

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BACHARELADO**

**PLATAFORMA DE DETECÇÃO ELETROQUÍMICA  
PARA AVALIAÇÃO DA HABILIDADE QUELANTE DO  
COBRE POR COMPOSTOS NATURAIS  
NEUROPROTETORES**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**Lucas Paines Bressan**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2014**

# **PLATAFORMA DE DETECÇÃO ELETROQUÍMICA PARA AVALIAÇÃO DA HABILIDADE QUELANTE DO COBRE POR COMPOSTOS NATURAIS NEUROPROTETORES**

**Lucas Paines Bressan**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação Química Bacharelado, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Bacharel em Química**

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2014**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Curso de Graduação em Química Bacharelado**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova o trabalho de  
conclusão de curso

**PLATAFORMA DE DETECÇÃO ELETROQUÍMICA PARA  
AVALIAÇÃO DA HABILIDADE QUELANTE DO COBRE POR  
COMPOSTOS NATURAIS NEUROPROTETORES**

elaborado por  
**Lucas Paines Bressan**

como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Bacharel em Química**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento**

(Presidente/Orientador)

---

**Ma. Diana Tomazi Muratt (UFSM)**

Santa Maria, 3 de dezembro de 2014

## AGRADECIMENTOS

Ao prof<sup>o</sup> Dr. Paulo Nascimento e a prof<sup>a</sup> Dr. Denise Bohrer pelos ensinamentos passados ao longo dos anos de iniciação científica e pela oportunidade inestimável de ter adquirido tanto conhecimento nas dependências do LACHEM.

À Diana Muratt, por ter tido a disposição em me ajudar profundamente na revisão deste trabalho e pelas horas de diversão passadas juntas no laboratório de absorção durante grande parte da minha graduação.

Aos meus pais, Edson e Cláudia Bressan, por terem tido a garra e persistência de me incentivar durante toda minha vida a buscar um futuro melhor. O exemplo dos dois para mim é a força motriz que me fez chegar até aqui.

Aos meus irmãos Vinícius e Matheus pelo companheirismo desde o sempre. A minha infância foi mais tranquila ao lado deles e a amizade fraterna é um valor irrevogável em mim. À minha tia Mari pelos mimos desde criança e pela paciência em me cuidar quando tinha minhas birras.

À família Schmidt, que tive a oportunidade de conhecer quando iniciava a vida acadêmica e que são outra fonte de exemplos e carinho em quase todos meus dias. Agradeço ao S. Alex, à D. Denise e à Júlia por terem me recebido, acolhido e integrado como parte da família ao longo dos anos.

Aos colegas do LACHEM pelos anos que passamos juntos. À todos aqueles que por lá passaram e ensinaram o que sabiam de forma humilde e paciente. Um carinho especial aos colegas que tenho desde que iniciei o trabalho. Eles foram os proporcionadores de momentos inesquecíveis e de dicas preciosas.

Aos caros amigos Henrique, Lisandro, Débora e Júnior por serem a trupe que me acolheu de maneira mais cálida durante todos os períodos desta jornada.

À Aline Barcelos e a D. Zilda por terem sido amigas especiais e companheiras do coração durante tantos momentos inesquecíveis. Um carinho especial àquela que me foi a maior fonte de companhia enquanto me encontrava fora do ninho.

A todos os colegas que encontrei durante o período de intercâmbio, principalmente Amy Liu e Vinci Hung, por terem contribuído tanto científica quanto emocionalmente neste tempo.

Por último e não menos importante, à Marcella Emília Petra Schmidt, pelos inigualáveis anos de amor e companheirismo, pela ajuda e pelo amparo, pelo suporte e pelo zelo, pelas críticas e pelos conselhos, sou a ti todo grato.

*“não há homem valente se nunca houver caminhado algumas centenas de quilômetros. Se você quiser saber a verdade sobre quem é, caminhe até que nem uma única pessoa saiba o seu nome. As viagens são o grande nivelador, o grande mestre, amargo como remédio, mais cruel que o espelho. Um longo estirão de estrada lhe ensina mais sobre você mesmo do que 100 anos de serena introspecção”.*

*Kvothe, em O temor do Sábio*

## RESUMO

Trabalho de conclusão de curso  
Curso de Química Bacharelado  
Universidade Federal de Santa Maria

# PLATAFORMA DE DETECÇÃO ELETROQUÍMICA PARA AVALIAÇÃO DA HABILIDADE QUELANTE DO COBRE POR COMPOSTOS NATURAIS NEUROPROTETORES

AUTOR: Lucas Paines Bressan  
ORIENTADOR: Paulo Cícero do Nascimento  
Data e Local Da Defesa: Santa Maria, 3 de dezembro de 2014

A desregulação ou o acúmulo de íons metálicos estão ligados a inúmeras doenças. Assim, há uma crescente na busca por compostos terapêuticos que possam atenuar a toxicidade exercida pelo acúmulo de tais íons metálicos, principalmente na pesquisa voltada para medicamentos. O estabelecimento de um método a fim de testar o potencial quelante de uma vasta gama de compostos seria vantajoso caso fosse facilmente utilizável e de baixo custo. Neste trabalho, um método sensível e bem estabelecido para a detecção do Cu em solução foi adaptado em um ensaio para determinar o potencial quelante de polifenóis clinicamente importantes (tais quais (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG), resveratrol, clioquinol e baicaleína). Estes compostos foram escolhidos a fim de confirmar que a técnica utilizada é um método viável para aplicação futura em novos polifenóis naturais ou compostos sintéticos que mostrarem potencial na terapida da AD como quelante metálico.

