ESTUDOS BIOELETROQUÍMICOS DE NAFTOQUINONAS

Bruno D. Santos[1]; Danyelle C. Santos[2]; Thaissa L. Silva[3].

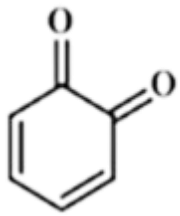
bruno.santos2@arapiraca.ufal.br[1];danyelle.santos@arapiraca.ufal.br[2] ; thaissa.silva@arapiraca.ufal.br[3].

Palavras-Chave: Quinonas; Voltametria cíclica, Biossensors.

Introdução

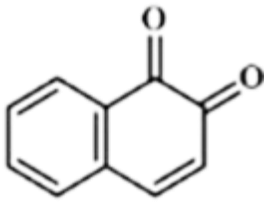
As quinonas (**Figura 1**) são compostos orgânicos amplamente estudados por sua capacidade de participar em reações redox, desempenhando papéis cruciais em processos biológicos, como a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a regulação de vias metabólicas essenciais (Silva et al.; 2020). Dentro deste grupo, as naftoquinonas (**Figura 2**) têm despertado grande interesse devido às suas diversas atividades biológicas, incluindo propriedades antitumorais, antimicrobianas e antiparasitárias. A compreensão detalhada do comportamento redox dessas moléculas é fundamental para desvendar os mecanismos que explicam as suas atividades biológicas, especialmente em contextos medicinais e biológicos (Silva et al., 2020 e Paiva, 2015)

Figura1 - Estrutura molecular das orto-quinonas.



Fonte: Autor, 2024.

Figura 2 - Estrutura molecular das naftoquinonas.



Fonte: Autor, 2024.

A eletroquímica é uma área crucial da química que explora a interseção entre processos químicos e fenômenos elétricos, permitindo a investigação de reações químicas por meio da aplicação de corrente elétrica. Essa abordagem é especialmente valiosa para elucidar mecanismos de reação e estudar intermediários instáveis, como íons radicais. Além disso, a aplicação de potenciais em eletrodos proporciona uma maneira eficiente de ajustar a força eletromotriz em soluções, possibilitando a obtenção de dados termodinâmicos e cinéticos das reações, contribuindo para a compreensão dos sistemas naturais e a simulação de ambientes

biológicos (Santos, 2020). No campo da eletroquímica, técnicas como a voltametria cíclica (VC) e a voltametria de pulso diferencial (VPD) são amplamente utilizadas para investigar as propriedades redox de compostos como as naftoquinonas. Essas técnicas permitem a análise dos potenciais de oxidação e redução em meio prótico, como tampão fosfato em pH 7,5, que simula o ambiente hidrofílico encontrado em sistemas biológicos. Estudos indicam que parâmetros eletroquímicos, como o potencial de redução catódico (Epc) e o potencial redox (Eredox), podem ser correlacionados com a atividade biológica desses compostos (Paiva, 2016).

Há evidências de que a eficácia biológica das naftoquinonas, especialmente em relação às suas propriedades antitumorais, está intimamente relacionada ao seu comportamento redox. Por exemplo, algumas naftoquinonas que apresentam valores específicos de Eredox demonstram maior capacidade de interação com alvos biológicos essenciais, como o DNA, o que pode explicar sua eficácia terapêutica. No entanto, a compreensão completa desses mecanismos ainda exige investigações mais aprofundadas, que integrem dados eletroquímicos a resultados biológicos mais amplos (Silva et al., 2003; Paiva, 2016).

Os biossensores eletroquímicos de DNA, que utilizam DNA de fita dupla (dsDNA) **(Figura 3)** imobilizado em um transdutor eletroquímico, são ferramentas promissoras para a detecção de interações específicas com o DNA. Esses estudos se baseiam em mudanças no comportamento eletroquímico do DNA, como alterações nas correntes de pico e deslocamentos de potenciais relacionados às bases guanina e adenina. Em meio ácido, a oxidação eletroquímica do DNA apresenta picos distintos de oxidação para as bases purinas (guanina e adenina), enquanto as bases pirimídicas (timina e citosina) permanecem eletroinativas nessas condições. Assim, biossensores de DNA podem ser úteis tanto para investigar interações específicas entre DNA e fármacos quanto para auxiliar na determinação do mecanismo de interação envolvido (Silva, 2014 e Paquim e Brett, 2021).

Figura 3 - Estrutura do dsDNA.

