNN6.



Fonte: Autora, 2019.

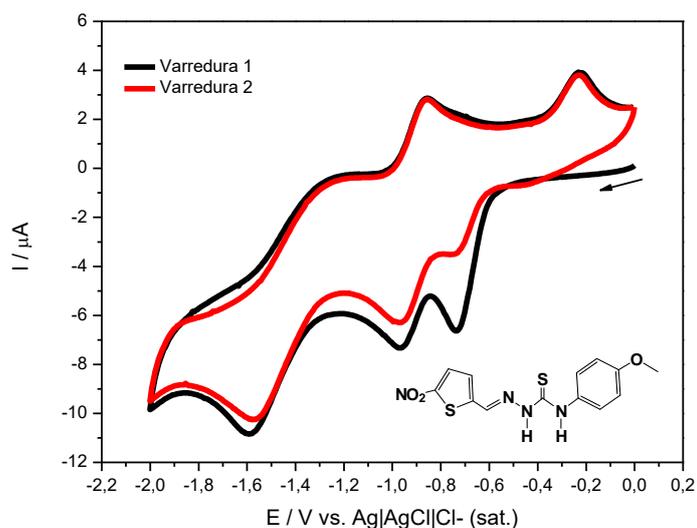
Quando porventura, ocorre interação de substâncias com o dsDNA, as bases são expostas à superfície do eletrodo e, tornam-se passíveis de oxidação, apresentando desta forma, maiores intensidades de corrente (LA-SCALEA, SERRANO; GUTZ, 1998; DICULESCU, PAQUIM; BRETT, 2005; DE MOURA, 2008; DE SOUZA, 2011). A partir dos resultados apresentados a uma provável interação dos derivados LNN1, LNN5 e LNN6 com o dsDNA. os que apresentaram melhores interações.

7.3 Perfil voltamétrico dos derivados em meio aprótico

Estudos eletroquímicos dos derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos LNN1, LNN5 e LNN6 foram realizados em um eletrodo de carbono vítreo, em DMF + TBABF₄ 0,1 mol L $^{-1}$, com a utilização da técnica de voltametria cíclica.

Os voltamogramas cíclicos obtidos em meio aprótico são representados nas Figuras 28, 29 e 30. É possível observar nos voltamogramas que o mecanismo eletrodico é caracterizado por três ondas catódicas (Ic, IIc e IIIc) e três ondas de oxidação (Ia, IIa e IIIa).

Figura 28 - Voltametria cíclica do LNN1 (5×10^{-4} mol L⁻¹) em meio aprótico DMF + TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹, carbono vítreo (área = 7,065 mm²) e $v = 0,100$ V s⁻¹.



Fonte: Autora, 2019.

Figura 29 - Voltametria cíclica do LNN5 (5×10^{-4} mol L⁻¹) em meio aprótico DMF + TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹, carbono vítreo (área = 7,065 mm²) e $v = 0,100$ V s⁻¹.

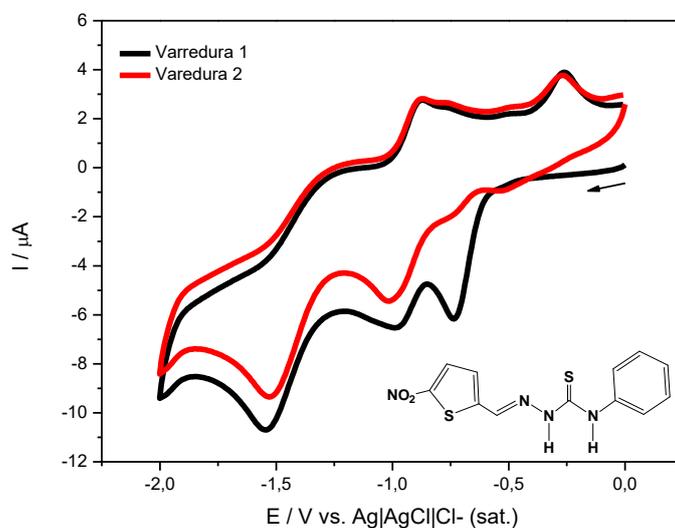
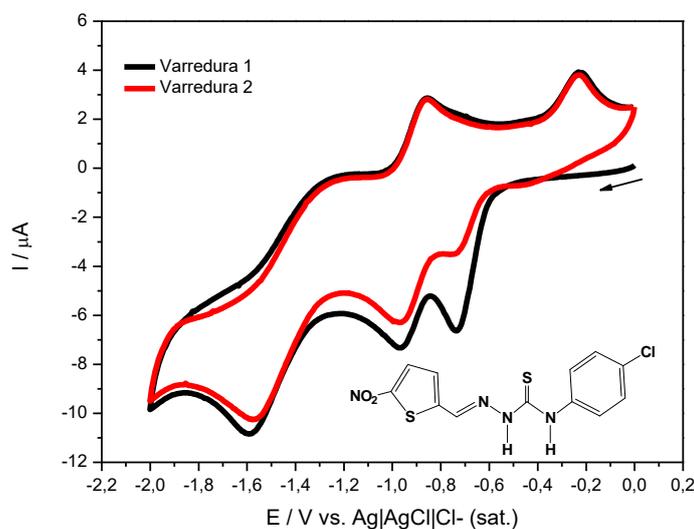