**Palavras-chave:** Cobre, polifenóis, quelantes metálicos, eletroquímica, voltametria de pulso diferencial, eletrodos de pasta de carbono

## ABSTRACT

Course Conclusion Work  
Bachelor's degree in Chemistry  
Federal University of Santa Maria

# AN ELECTROCHEMICAL DETECTION PLATFORM FOR THE ASSESSMENT OF Cu-CHELATING ABILITY BY KNOWN NEUROPROTECTIVE NATURAL COMPOUNDS

AUTHOR: Lucas Paines Bressan  
ADVISER: Paulo Cícero do Nascimento  
Date and Place of Defense: December 3<sup>rd</sup>, Santa Maria, 2014

Metal ion dysregulation or accumulation has been implicated in a number of diseases. As such, a rise in the search for potential therapeutic compounds that can attenuate the toxicity exerted by the accumulation of such metal ions has been an area of research targeted in medicine. To aid in this effort, the establishment of an easy to use and cost-effective screening assay would be advantageous in order to assess the ability of a wide range of compounds for their metal-chelating ability. In this report, a well-established and sensitive method for the detection of Cu in solution was adapted into an assay to determine the Cu-binding potency of clinically important polyphenols (e .g. (-)-epigallocatechin-3- gallate (EGCG), resveratrol, clioquinol and baicalein). These compounds were chosen to establish this proof-of-concept technique as a viable method for later use with newly discovered natural polyphenols or novel synthetic compounds that show potential in AD therapy as a metal-chelator.

**Keywords:** Copper, polyphenols, metal chelation, electrochemistry, differential pulse voltammetry, carbon paste electrodes.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Faixa linear do cobre em diferentes concentrações .....	19
Figura 2 – Mudança no sinal de oxidação do cobre frente a diferentes concentrações de polifenóis .....	24
Figura 3 – Mudança no sinal de oxidação do cobre com o tempo .....	26

## LISTA DE ABREVIATURAS

A: Ampère

Ag/AgCl: Prata/cloreto de prata

Al: Alumínio

Cu: Cobre

DA: Doença de Alzheimer

DMSO: Dimetilsufóxido

EGCG: (-)-epigallocatequina-3-galato

ERO: Espécies reativas de oxigênio

Fe: Ferro

GPES: *General-purpose electrochemical analysis system*

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Dihidrogênio-fosfato de potássio

MTDL: *Multi target direct ligand*

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: Hidrogenofosfato disódico

pH: Potencial hidrogeniônico

Rpm: Rotações por minuto

V: Volts

VPD: Voltametria de pulso diferencial

Zn: Zinco

β-amiloide: Beta-amiloide

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	15
2.1 Instrumentação .....	15
2.2 Reagentes .....	15
2.3 Preparação das amostras .....	16
2.4 Preparação do eletrodo de pasta de carbono (EPC) .....	16
2.5 Medidas experimentais .....	16
2.5.1 Voltametria de pulso diferencial (VPD) para a oxidação eletroquímica do Cu (II) .....	17
2.5.2 Interação entre os polifenóis e o cobre .....	17
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	18
3.1 Comportamento do Cu em solução .....	18
3.2 Análise eletroquímica do poder quelante dos polifenóis frente ao Cu	19
3.3 Interações entre Cu e polifenóis com o tempo .....	25
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	27
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	28

## 1 INTRODUÇÃO

Alguns metais de transição tem um papel importantíssimo como cofatores em uma variedade de enzimas oxiredutases encontradas em humanos. Além disso, eles tem participação em neurotransmissores (OPAZO *et al.*, 2014) e processos de transporte e metabólicos (KAPLAN *et al.*, 2009). Desta maneira, alguns metais como o cobre (Cu) são considerados nutrientes essenciais e podem ser obtidos através do consumo de alimentos como verduras e algumas amêndoas.

Apesar do corpo humano necessitar destes metais, a desregulação e o consumo exagerado podem resultar em danos oxidativos irreversíveis e desordens que tem efeitos nocivos sobre o corpo. Existem patologias documentadas, tais qual a Doença de Wilson, onde a toxicidade primária do Cu está associada a hipoceruloplasmina (HAYASHI *et al.*, 2013). No cérebro, um acréscimo de três a cinco vezes na concentração de Cu tem sido documentado em pacientes diagnosticados com a Doença de Alzheimer (DA), onde os depósitos deste meta são geralmente encontrados próximos ou dentro dos agregados de beta-amiloide ( $\beta$ -amiloide) (LOVELL *et al.*, 1998). O mecanismo de toxicidade do Cu inclui sua habilidade em iniciar reações químicas de oxirredução que promovem, então, a redução deste metal e a produção de  $H_2O_2$  e outras espécies reativas de oxigênio (ERO) pela catálise do  $O_2$  (BALLAND *et al.*, 2010).

Com o conhecimento desta toxicidade de metais como o Cu, o uso de moléculas antioxidantes parece ser a opção mais viável para o tratamento do dano oxidativo causado por tais metais, já que eles possuem a propriedade de reagir preferencialmente com as ERO (NOGUCHI *et al.*, 2000). Os flavonoides são uma classe de moléculas que possuem características como modulação de enzimas e de caminhos metabólicos para a diminuição da produção excessiva de ERO, além de possuírem baixa toxicidade no cérebro, o que leva esta classe a ser uma das mais pesquisadas na busca de agentes neuroprotetores (DAJAS *et al.*, 2003).

Moléculas com características antioxidantes são geralmente estruturas polifenólicas e podem ser encontradas em uma variedade de produtos consumidos

ao redor do planeta. Um exemplo é o ácido ascórbico (vitamina C) das frutas cítricas,  $\beta$ -caroteno das cenouras, (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG) do chá verde e o resveratrol das uvas (NODA *et al.*, 1997, BLOCK *et al.*, 1992, BOVERIS *et al.*, 1998, BERGMAN *et al.*, 2003). Corroborando com suas características antioxidantes, muitas destas moléculas mostram potentes propriedades quelantes, conferindo a elas vantagens em relação a outras moléculas de atividade semelhante frente às toxicidades associadas aos metais nas doenças neurodegenerativas. Na doença de Alzheimer, foi mostrado que o Cu promove o acúmulo de  $\beta$ -amiloide e a neuroinflamação. Também foi documentado que os depósitos de Cu nos cérebros de indivíduos com a doença de Alzheimer são mais lábeis quando comparados com aqueles em cérebros de indivíduos sadios (SINGH *et al.*, 2013). Isto leva subsequentemente a mais dano oxidativo nos tecidos adjacentes aos depósitos de amiloide. Pesquisa feita com compostos polifenólicos capazes de minimizar estes efeitos mostrou que o resveratrol foi capaz de promover a fibrilação dos complexos entre Cu e  $\beta$ -amiloide mais efetivamente do que complexos com outros metais como Fe, Zn e Al. Os autores explicaram que poderia ser o efeito da forte afinidade entre o Cu e o resveratrol levando à modulação da estrutura do complexo (GRANZOTTO *et al.*, 2011). Além do mais, já foi reportado que o resveratrol pode inibir a apoptose e inflamação dos neurônios e melhorar as funções cognitivas nas doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington (GRANZOTTO *et al.*, 2014, TOMÉ-CARNEIRO *et al.*, 2013).