Fonte: Disponível em: https://www.easybiologyclass.com/single-stranded-dna-ssdna-vs-double-stranded-dnadsdna-similarities-and-differences/. Acesso em: 18/08/2024.

Este trabalho tem como objetivos principais: (a) investigar o comportamento redox de uma série de naftoquinonas em meio prótico, utilizando as técnicas de voltametria cíclica (VC) e voltametria de pulso diferencial (VPD), com o objetivo de simular o ambiente hidrofílico encontrado em sistemas biológicos e (b) explorar a interação das naftoquinonas, uma classe de

compostos estruturalmente relacionados, com alvos biológicos como o DNA, utilizando biossensores baseados em DNA de fita dupla (dsDNA).

Material e Métodos

Estudos eletroquímicos de redução e oxidação de três amostras de naftoquinonas denominadas RCMePh, ClBrNFQ e $MCNO_2Ph$ foram realizados em meio predominantemente prótico, a fim de mimetizar o ambiente biológico hidrofílico.

Foi preparada uma solução aquosa para controle contendo 2 mL de DMF (20%) e 8 mL de tampão fosfato pH 7,5 (c = 0,1 mmol L-1) a fim de resultar em uma solução com volume total de 10 mL. Calculou-se a quantidade da amostra que deveria ser adicionada à solução a fim de resultar em uma concentração de 0,1mmol L^{-1}. Em seguida, a amostra foi solubilizada em *eppendorf* contendo 1mL de DMF. O uso do solvente polar aprótico, DMF, é necessário para viabilizar a completa solubilização da amostra. A amostra solubilizada foi, então, adicionada à célula eletroquímica. A solução foi desareada com nitrogênio durante 5 minutos antes da varredura de cada composto, a fim de evitar a interferência do oxigênio e o aparecimento de picos indesejados. Além disso, durante as varreduras, o gás foi deixado na superfície da solução. Foram realizadas varreduras em VC e VPD somente com o eletrólito de suporte nas seguintes faixas 0,5 a -1,3 V; 0,5 a -1,5 V; 0 a -1,5V; 0 a + 1,0 V; 0 a +1,5 V. Logo em seguida foram realizadas varreduras com a amostra para obtenção dos perfis voltamétricos nas faixas catódicas e anódicas.

Estudos da interação da RCMePh, com DNA por Voltametria de Pulso Diferencial, foi feito o preparo da solução tampão acetato. A solução tampão acetato foi preparada utilizando água deionizada previamente fervida a fim de não possuir microorganismos capazes de danificar a molécula de DNA. Preparou-se a solução tampão pH 4,23 através da mistura ácido acético (1,0 mol L^{-1}) e acetato de sódio (1,0 mol L^{-1}).

Preparação do gel de dsDNA, o gel de dsDNA foi preparado através da solubilização de 3 mg de dsDNA em 125 µL da solução tampão acetato pH 4,23, este foi refrigerado por 48h para a completa formação do gel de DNA, antes da realização das análises eletroquímicas.

Preparo e condicionamento do sensor de dsDNA, para o preparo do sensor de dsDNA, inicialmente o eletrodo foi polido com alumina, e então, realizou-se o condicionamento, a fim de garantir a imobilização do dsDNA. O condicionamento foi realizado através da técnica Voltametria de Pulso Diferencial (VPD), com varredura realizada na faixa de 0 a +1,5 V em velocidade de 10 mVs^{-1}. Foram realizados cinco ciclos até a completa estabilização da superfície eletródica (organização da dupla camada eletródica). Esse procedimento é realizado a fim de tornar o eletrodo carregado positivamente, para assim permitir interações eletrostáticas deste com os grupos fosfato do dsDNA. Em seguida, 10 µL do gel foram depositados sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo para os estudos de VPD. O gel sobre o eletrodo foi seco com leve fluxo de gás nitrogênio até ser possível visualizar um fino filme de dsDNA sobre o eletrodo, para os estudos de VPD.