Figura 30 - Voltametria cíclica do LNN6 (5×10^{-4} mol L⁻¹) em meio aprótico DMF + TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹, carbono vítreo (área = 7,065 mm²) e $v = 0,100$ V s⁻¹.

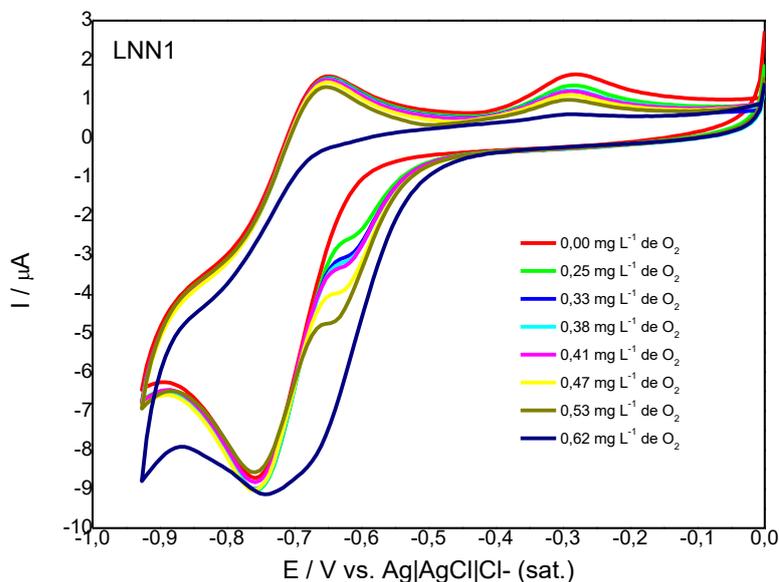


7.4 Estudo de reatividade com oxigênio molecular

Os estudos eletroquímicos em meio aprótico (DMF + TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹) foram realizados em presença e ausência de oxigênio para averiguar a reatividade, após redução dos derivados de 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos LNN1, LNN3 ou LNN5, frente a oxigênio.

Na Figura 31, pode-se observar que o perfil eletroquímico do LNN1, em ausência de oxigênio e adição de oxigênio à cela eletroquímica, apresenta um surgimento de uma onda de redução $E_{pc} = -0,65$ V. Essa onda é decorrente, provavelmente de um intermediário reativo a oxigênio. A onda de redução $E_{pc} = -0,72$ V inicia com o aumento da intensidade de corrente, seguida de diminuição até o desaparecimento da onda. As ondas de oxidação $E_{pa} = -0,73$ e $-0,25$ V sofrem diminuição da intensidade da corrente de pico, em função do aumento da concentração de oxigênio, isso provavelmente se dar pelo consumo desse intermediário reativo, logo esse intermediário é sensível a presença de oxigênio e ele é consumido pelo oxigênio, assim com o aumento da concentração do oxigênio a diminuição desse intermediário do composto nitroso.