Uma nova metodologia no desenvolvimento de drogas para o tratamento de doenças neurodegenerativas foi o agrupamento de compostos com conhecido comportamento neuroprotetor para criar o que se chamou de ligante direto de alvos múltiplos (MTDL, do inglês *multi target direct ligand*) que pode responder ao ataque multifacetado destas doenças. Em estudo feito por Mao *et al.*, os autores demonstraram que uma nova molécula formada pela combinação de resveratrol e clioquinol (um conhecido agente quelante metálico) foi capaz de agir como um quelante bimetálico, um antioxidante com potencial comparado ao Trolox e um inibidor da agregação da  $\beta$ -amiloide (MAO *et al.*, 2014). Similar ao resveratrol, o clioquinol tem demonstrado apresentar efeitos neuroprotetores pela promoção da degradação dos agregados de amiloide e os complexos desta com o cobre. Devido ao seu sucesso em pesquisas com animais (MATLACK *et al.*, 2014), o clioquinol,

juntamente com seu derivado PTB2, atingiu o estágio de testes clínicos e continua a ser estudado *in vitro* na busca de outras propriedades neuroprotetoras (FAUX *et al.*, 2010).

Outro composto polifenólico natural que aparenta ter promissora atividade antioxidante é o (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG). Este composto é abundantemente encontrado no chá verde, juntamente com outras catequinas as quais também apresentam propriedades antioxidante e anti-inflamatória. Existem dois mecanismos propostos para o modo de ação do EGCG: o primeiro onde sua habilidade de remover os radicais superóxidos formados ocorre durante a reação de redução do íon férrico ( $Fe^{3+}$ ) ao íon ferroso ( $Fe^{2+}$ ), e o segundo através da sua habilidade de remover o excesso de Fe por quelação, reduzindo assim o seu potencial dano oxidativo (WEINREB *et al.*, 2009). Como a toxicidade do extrato do chá verde não é documentada e a facilidade de obtenção deste antioxidante é grande, ele também tem sido uma escolha popular no estudo de outras funções neuroprotetoras. Pelos mesmos motivos, a baicaleína, encontrada nas raízes da planta *Scutellaria baicalensis*, também tem sido um composto a ser testado para funções neuroprotetoras, já que ele possui a habilidade de reduzir os níveis de  $\beta$ -amilóide em ratos modelo com a doença de Alzheimer (Tg2576) (ZHANG *et al.*, 2013).

Conforme mais informação surge no mundo científico para discussão de novos antioxidantes, nasce também a necessidade de um ensaio simples de ser utilizado e com baixo custo para mensurar a capacidade da criação antioxidante ou quelante das potenciais moléculas terapêuticas. Avanços recentes na eletroquímica permitiram o uso de plataformas eletroquímicas de variados modos na caracterização de polifenóis encontrados em diversas amostras (PORFÍRIO *et al.*, 2014, NOVAK *et al.*, 2009, CORDUNEANU *et al.*, 2006). Em tais estudos, também foi mostrado que o potencial antioxidante da amostra estava correlacionado com o conteúdo polifenólico que tal apresentava. Diversos compostos, tais como EGCG, clioquinol e baicaleína (NEMCOVA *et al.*, 2012, XIANG *et al.*, 2009, ZHANG *et al.*, 2013, VESTERGAARD *et al.*, 2005, ZHANG *et al.*, 2013, ZHOU *et al.*, 2012) tiveram seus perfis eletroquímicos analisados tanto em soluções tampões quanto em matrizes complexas. Contudo, flutuações no seu comportamento eletroquímico em condições oxidantes ou com altas concentrações de metal podem levar estes

compostos a se auto oxidarem com o tempo (NOVAK *et al.*, 2009). Assim, a sua concentração pode ser menor no momento da análise e seu potencial como quelante pode não ser efetivamente mensurado.

Este trabalho, realizado em parceria com o laboratório do professor Kagan Kerman, Universidade de Toronto, e presentemente submetido à revista *Current Alzheimer Research*, apresentará uma plataforma eletroquímica com um ensaio que visa determinar a habilidade quelante de Cu dos seguintes polifenóis bem conhecidos: resveratrol, clioquinol, EGCG e baicaleína. Seus potenciais terapêuticos serão comparados através do monitoramento da mudança do sinal de oxidação do Cu antes e depois da sua interação com os flavonoides em diversas concentrações e durante um período de 24 h. Os parâmetros experimentais foram otimizados para a detecção do Cu na amostra e, então, aplicado durante todo o estudo.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Instrumentação

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando equipamento Autolab PGSTAT302N (Methrom, Autolab, Utrecht, Holanda) e analisadas por meio de um sistema de análise geral para fins eletroquímicos (GPES, do inglês *General-purpose electrochemical analysis system*), O sistema estava dotado por um arranjo de três eletrodos, consistindo de um eletrodo de pasta de carbono (diâmetro interno de 3 mm), um fio de platina como contra eletrodo e um eletrodo de Ag/AgCl como eletrodo de referência, todos obtidos de CH Instruments (Austin, USA). Para as incubações, um agitador com incubadora de microplacas VWR symphony (VWR International, Mississauga, Canada) foi utilizado, com rotação de 210 rpm a 37 °C a menos que especificado de outra forma.