As análises foram realizadas com o eletrodo contendo o filme de dsDNA imerso em solução de etanol (20%) e tampão acetato pH 4,23 e varrido na faixa de potencial 0 a +1,5 V. Para os estudos de interação da amostra RCMePh com o dsDNA, outro eletrodo com filme de dsDNA foi imerso em solução de etanol (20%) e tampão acetato pH 4,23. O eletrodo e a solução

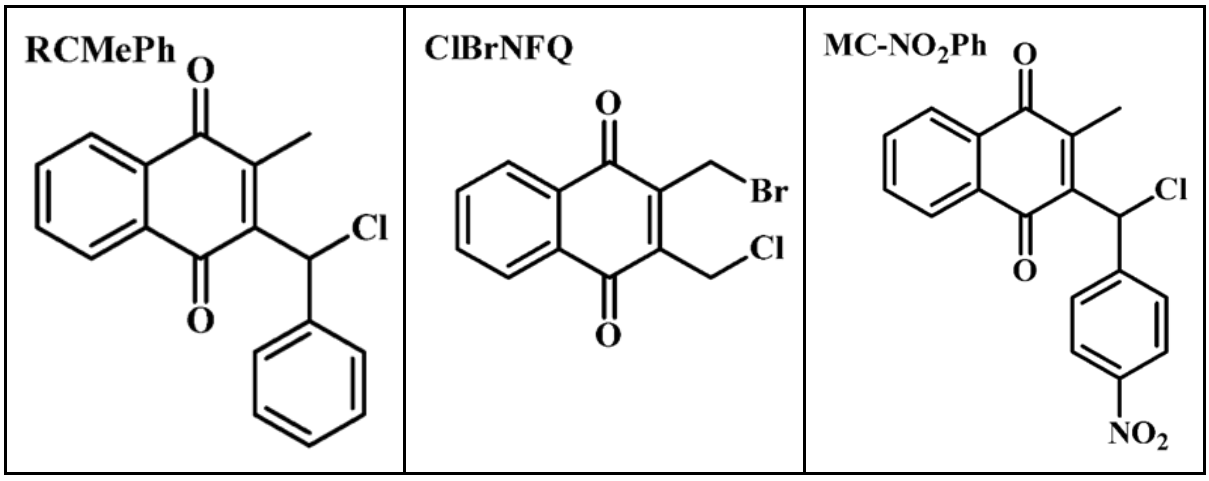
foram deixados durante 15 minutos em contato e após isso foi realizada outra varredura na faixa de potencial 0 a +1,5V.

Após a execução dos experimentos, foi utilizado o software gráfico Origin para análise e tratamento dos dados obtidos.

Resultados e Discussão

Os estudos eletroquímicos das três amostras de naftoquinonas (**Figura 4**) foram realizadas em uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos, usando um µAutolabIII (FRA2) potenciostato/galvanostato, acoplado a um microcomputador com o software NOVA®. O eletrodo de trabalho (ET) foi o de carbono vítreo (BAS, diâmetro = 3 mm), o auxiliar, um fio de platina espiralado e o de referência, o sistema Ag/AgCl/Cl- (3 M). O ET foi polido com alumina. Nos experimentos utilizando a técnica de voltametria cíclica (VC), a velocidade de varredura padrão foi de 100 mVs^{-1} e em voltametria de pulso diferencial (VPD), 10 mVs^{-1}. Para mimetizar as reações redox que ocorrem no meio biológico hidrofílico, as análises eletroquímicas de redução (intervalo de potencial de 0 a -1,5V) e oxidação (intervalo de potencial de 0 a +1,5V) foram realizadas em meio prótico, utilizando tampão fosfato pH 7,5 e dimetilformamida (DMF, 20%) como co-solvente. Antes de cada medida eletroquímica, a solução foi desaerada com $N_{2(g)}$ por aproximadamente 5 min. A estrutura dos compostos estudados encontra-se na Figura 4. Os compostos estudados **(figura 4)** foram sintetizados, caracterizados e gentilmente cedidos pelo grupo de síntese orgânica do Prof. Vitor F. Ferreira da Universidade Federal Fluminense (UFF). A concentração dos compostos na célula eletroquímica foi de 1 mmol L^{-1}.

Figura 4 - Estrutura dos compostos estudados no presente trabalho.



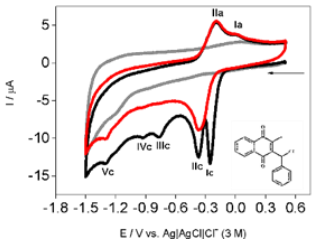
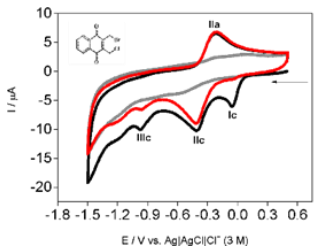
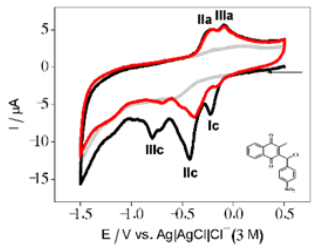
Fonte: Autor, 2024.