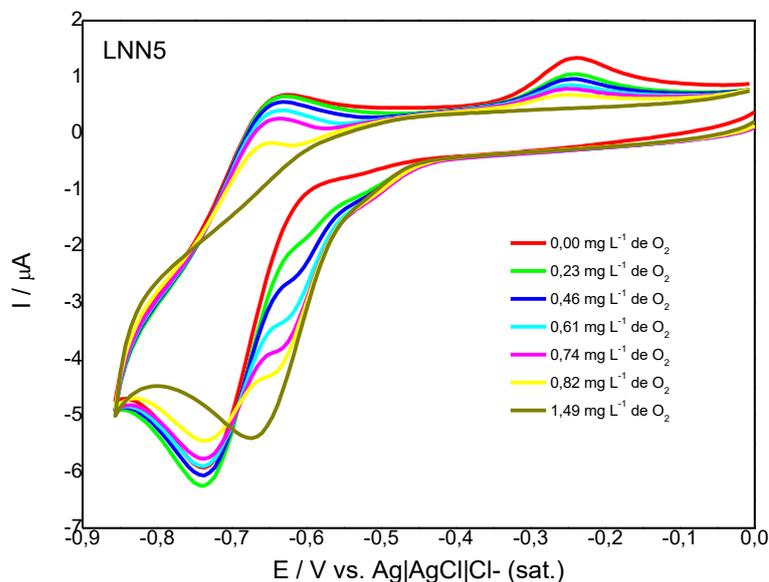
Figura 31 - Voltamogramas Cíclicos para Voltamogramas Cíclicos para LNN1 (1×10^{-4} molL⁻¹) em DMF/TBAP ($0,1 \text{ molL}^{-1}$), eletrodo de carbono vítreo, em presença de diferentes concentrações de oxigênio.



Fonte: Autora, 2019.

Na Figura 32, pode-se observar que o perfil eletroquímico do LNN5, em ausência de oxigênio e adição de oxigênio à cela eletroquímica, apresenta um surgimento de uma onda de redução $E_{pc} = -0,65$ V. A onda de redução $E_{pc} = -0,74$ V diminui até o desaparecimento da onda. As ondas de oxidação $E_{pa} = -0,62$ e $-0,22$ V sofrem diminuição da intensidade da corrente de pico, em função do aumento da concentração de oxigênio, isso provavelmente se dar pelo consumo desse intermediário reativo, logo esse intermediário é sensível a presença de oxigênio e ele é consumido pelo oxigênio, assim com o aumento da concentração do oxigênio a diminuição desse intermediário do composto nitroso.

Figura 32 - Voltamogramas Cíclicos para Voltamogramas Cíclicos para LNN5 (1×10^{-4} molL⁻¹) em DMF/TBAP ($0,1 \text{ molL}^{-1}$), eletrodo de carbono vítreo, em presença de diferentes concentrações de oxigênio.

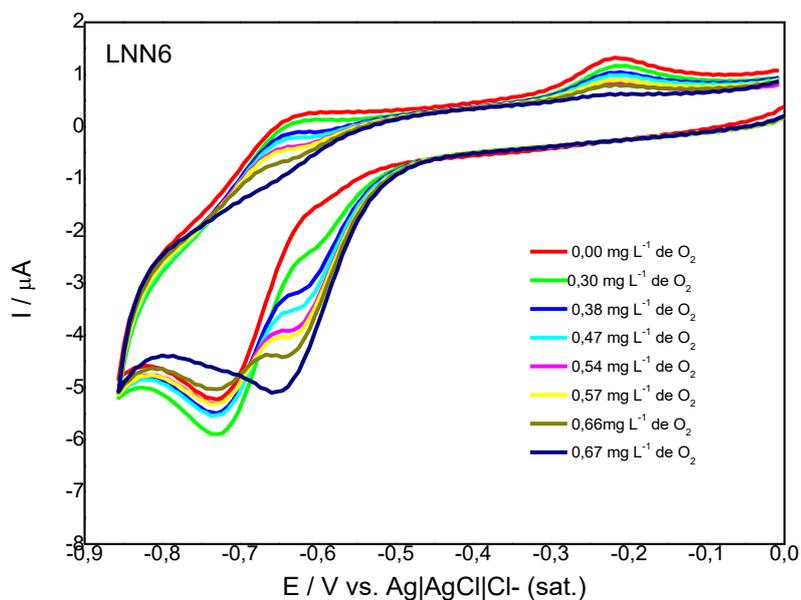


Fonte: Autora, 2019.