### 2.2 Reagentes

Resveratrol (3,5,4'-trihidroxi-trans-estilbeno) e clioquinol (5-cloro-7-iodo-quinolin-8-ol) foram obtidos de Calbiochem (Etobicoke, ON). EGCG ((2R,3R)-5,7-dihidroxi-2-(3,4,5-trihidroxifenil)-3,4-dihidro-2H-1-benzopiran-3-il 3,4,5-triidroxibenzoato) e baicaleína (5,6,7-trihidroxiflavona) foram obtidos de Sigma-Aldrich (Oakville, ON) e scyllo-inositol ((1R,2R,3R,4R,5R,6R)-Cyclohexano-1,2,3,4,5,6-hexol) foi obtido de Tokyo Chemical Industry (Portland, OR). Cloreto de cobre (II) dihidratado, pó de grafite (< 20 µm, sintético), óleo mineral, dimetilsulfóxido, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> foram obtidos de Sigma-Aldrich (Oakville, ON). Todos os reagentes eram de grau analítico e foram utilizados sem prévias

purificações. Todas as soluções aquosas foram preparadas utilizando água ultrapura (18,2 M $\Omega$ ·cm) obtida de um sistema de purificação Millipore Milli-Q.

### **2.3 Preparação das amostras**

Uma solução estoque de 5 mM de Cu (II) foi preparada em água deionizada e guardada ao abrigo da luz. As soluções estoque de 5 mM dos polifenóis foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e guardadas sob refrigeração a -20 °C até o momento da utilização. Todas as soluções de trabalho foram preparadas a partir da solução estoque com diluição em solução tampão fosfato de 50 mM (pH 5,5) e guardadas a 4 °C.

### **2.4 Preparação do Eletrodo de Pasta de Carbono (EPC)**

A pasta de carbono foi preparada utilizando uma proporção de 3:2 em massa de pó de grafite e óleo mineral. Os constituintes da mistura foram homogeneizados até a obtenção de uma pasta grossa e lisa e então empacotados em um corpo de eletrodo com 3 mm de diâmetro interno. A superfície do eletrodo de trabalho foi renovada e polida entre cada experimento em papel de pesagem a fim de evitar contaminação cruzada.

## 2.5 Medidas Experimentais

### 2.5.1 Voltametria de pulso diferencial (VPD) para a oxidação eletroquímica do Cu (II)

O uso da VPD já se mostrou um método mais sensível para a detecção da oxidação do Cu (II) com o uso de EPC (SOARES *et al.*, 1995). As soluções de trabalho foram preparadas através da diluição da solução estoque de Cu (II) em tampão fosfato de 50 mM (pH 5,5) para se obter a concentração desejada. As soluções então foram analisadas utilizando VPD com uma janela de potencial variando de -0,25 V até 0,40 V vs. Ag/AgCl com um degrau de potencial de 5 mV e uma amplitude de modulação de 25 mV. O valor de corrente, em Ampères, dado pela altura do pico foi plotado em um gráfico contra a concentração das soluções de Cu (II), em mol·L<sup>-1</sup>, para obtenção de uma curva de calibração.

### 2.5.2 Interação entre os polifenóis e o cobre

Para as medidas de incubação, soluções de 5 µM de Cu (II) e concentrações equimolares de polifenóis foram incubadas juntas, a 37 °C por 4 h, com agitação. Para as análises, alíquotas eram removidas das soluções em incubação e medidas usando as condições mencionadas no item 2.5.1. As mudanças de intensidade de sinal do pico de oxidação do Cu eram monitoradas conforme as medidas eram realizadas nos diferentes intervalos de tempo.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Primeiramente, a avaliação do comportamento do Cu em solução foi realizada. A seguir, a interação do Cu com os flavonoides foi analisada utilizando eletrodos de pasta de carbono, tanto em condições de aumento da concentração de flavonoides quanto num período de tempo de 24 h com incubação.

#### 3.1 Comportamento do Cu em solução

A concentração de Cu foi variada em incrementos não-lineares a fim de determinar o comportamento dos eletrodos em uma grande faixa de concentração do metal. Era de se esperar que um aumento não-linear na concentração de Cu deveria refletir em um aumento não-linear no sinal de oxidação do Cu. Como mostrado na figura 1, a resposta da corrente gerada através da oxidação do Cu na faixa dos nanomolares e micromolares aumentou de forma exponencial e demonstrou que o eletrodo de pasta de carbono respondeu de forma satisfatória, tanto em níveis baixos e altos de Cu. O desempenho de tais eletrodos ou de eletrodos com tipos similares de materiais na detecção de íons metálicos como o cobre já foram estudados no passado em condições similares às utilizadas neste estudo.

Por exemplo, Lin *et al* (Lin *et al.*, 2009), utilizando um eletrodo de pasta de carbono modificado com um co-politiofeno reportaram uma resposta linear frente ao sucessivo aumento na concentração de Cu na faixa dos micromolares. Além do mais, o potencial de oxidação do Cu (II) ao Cu (III) tem sido observado em potenciais ao redor de 0,2 V (vs. Ag/AgCl) nas condições experimentais apresentadas, o que foi congruente com o potencial de pico encontrado entre 0,15 V e 0,25 V (vs Ag/AgCl) em um eletrodo de ouro modificado com cisteína por Liu *et al* (LIU *et al.*, 1999) e um eletrodo de pasta de carbono baseado em parafina sólida por

Silva *et al* (SILVA *et al.*, 2011), respectivamente. No caso do trabalho feito por Silva *et al* (SILVA *et al.*, 2011), outra técnica eletroquímica conhecida como voltametria de redissolução anódica foi utilizada para a determinação do Cu.

Contudo, esta técnica requer uma etapa de pré-concentração do íon na superfície do eletrodo, o que pode levar a análises mais trabalhosas e mais demoradas. Estas características podem ser fatores inconvenientes na adaptação de um método para uso futuro que seja barato e produtivo na determinação de flavonoides durante desenvolvimento de novos medicamentos.

Os eletrodos de pasta de carbono utilizados neste trabalho se mostraram efetivos na detecção do Cu sem a etapa de pré-concentração, o que possibilitou o seu uso na investigação do poder quelante dos flavonoides escolhidos.