Os três compostos (**Figura 4**) possuem a função naftoquinona, sendo os compostos 1 (RCMePh) e 3 (MC-NO_2Ph) monohalogenados, e o composto 2 (ClBrNFQ) dihalogenado. O composto 2 apresenta ainda um grupo nitroaromático eletrorretirador em sua estrutura. Com efeito, espera-se que as diferenças estruturais das amostras culminem em diferenças nos voltamogramas cíclicos e de pulso diferencial.

De modo geral, os voltamogramas cíclicos e de pulso diferencial são complexos, com picos adicionais quando comparados às naftoquinonas tradicionais, cujos voltamogramas

evidenciam apenas a formação da hidroquinona (QH_2), representada por um único par de picos (Ic/Ia). O fato de as amostras possuírem bons grupos abandonadores, associado à complexidade supracitada, é um indício de que o mecanismo ocorre via eliminação redutiva, um mecanismo do tipo eletroquímico-químico (EC).

Figura 5 - Voltamogramas cíclicos das amostras 1, 2 e 3 (c = 1.10^{-3} mol/L) em tampão fosfato pH 7,5 (80%) + Dimetilformamida – DMF (20%), eletrodo de carbono vítreo, v = 100 mV/s. Eletrodo de carbono vítreo, v = 100 mVs-1, varreduras sucessivas, linha preta - primeira varredura, linha vermelha – segunda varredura.

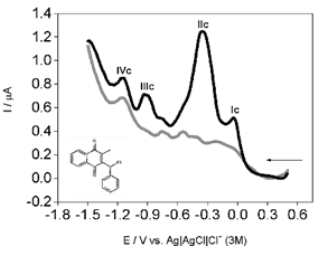
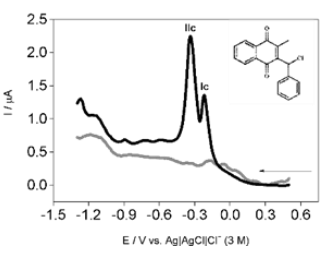
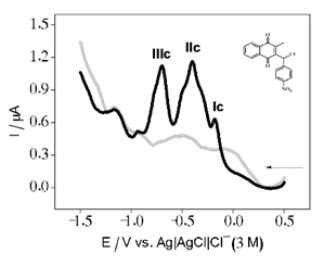
1	2	3
		

Fonte: Autor, 2024.

Os três compostos apresentam perfis voltamétricos complexos (**Figura 5**), com a presença de pelo menos três picos de redução. Nota-se que a segunda varredura (Figura 2, linhas vermelhas) é diferente da primeira (Figura 5, linhas pretas), indicando reações químicas acopladas com mudanças estruturais. Uma possibilidade de mecanismo redox é que, inicialmente ocorre a redução da quinona à hidroquinona esta pode perder um grupo abandonador e leva a formação do intermediário quinonametídeo, uma espécie altamente eletrofílica e que é capaz de induzir respostas citotóxicas *in vivo*. Comprovar a geração de QMs é essencial para a elucidação do mecanismo de ação biológica destes compostos.

Em VPD, uma técnica mais sensível que a VC, observa-se um comportamento eletroquímico semelhante ao observado em VC **(Figura 6)**.

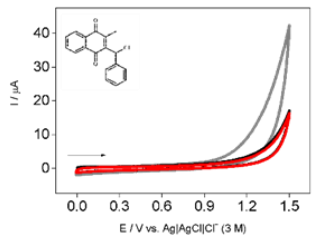
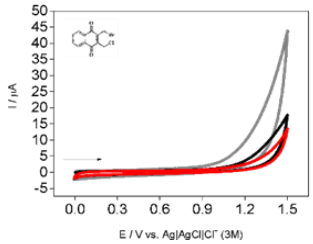
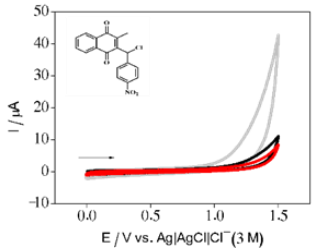
Figura 6 - Voltamogramas de pulso diferencial das amostras 1, 2 e 3 (c = 1.10^{-4} mol/L) em tampão fosfato pH 7,5 (80%) + Dimetilformamida – DMF (20%) (linha cinza). Eletrodo de carbono vítreo, v = 10 mV/s, varreduras sucessivas, linha preta - primeira varredura, linha vermelha – segunda varredura.

1	2	3
		

Fonte: Autor, 2024.