Na

Figura 33, pode-se observar que o perfil eletroquímico do LNN6, em ausência de oxigênio e adição de oxigênio à cela eletroquímica, apresenta um surgimento de uma onda de redução $E_{p_c} = -0,65$ V. Essa onda é decorrente, provavelmente de um intermediário reativo a oxigênio. A onda de redução $E_{p_c} = -0,73$ V diminui até o desaparecimento da onda. As ondas de oxidação $E_{p_a} = -0,62$ e $-0,22$ V sofrem diminuição da intensidade da corrente de pico, em função do aumento da concentração de oxigênio, isso provavelmente se dar pelo consumo desse intermediário reativo, logo esse intermediário é sensível a presença de oxigênio e ele é consumido pelo oxigênio, assim com o aumento da concentração do oxigênio a diminuição desse intermediário do composto nitroso.

Figura 33 - Voltamogramas Cíclicos para Voltamogramas Cíclicos para LNN6 ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em DMF/TBAP ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), eletrodo de carbono vítreo, em presença de diferentes concentrações de oxigênio.



Fonte: Autora, 2019.

Os resultados revelam ausência de reação com oxigênio para o derivado LNN1, indicando que o mesmo não atua como ciclador redox. Desta forma, a atividade anticancerígena pode ser atribuída à biorredução. No entanto os derivados LNN5 e LNN6 indicam uma provável interação com o oxigênio.

8 CONCLUSÃO

Portanto, para o estudo de estabilidade, os derivados 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazônicos não sofreram degradação nas condições analisadas, porém os derivados LNN1, LNN3 e LNN4 apresentaram um decréscimo de absorvância das ondas em função do tempo, decorrente provavelmente de sua precipitação.

Não obstante, os estudos em meio prático para os derivados LNN1, LNN2, LNN3, LNN4, LNN5, LNN6, LNN7, LNN8 e LNN9 revelaram um mecanismo eletroquímico conduzido pelo grupo nitro presente em todos, onde as substituições não comprometeram o mecanismo base, apresentando pequenas mudanças de potencial. Entretanto, pela intensidade de corrente de pico, vê-se a influência da baixa solubilidade das amostras, mesmo em meio misto etanólico, impossibilitando estudos mais detalhados com variação da velocidade de varredura, para determinar qual o processo envolvido na dupla camada eletrônica (difusão ou adsorção).

Todos os derivados interagem com a β -CD em diferentes proporções onde a LNN5 exibiu o melhor perfil eletroquímico e através da formação de uma monocamada auto-organizada (SAM) de β -CD-SH no eletrodo de Au, foi possível determinar a constante de associação aparente entre o complexo LNN5: β -CD com valor de $2,78 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ e valores de LD e LQ obtidos foram 0,20 e 0,68 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Já a LNN6 interage em menor proporção sendo necessário estudos complementares para comprovar o efeito encapsulante, podendo ser apenas uma interação supramolecular sem encapsulamento efetivo. As demais moléculas demonstraram encapsulação com os dados característicos de mudança de fase, onde há diminuição da turbidez da amostra, conseqüentemente maior solubilidade e condução eletrônica.

Quanto a interação dos compostos com DNA, os derivados LNN1, LNN5 e LNN6 reage com ssDNA em solução reduzindo seu sinal analítico e interage com dsDNA principalmente nas nucleobases guanina.

Portanto os derivados LNN1, LNN5 e LNN6 na presença de oxigênio apresenta um surgimento de uma onda de redução $E_{pc} = -0,65 \text{ V}$. O LNN5 e LNN6 apresentaram uma interação como o oxigênio.

PERSPECTIVAS

Preparar complexos de inclusão entre as 5-nitro-tiofeno-tiossemicarbazônicos ora trabalhadas com ciclodextrinas e fazer sua caracterização através de FTIR, DSC, RMN, buscando verificar sua estequiometria.