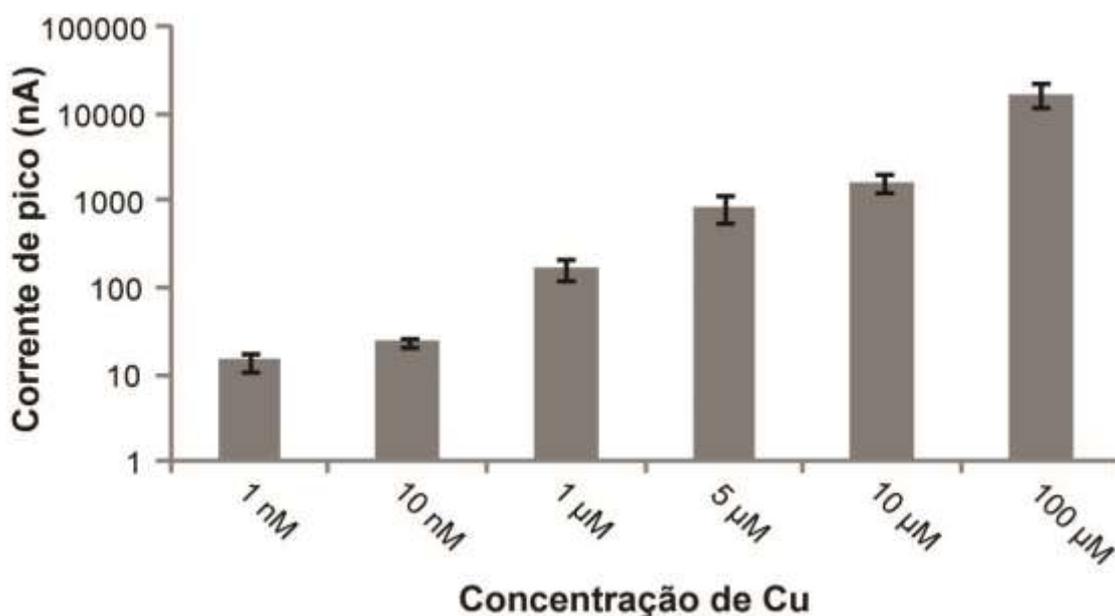


Figura 1 - Valores da corrente de pico para os experimentos de voltametria de pulso diferencial, os quais refletem a mudança no sinal de oxidação do Cu em diferentes concentrações. As medidas foram realizadas em tampão fosfato 50 mM (pH 5.5) e as barras de erro representam o desvio padrão para medidas em triplicata (n=3). As demais condições são as mesmas descritas na seção 2.5.1

### 3.2 Análise eletroquímica do poder quelante dos polifenóis frente ao Cu

A interação entre os flavonoides e o Cu foi inicialmente estudada aumentando a razão molar entre ambos. As mudanças observadas na corrente e no potencial de oxidação do Cu na presença de diferentes flavonoides estão mostradas na Figura 2. Foi, então, sugerida a hipótese de que com a adição de um forte quelante metálico a disponibilidade de Cu livre que poderia sofrer reação de oxirredução na superfície do eletrodo deveria diminuir. Assim sendo, o mais forte quelante escolhido deveria produzir a maior diminuição na corrente de oxidação conforme a razão molar fosse aumentada. As mudanças observadas no sinal de oxidação mostraram que EGCG, resveratrol e clioquinol foram eficientes na quelação do Cu.

Conforme observado nos experimentos realizados anteriormente, a análise de soluções de 5  $\mu\text{M}$  de Cu indicaram que o valor da corrente estava na parte inferior da faixa dos  $\mu\text{A}$  (conforme mostrado pela figura 1). Com a adição de polifenóis efetivos na quelação do cobre, a intensidade da corrente foi diminuída em valores entre 0,8  $\mu\text{A}$  e 0,4  $\mu\text{A}$ . Na presença de 10  $\mu\text{M}$  de resveratrol, o sinal de oxidação do Cu teve seu valor diminuído a 0,52  $\mu\text{A}$ . A intensidade do sinal continuou a diminuir conforme a concentração de resveratrol era aumentada para 25  $\mu\text{M}$  (1:5, Cu:polifenol), 50  $\mu\text{M}$  (1:10), 75  $\mu\text{M}$  (1:15) e 100  $\mu\text{M}$  (1:20). A mudança mais proeminente foi observada com a concentração de 100  $\mu\text{M}$  de resveratrol, quando um valor de corrente de 0,11  $\mu\text{A}$  exemplificou a forte habilidade quelante frente ao cobre deste polifenol natural. Conforme o observado, pode sugerir-se que quanto maior o decréscimo no sinal de oxidação do Cu, mais forte é a habilidade quelante do composto frente ao cobre. Na mais baixa concentração de 10  $\mu\text{M}$  de polifenol, o mais potente quelante mostraria o menor sinal de oxidação do Cu. Levando isto em consideração, foi descoberto que sob estas condições experimentais o EGCG foi o mais forte quelante de Cu já que uma razão de 1:2 promoveu a redução do sinal em aproximadamente 0,45  $\mu\text{A}$ . Este resultado está em concordância com estudos realizados anteriormente, os quais discutiram o potencial do EGCG como quelante de íons metálicos (ZHANG *et al.*, 2013, DE SOUZA *et al.*, 2005). Em estudos com espectrometria de UV-Vis, Zhang *et al* (ZHANG *et al.*, 2013) reportaram uma mudança espectral induzida pela presença do Cu em interação com o EGCG, na

qual o pico de absorvância característico em aproximadamente 320 nm diminuiu conforme o aumento da concentração de Cu. O trabalho também reportou que o tempo de interação entre as duas espécies era curto, contribuindo assim para a noção de que o EGCG era um forte quelante do Cu. Além do mais, um pico de ombro em aproximadamente 0,35 V (vs Ag/AgCl) foi observado em todos os voltamogramas das soluções de Cu-EGCG e seguiu o mesmo padrão de diminuição de sinal do Cu conforme a concentração de EGCG era aumentada. Este pico de ombro já foi mostrado por diversos outros grupos, notadamente por Novak *et al* (NOVAK *et al.*, 2009) onde estes descreveram a ocorrência do mesmo pela oxidação do próprio EGCG conforme o pH da solução era aumentado. A mudança observada nestes experimentos pode ser explicada pela diminuída disponibilidade do EGCG para ser oxidado na superfície do eletrodo após a complexação com o Cu ou então esta pode variar devido as mudanças no pH da solução conforme mais EGCG é titulado na solução. Assim sendo, os dois picos de oxidação eram resolvidos o suficiente para mostrar a mudança na oxidação do Cu frente às mudanças nas concentrações de EGCG.