Os estudos eletroquímicos em meio prótico na faixa anódica estudada (0 a +1.5 V) não mostraram picos, logo, não ocorre oxidação da função quinona na faixa 0 a +1.5V **(Figura 7)**.

Figura 7 - Voltamogramas cíclicos anódicos das amostras 1, 2 e 3 (c = 1.10^{-4} mol/L) em tampão fosfato pH 7,5 (80%) + Dimetilformamida – DMF (20%) (linha cinza). Eletrodo de carbono vítreo, ν = 100 mVs-1, varreduras sucessivas, linha preta - primeira varredura, linha vermelha – segunda varredura.

1	2	3
		

Fonte: Autor, 2024.

Estudos da interação da RCMePh, com DNA

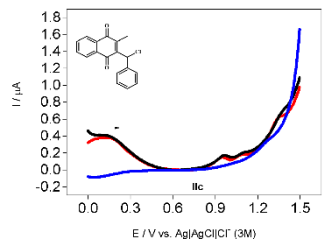
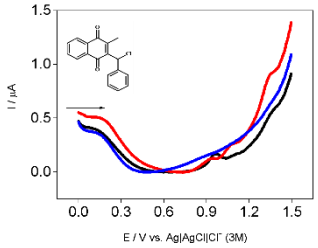
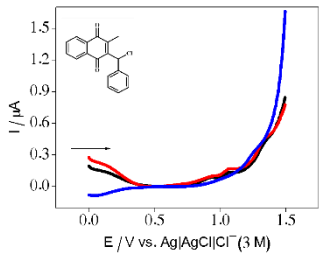
Existem algumas maneiras de interação entre compostos de interesse e o dsDNA; nesse sentido, como mencionado por Lopes, Oliveira e Brett (2013), os biossensores de dsDNA, associados à voltametria de pulso diferencial, têm sido satisfatoriamente utilizados para investigar as interações entre metais pesados, pequenas moléculas e outros compostos perigosos com o dsDNA. Dentre as possibilidades de formação do aduto analito-DNA reportadas pela literatura, são possíveis interações do tipo covalente e não-covalente - intercalação, interação com os sulcos ou interação eletrostática (RAMOTOWSKA, CIESIELSKA e MAKOWSKI, 2021).

É fundamental realizar uma comparação entre o comportamento eletroquímico da amostra em eletrodo de carbono vítreo e em biossensores para avaliar possíveis interações do composto com alvos biológicos importantes.

No voltamograma de pulso diferencial registrados na superfície do filme de dsdna em carbono vítreo da RCMePh, não evidenciaram picos de oxidação na faixa de 0 a +1,5 V tanto após a aplicação do potencial de primeira, quanto no potencial da segunda onda respectivamente (EpIc = -0.1489 e EpIIc = - 0.5467) (Figura 8). Esse procedimento visava investigar se os produtos de redução da RCMePH interagem com o DNA. Os resultados, portanto, foram negativos. Além disso, a interação após 15 minutos de contato da amostra com o biossensor de dsDNA também foi investigada. Não foi observada nenhuma evidência de interação entre a amostra e o DNA, pois não houve exposição das bases. Essa ausência de interação é evidenciada pela falta de ondas anódicas na mesma faixa de potencial, entre 0 e +1,5 V **(Figura 8).**

Figure 8 - (1) Voltamogramas de pulso diferencial do biossensor de dsDNA na ausência de RCMePh (linha preta); biossensor de dsDNA na presença de RCMePh (0,1 mM) com pré-redução no potencial relativo a EpIc = -0,1489, após 15 minutos de contato (linha vermelha); voltamogramas de pulso diferencial de RCMePh (linha azul). Condições: meio

aquoso etanólico (20%), tampão acetato, pH 4,21, eletrodo de carbono vítreo, direção anódica, v = 10 mV s–1. (2) Voltamogramas de pulso diferencial do biossensor de dsDNA na ausência de RCMePh (linha preta); biossensor de dsDNA na presença de RCMePh (0,1 mM) com pré-redução no potencial relativo a EpIIc = -0,5467, após 15 minutos de contato (linha vermelha); voltamogramas de pulso diferencial de RCMePh (linha azul). Condições: meio aquoso etanólico (20%), tampão acetato, pH 4,21, eletrodo de carbono vítreo, direção anódica, v = 10 mV s–1. (3) Voltamogramas de pulso diferencial do biossensor de dsDNA na ausência de RCMePh (linha preta); biossensor de dsDNA na presença de RCMePh (0,1 mM) após 15 minutos de contato (linha vermelha); voltammogramas de pulso diferencial de RCMePh (linha azul). Condições: meio aquoso etanólico (20%), tampão acetato, pH 4,23, eletrodo de carbono vítreo, direção anódica, = 10 mV s–1.