Investigar a interação das 5-nitro-tiofeno-tiossemicarbazônicos com DNA através de técnicas como EQCM, antes e após estarem encapsuladas com ciclodextrinas.

REFERÊNCIAS

ABREU, F. C. D.; FERRAZ, P. A. D. L.; GOULART, M. O. 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.

AIRD, K.M. & ZHANG, R. Nucleotide metabolism, oncogene-induced senescence and cancer. **Cancer Letters**, 2014.

ALI, A. Q.; TEOH, S. G.; ELTAYEB, N.E.; AHAMED, M. B. K.; MAJID A. M. S. A. Synthesis of copper (II) complexes of isatin thiosemicarbazone derivatives: In vitro anti-cancer, DNA binding, and cleavage activities. **Polyhedron**, v.74, p. 6–15, 2014.

ALMEIDA, S. M.; LAFAYETTE, E. A.; SILVA, L. P.; AMORIM, C. A.; OLIVEIRA, T. B.; RUIZ, A. L.; CARVALHO, J. E.; MOURA, R. O.; BELTRÃO, E. I.; LIMA, M. C.; JÚNIOR, L. B. Synthesis, DNA binding, and antiproliferative activity of novel acridine–thiosemicarbazone derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 6, p. 13023-13042, 2015.

ARORA, M.; SARAVANAN, S.; MOHAN, S.; BHATTACHARJEE, S. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of some schiff bases Of 2-amino-n-(p-acetamidophenyl carboxamido)- 4,5,6,7-tetramethyleneThiophenes. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 1, p. 315-319, 2013.

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

AYE, Y.; LONG, M. J. C.; STUBBE, J. Mechanistic Studies of Semicarbazone Triapine Targeting Human Ribonucleotide Reductase in Vitro and in Mammalian Cells Tyrosyl radical quenching not involving reactive oxygen species. **The Journal of Biological Chemistry**, v.287, n. 42, p. 35768–35778, 2012.

BARD, A. J. et al. Electrochemical methods - Fundamentals and Applications. 2a edição ed. New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto.: John Wiley & Sons, **INC**, 2001.

BARREIRO, E. J., & FRAGA, C. A. (2001). *Química medicinal: as bases moleculares*. Porto Alegre: Ed. Artmed.

BARROS, A. L. S. Avaliação da inibição do crescimento tumoral pelo tratamento com ácido valpróico, atorvastatina e pioglitazona isoladamente e em associação. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, 2010.

BOELSTERLI, U. A. et al. Bioactivation and hepatotoxicity of nitroaromatic drugs. **Current drug metabolism**, v. 7, n. 7, p. 715-727, 2006. ISSN 1389-2002.

BRETT, A. M. O.; CHIORCEA, A. M.; *Electrochem. Commun.* 2003, 5, 178.

BRETT, A. M. O.; VIVAN, M.; FERNANDES, I. R.; PIEDADE, J. A. P.; **Talanta** 2002 , 56, 959.

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

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59, n. 7, p. 645-666, 2007. ISSN 0169-409X.

CAVALCANTI, J. 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, p. 353-357, 2004. ISSN 1567-5394.

CEREDA, M. Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas. Fundação Cargill, 2003.

CHAUDHARY, A.; JHA, K. K.; KUMAR, S. Biological diversity of thiophene. **Journal of Advanced Scientific Research**, vol. 3; n. 3; p. 3-10, 2012.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRETO, L. C. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2009. ISSN 2179-443X.

DENG, P. et al. Electrocatalytic reduction and determination of p-nitrophenol on acetylene black paste electrode coated with salicylaldehyde-modified chitosan. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 168, p. 381-389, 2012. ISSN 0925-4005.

DICULESCU, V. C.; PAQUIM, A. M. C.; BRETT, A. M. O.; *Sensors* 2005, 5, 377.