O clioquinol foi outro polifenol que exemplificou as promissoras habilidades de agente neuroprotetor por possuir propriedades de quelante metálico. Como discutido previamente, íons metálicos como Cu, Zn e Fe têm sido encontrados em abundância nas regiões de depósitos de  $\beta$ -amiloide. Em um trabalho feito por Cherny *et al* (CHERNY *et al.*, 2001), um decréscimo de 49% dos depósitos de  $\beta$ -amiloide foi observado quando ratos transgênicos receberam administração de clioquinol durante um período de 9 semanas. A estrutura do complexo formado entre Cu e clioquinol já foi demonstrada por Pushie *et al* (PUSHIE *et al.*, 2014), trabalho no qual os autores descreveram que a vantagem adicional do clioquinol no tratamento da DA pode ser devido à alta lipofilicidade do ligante livre e suas propriedades de quelante metálico. Logo, é reafirmado o potencial do clioquinol como um agente terapêutico viável no tratamento da acumulação de íons metálicos e um composto que deve ser utilizado neste estudo a fim de estabelecer uma plataforma eletroquímica que permita estudar novos compostos fenólicos no futuro os quais talvez possuam habilidades quelantes frente ao Cu. Neste estudo eletroquímico, o clioquinol também foi capaz de diminuir o sinal de oxidação do Cu conforme sua concentração era aumentada, o que demonstrou sua habilidade de quelar o Cu. Em comparação a

outros fortes quelantes como resveratrol e EGCG, o clioquinol necessitou maiores concentrações para desenvolver a mesma diminuição no sinal do Cu. Isto pode ser explicado pela menor quantidade de grupos funcionais hidroxila no clioquinol quando comparado com resveratrol e EGCG, característica essa pivô na habilidade de um composto quelar metais. No caso do clioquinol, uma maior razão Cu:polifenol seria necessária para obter o mesmo número de sítios quelantes quando comparado com o resveratrol e EGCG a fim de diminuir o sinal de oxidação do Cu na mesma extensão.

De modo contrário, a baicaleína mostrou comportamento inverso na habilidade de quelar o cobre quando comparado com os outros polifenóis analisados neste estudo. Um trabalho anterior realizado por Vestergaar *et al* (VESTERGAARD *et al.*, 2005) sugeriu uma possível razão de ligação de 1:6 para a baicaleína e conclui que, apesar de esta já ter sido demonstrada como um forte quelante para o Fe (SQUITTI *et al.*, 2009, ŘÍHA *et al.*, 2014), a habilidade de quelar o Cu é insignificante quando comparada com outros polifenóis, como catequina-galato e quercertina. Indo além, seria de se esperar uma diminuição na corrente sugerindo que houve a quelação, porém o que se observou foi que conforme a concentração de baicaleína era aumentada, também aumentava a intensidade da corrente. Esse comportamento oposto pode ser o resultado de condições não ideais para a interação entre baicaleína e Cu. Outros estudos notaram uma dependência desta com o pH, onde ambientes mais ácidos promoveram a quelação do Cu (ŘÍHA *et al.*, 2014). É possível que para melhor determinação da habilidade quelante de flavonoides similares a baicaleína, uma mudança nas condições de pH do meio possa ser considerada. Contudo, esta mudança na acidez pode não coincidir com as condições ideais de funcionamento dos eletrodos de pasta de carbono para determinação do Cu (KUMAR JENA *et al.*, 2008, YUAN *et al.*, 2012, RAMAN *et al.*, 2005). Deste modo, em pesquisas futuras, novos materiais para eletrodos ou modificações na superfície poderão ser aplicados para determinação de tais compostos.

Como um controle negativo para tais experimentos, um estereoisômero do inositol, scyllo-inositol, foi escolhido já que não demonstra possuir quaisquer propriedades de quelante metálico. Esta molécula foi recentemente popular na área da terapida da DA por mostrar proeminentes propriedades de modulação da

formação de peptídeos de  $\beta$ -amiloide (DA SILVA *et al.*, 2010, MCLAURIN *et al.*, 2000, FENILI *et al.*, 2007). Apesar de ter sido direcionada diretamente para estudos clínicos como possível droga terapêutica na DA, seu modo de ação ainda não foi documentado como sendo pela quelação de íons metálicos. Assim sendo, é esperado que com o aumento da concentração de scyllo-inositol não ocorra mudança na oxidação do Cu. Mostrado na parte inferior da figura 2, o sinal da corrente de pico não possui qualquer perfil, seja de aumento ou diminuição, a ponto de sugerir um processo de quelação entre Cu e scyllo-inositol. Mais, os voltamogramas mostrados a direita não mostram o surgimento de um pico adicional que poderia sugerir interação. Estas observações estão de acordo com a inabilidade de uma pequena molécula de açúcar agir como quelante de Cu.