1	2	3
		

Fonte: Autor, 2024.

A ausência de picos de oxidação das bases nitrogenadas do DNA após a adição da amostra indica que provavelmente não houve interação entre a amostra e o DNA. Isso sugere que o mecanismo de ação biológica da amostra não envolve a fragmentação do DNA. No entanto, é importante destacar que o estudo eletroquímico por si só não é suficiente para confirmar definitivamente a ausência de interação. Para uma conclusão mais robusta, seria necessário complementar essa análise com outras técnicas, como espectrofotometria, para determinar com maior certeza se a amostra RCMePh realmente não interage com o DNA.

Conclusões

Os estudos eletroquímicos conduzidos com as amostras de naftoquinonas (RCMePh, ClBrNFQ, e $MCNO_2Ph$) proporcionaram uma compreensão aprofundada do comportamento redox desses compostos em meio prótico, simulando condições biológicas. A análise dos voltamogramas cíclicos e de pulso diferencial revelou a presença de múltiplos picos de redução, o que sugere a complexidade dos mecanismos eletroquímicos envolvidos, possivelmente relacionados à formação de quinonametídeos, que são espécies altamente eletrofílicas com potencial citotóxico.

Os experimentos indicaram que, apesar de esses compostos apresentarem perfis voltamétricos complexos e potencial para interações biológicas relevantes, o estudo da interação com o DNA, utilizando biossensores de dsDNA, não evidenciou interações significativas. Isso sugere que o mecanismo de ação biológica desses compostos pode não

envolver diretamente a fragmentação do DNA, ou que outros alvos biológicos podem estar envolvidos. No entanto, é relevante observar que esses resultados não excluem completamente a possibilidade de interação, sendo necessária a utilização de outras técnicas complementares, como a espectrofotometria, para uma confirmação mais conclusiva.

Dessa forma, este estudo contribui para a compreensão dos mecanismos bioeletroquímicos das naftoquinonas, e sugere a necessidade de futuras investigações que possam correlacionar de maneira mais direta as propriedades redox desses compostos com suas atividades biológicas e potenciais aplicações terapêuticas.

Agradecimentos

Ao PET Química da Ufal – *Campus* Arapiraca, Laboratório de Eletrocatálise e Eletroquímica Orgânica e a Universidade Federal de Alagoas – *Campus* Arapiraca (UFAL).

Referências

CHIORCEA-PAQUIM, Ana-Maria; OLIVEIRA-BRETT, Ana Maria. DNA electrochemical biosensors for in situ probing of pharmaceutical drug oxidative DNA damage. **Sensors**, v. 21, n. 4, p. 1125, 2021.

LOPES, I. C.; OLIVEIRA, S. Carlos B.; BRETT, A. M. O. In situ electrochemical evaluation of anticancer drug temozolomide and its metabolites–DNA interaction. Analytical and bioanalytical chemistry, v. 405, n. 11, p. 3783-3790, 2013.

PAIVA, Yen Galdino de et al. Eletroquímica medicinal de quinonas: integração entre eletroquímica, atividades biológicas, interação com DNA e métodos computacionais. 2016.

PAIVA, Yen G. et al. Electrochemically driven supramolecular interaction of quinones and ferrocifens: an example of redox activation of bioactive compounds. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 15, n. 2, p. 136-162, 2015.

PAQUIM, A. M. C.; BRETT, A. M. O. Dna electrochemical biosensors for in situ probing of pharmaceutical drug oxidative DNA damage. Sensors, v. 21, n. 4, p. 1125, 2021.

RAMOTOWSKA, S.; CIESIELSKA, A.; MAKOWSKI, M.. What Can Electrochemical Methods Offer in Determining DNA–Drug Interactions?. Molecules, v. 26, n. 11, p. 3478, 2021.

SANTOS, Danyelle Cândido. Estudos bioletroquímicos de Nitronas. 2020.

SILVA, Thaissa L., et al. "Quinone-based molecular electrochemistry and their contributions to medicinal chemistry: A look at the present and future." ***Current Opinion in Electrochemistry*** 24 (2020): 79-87..

SILVA, Thaissa Lucio. Avaliação de substâncias de interesse biológico com propriedades anti e pró-oxidantes. 2014.