- ELEAMEN, G. R. et al. Improvement of Solubility and Antifungal Activity of a New Aminothiophene Derivative by Complexation with 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin. insulin, **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 10, p. 11, 2016.
- EL-SHARIEF, M. A. M. S.; ABBAS, S. Y.; EL-BAYOUKI, K. A. M.; EL-GAMMAL, E. W. Synthesis of thiosemicarbazones derived from N-(4-hippuric acid) thiosemicarbazide and different carbonyl compounds as antimicrobial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 67, p. 263-268, 2013.
- FERREIRA, F. R. et al. Electrochemical investigations into host–guest interactions of a natural antioxidant compound with β -cyclodextrin. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 2, p. 797-803, 2010.
- HELI, H.; BATHAIE, S. Z.; MOUSAVI, M.F.; *Electrochim. Acta* 2005, 51, 1108.
- HILLARD, E.A.; DE ABREU, F.C.; FERREIRA, D.C.M.; JAOUEN, G.; GOULART, M.O.F.; AMATORE, C.; **Chem. Commun.**, 2008, 23, 2612.
- HOLOHAN, C.; VAN SCHAEYBROECK, S.; LONGLEY, D. B.; JOHSTON, P. G. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, p. 714-726, 2013.
- HORROCKS, S. M. et al. Effects of Short-Chain Nitrocompounds against *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in vitro. **Journal of food science**, v. 72, n. 2, p. M50-M55, 2007. ISSN 1750-3841.
- HROMADOVÁ, M. et al. New electrochemical oscillator based on the cationcatalyzed reduction of nitroaromatic radical anions. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 22, p. 4991-4996, 2009. ISSN 0013-4686.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Câncer. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <<http://www.2.inca.gov.br>>. Acesso em: 15 Mar 2018.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estatísticas do câncer, programa de epidemiologia e vigilância do câncer e seus fatores de risco, Secretaria de atenção à saúde, Coordenação de prevenção e vigilância. Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>>. Acesso em: 20 Out 2018.
- Jr, C. V., Bolzani, V. d., & Barreiro, E. J. (2006). OS PRODUTOS NATURAIS E A QUÍMICA MEDICINAL MODERNA. **Quim. Nova**, 326-337.

KATZUNG, B.; MASTERS, S.; TREVOR, A. Farmacologia Básica e Clínica, 10ª edição: São Paulo: McGraw-Hill Editores, SA Klaumann, PR, Wouk, AFPP e Sillas 2007.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. F. D. A. C. Dicionário terapêutico guanabara. Guanabara Koogan, 2007.

KOVACIC, P.; SOMANATHAN, R. Nitroaromatic compounds: Environmental toxicity, carcinogenicity, mutagenicity, therapy and mechanism. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 8, p. 810-824, 2014.

LIESEN, A. P.; AQUINO, T. M.; CARVALHO, C. S.; LIMA, V. T.; ARAÚJO, J. M.; LIMA, J. G.; FARIA, A. R.; MELO, E. J. T.; ALVES, A. J.; ALVES, E. W.; ALVES, A. Q.; GÓES, A. J. S. Synthesis and evaluation of anti-Toxoplasma gondii and antimicrobial activities of thiosemicarbazides, 4- thiazolidinones and 1,3,4-thiadiazoles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 3685- 3691, 2010.

LIVERTOUX, M.H.; LAGRANGE, P.; MINN, A.; **Brain Res.**, 1996, 725, 207.

LOFTSSON, T.; MASSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 225, n. 1, p. 15-30, 2001. ISSN 0378-5173.

MARQUES, K. M. R. Determinação do potencial antitumoral e estudos de mecanismos de ação de derivados 5-nitrotiofeno-tiossemicarbazônicos. 2013. 74 f. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

MELLO, A. M. S. Estudo eletroquímico da Trifluralina, adsorção em quitosana, interação com o biossensor de dsDNA e toxicidade frente ao caramujo Biomphalaria glabatra, 2007. Tese de doutorado, Universidade Federal de Alagoas, 2007.

MENDES, H. M. F.; FALEIROS, R. R.; VASCONCELOS, A. C.; ALVES, G. E. S.; MOORE, R. M. Apoptose no cólon menor eqüino submetido à isquemia e reperfusão experimentais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 3, p. 198-204, 2009.

MOSCOSO, R. et al. A simple derivatization of multiwalled carbon nanotubes with nitroaromatics in aqueous media: Modification with nitroso/hydroxylamine groups.