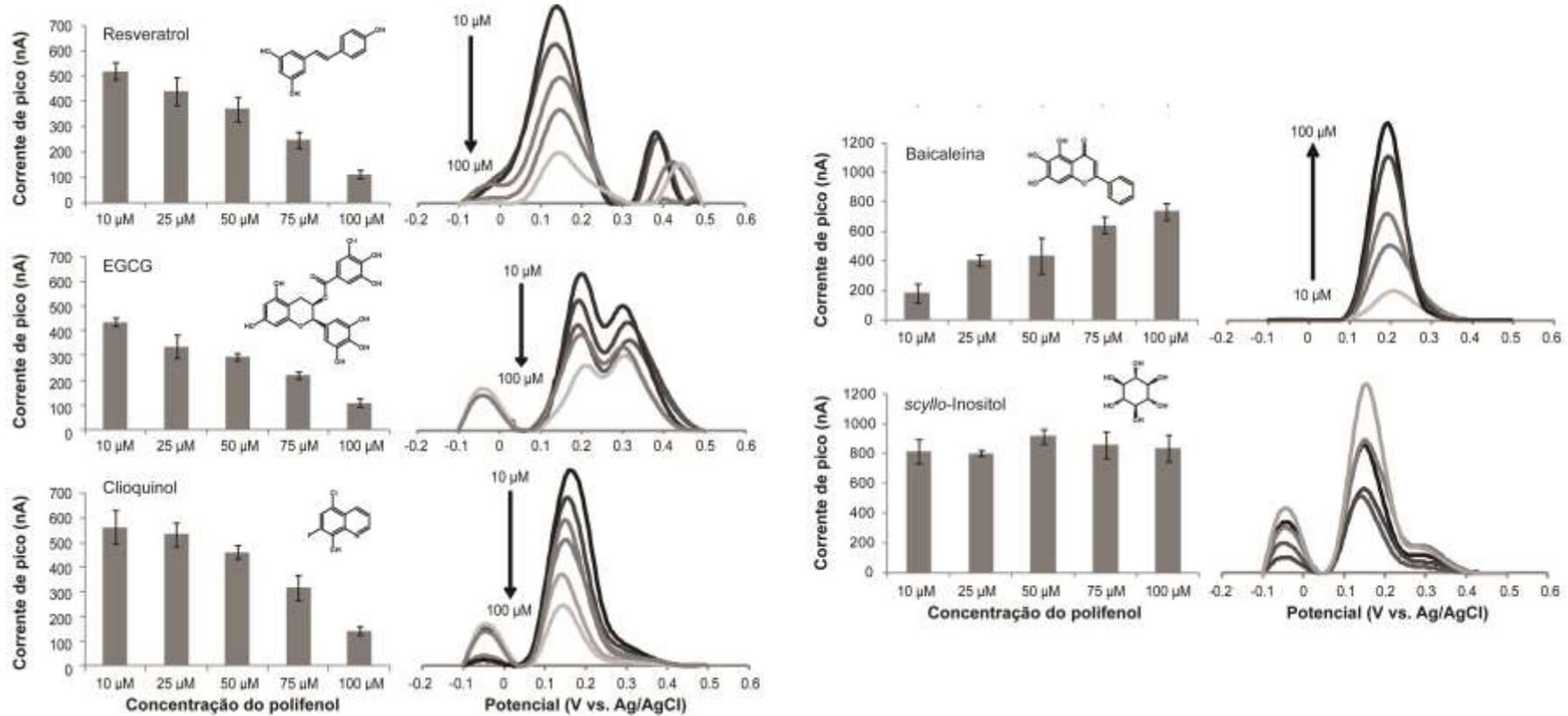


Figura 2 - Mudança no sinal de oxidação do Cu após 24 h na presença de resveratrol, EGCG, clioquinol, baicaleína ou scyllo-inositol. Os valores da corrente de pico estão mostrados mais a esquerda, onde as barras de erro indicam o desvio padrão de medidas em triplicata (n=3). Os voltamogramas de pulso diferencial associados a cada polifenol estão mostrados mais a direita. Todas as medidas foram realizadas em tampão fosfato 50 mM (pH 5.5) a 37 °C, sob agitação. As demais condições são as mesmas descritas na seção 2.5.1.

### 3.3 Interações entre Cu e polifenóis com o tempo

A habilidade de cada flavonoide quelar o Cu em um período de 24 h também foi testada usando este método. Os experimentos anteriores nos quais diferentes concentrações de flavonoides foram testadas utilizaram um período de incubação de um dia. Contudo, a habilidade de quelante de uma molécula também pode ser comparada pelo tempo necessário para produzir uma mudança observável no sinal de oxidação do Cu. O sinal de oxidação do cobre observado nos períodos de 0, 6, 12, 18 e 24 h está mostrado na figura 3. Concentrações equimolares de Cu e flavonoides foram utilizadas já que permitem uma interpretação mais simples e a comparação de qual molécula foi o mais potente quelante do Cu. Como esperado, os quelantes mais fortes encontrados neste estudo foram também aqueles que necessitaram a menor quantidade de tempo para diminuir o sinal de oxidação do Cu. Similar às características observadas na figura 2, EGCG foi o mais potente, seguido então pelo resveratrol e clioquinol. Para o EGCG e resveratrol, 6 h foram suficientes para determinar se houve alguma interação. Contudo, para o clioquinol, somente a partir do período de 12 h houve uma diminuição observável no sinal de oxidação do Cu. O potencial dos três flavonoides mencionados concordou com o encontrado no estudo eletroquímico realizado neste trabalho e também por outros grupos (GÜLÇİN *et al.*, 2010, BURKITT *et al.*, 2000, BELGUENDOZ *et al.*, 1997, RITCHIE *et al.*, 2003). Mais uma vez, a baicaleína não demonstrou quaisquer propriedades quelante frente ao Cu nestas condições, comportando-se da mesma maneira que o scyllo-inositol, o qual também não demonstrou quaisquer características quelante do Cu no período de 24 h.