Electrochemistry Communications, v. 13, n. 2, p. 217-220, 2011. ISSN 1388-2481.

MOURA, M. A. B. F. Atividade antitumoral de nitroquinona derivada da Nor- β lapachona: contribuição da farmacoeletroquímica na pesquisa do mecanismo de ação de novos fármacos. 2008.

NÚÑEZ-VERGARA, L. J. et al. An electrochemical evidence of free radicals formation from flutamide and its reactivity with endo/xenobiotics of pharmacological relevance. **Bioelectrochemistry**, v. 53, n. 1, p. 103-110, 2001. ISSN 1567-5394.

PAULAI, F. R.; SERRANO, S. H. P.; TAVARES, L. C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1013-1020, 2009. ISSN 0100-4042.

RANG, H. P. et al. Farmacologia. In: (Ed.). Farmacologia: **Elsevier**, 2011.

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

REMERs, W.; BEARS, S. Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery. **Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery**, v. 4, 1997.

RODRIGUES, K. A. F. et al. 2-Amino-thiophene derivatives present antileishmanial activity mediated by apoptosis and immunomodulation in vitro. **European journal of medicinal chemistry**, v. 106, p. 1-14, 2015. ISSN 0223-5234.

RUMJANEK, V.M.; VIDAL, R. S.; MAIA, R. C. Multidrug resistance in chronic myeloid leukaemia: how much can we learn from MDR-CML cell lines **Bioscience Reports**, v. 33, n. 6, p. 875-878, 2013.

SAK, K. Chemotherapy and dietary phytochemical agents. **Chemotherapy Research and Practice**, v. 202, p. 1-11, 2012.

SARNIGUET, C.; TOLOZA, J.; CIPRIANI, M.; LAPIER, M.; VIEITES, M.; TOLEDANO-MAGANA, Y.; GARCÍA-RAMOS, J.C.; RUIZ-AZUARA, L.; MORENO, V.; MAYA, J.D.; AZAR, C.O.; GAMBINO, D.; OTERO, L. Water-soluble ruthenium

complexes bearing activity against protozoan parasites. **Biological Trace Element Research**, v. 159, p. 372-394, 2014.

SILVA, A. P.; MARTINI, M. V.; OLIVEIRA, C. M. A.; CUNHA, S.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T. G.; SILVA, C.C. Antitumor activity of (-)- α -bisabolol-based thiosemicarbazones against human tumor cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 2987-2993, 2010.

SILVA, M. P., CANDITO, A. C., LINS, S. L., AQUINO, T. M., MENDONÇA JÚNIOR, F. J., & ABREU, F. C. (2017). Electrochemical investigation of the toxicity of a new nitrocompound and its interaction with β -cyclodextrin and polyamidoamine third-generation. **Electrochimica Acta**, 442–451.

SIVADAS, A; SUBBARAYA, N. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of Novel thiophene acrylate derivatives. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, vol. 2, n.4, p. 1007-1014, 2011.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; STANLEY, R. C. Fundamentos da Química Analítica. Trad. 8. ed. São Paulo: Ed.Thomson, 2007.

SOUZA, D.; MACHADO, S.A.S.; AVACA, L.; **Quim. Nova**, 2003, 26 (1), 81.

SOUZA, M. A.; JOHANN, S.; ALVES, L.; LIMA, R. S.; CAMPOS, F. F.; MENDES, I. C.; BERALDO, H.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; CISALPINO, P. S.; ROSA, C. A.; ALVES, T. M. A.; SÁ, N. P.; ZANI, C. L. The antimicrobial activity of lapachol and its thiosemicarbazone and semicarbazone derivatives. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 3, p. 342-351, 2013.

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

TAVARES, L. et al. Synthesis and biological activity of nifuroxazide and analogs. II. **Bollettino chimico farmaceutico**, v. 138, n. 8, p. 432-436, 1999.

TENÓRIO, R. P.; GÓES, J. S. Tiosemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicação sintética e importância biológica. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1030-1037, 2005.

VENTURINI, C. G. et al. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Quim. Nova**, v. 31, n. 2, p. 360-368, 2008.

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

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World health statistics 2010.

Disponível em: http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2012/en.

Acesso em: 25 Out 2018.