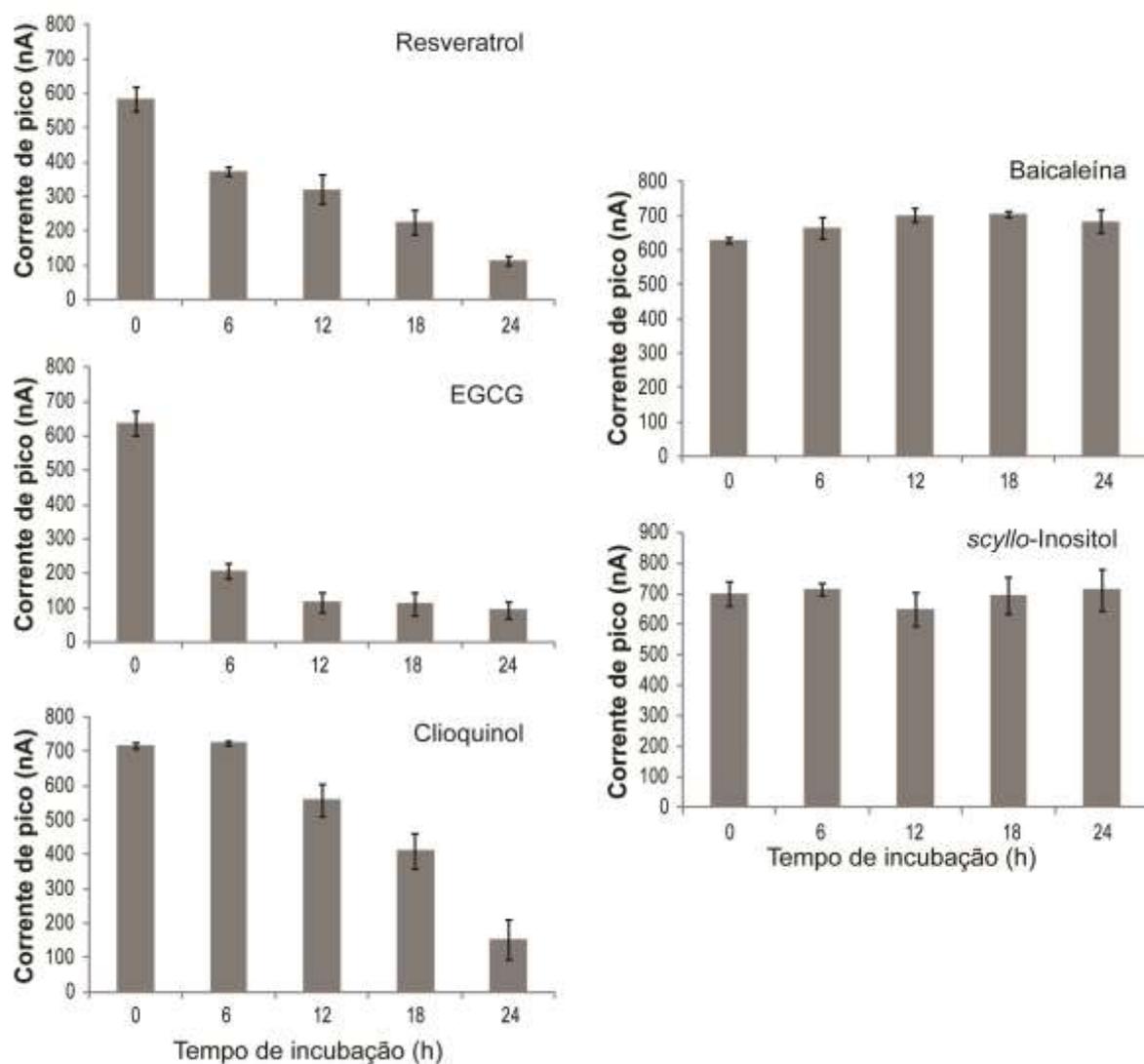


Figura 3 - Mudança no sinal de oxidação do Cu ao longo do tempo na presença de resveratrol, EGCG, clioquinol, baicaleína ou scyllo-inositol. As medidas foram realizadas em tampão fosfato 50 mM (pH 5,5) e as barras de erro indicam o desvio padrão de experimentos em triplicata (n=3). As demais condições são as mesmas descritas na seção 2.5.1.

## 4 CONCLUSÃO

A análise eletroquímica do Cu em amostras contendo importantes flavonoides em diferentes concentrações foi realizada a fim de estabelecer uma metodologia que buscava provar a habilidade quelante de cobre destas moléculas que possuem potenciais terapêuticos.

Os flavonoides foram escolhidos com base na literatura que mostrava que tais moléculas possuíam uma ou ambas as características de ligantes metálicos e agentes neuroprotetores contra doenças neurodegenerativas como Doença de Alzheimer e Parkinson.

O trabalho apresentado apresenta de modo pioneiro um ensaio que utilizou a sensibilidade da detecção eletroquímica para íons metálicos em solução na determinação das características quelantes de compostos polifenólicos naturais.

Foi mostrada a diferença no sinal de oxidação do Cu em ambos os casos onde foi variada a concentração do polifenol e num período de 24 h de incubação.

Os resultados sugeriram que o potencial quelante de Cu dos flavonoides segue a seguinte ordem onde EGCG > resveratrol > clioquinol > baicaleína – scyllo-inositol.

Foi descoberto que os grupamentos hidroxila tem um papel fundamental na habilidade dos flavonoides de diminuir o sinal de oxidação do Cu, resultados esses concordantes com outros estudos presentes na literatura.

O método desenvolvido é facilmente utilizado, barato e poderá ser empregado no futuro para investigação até mesmo de novos compostos sintéticos que possuam características similares a dos compostos naturais aqui estudados.

## 5 REFERÊNCIAS

BALLAND, Véronique; HUREAU, Christelle; SAVÉANT, Jean-Michel. Electrochemical and homogeneous electron transfers to the Alzheimer amyloid- $\beta$  copper complex follow a preorganization mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 40, p. 17113-17118, 2010.

BELGUENDOZ, Leila; FREMONT, Lucie; LINARD, Alain. Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins. **Biochemical pharmacology**, v. 53, n. 9, p. 1347-1355, 1997.

BERGMAN, Margalit et al. Scavenging of reactive oxygen species by a novel glucurinated flavonoid antioxidant isolated and purified from spinach. **Phytochemistry**, v. 62, n. 5, p. 753-762, 2003.

BLOCK, Gladys. The data support a role for antioxidants in reducing cancer risk. **Nutrition Reviews**, v. 50, n. 7, p. 207-213, 1992.

BOVERIS, Alejandro D.; PUNTARULO, Susana. Free-radical scavenging actions of natural antioxidants. **Nutrition research**, v. 18, n. 9, p. 1545-1557, 1998.

BURKITT, Mark J.; DUNCAN, James. Effects of *trans*-Resveratrol on Copper-Dependent Hydroxyl-Radical Formation and DNA Damage: Evidence for Hydroxyl-Radical Scavenging and a Novel, Glutathione-Sparing Mechanism of Action. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 381, n. 2, p. 253-263, 2000.

CHERNY, Robert A. et al. Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits  $\beta$ -amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. **Neuron**, v. 30, n. 3, p. 665-676, 2001.

CORDUNEANU, Oana; JANEIRO, Patricia; BRETT, Ana Maria Oliveira. On the electrochemical oxidation of resveratrol. **Electroanalysis**, v. 18, n. 8, p. 757-762, 2006.

DAJAS, F. et al. Neuroprotection by flavonoids. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 12, p. 1613-1620, 2003.

DASILVA, Kevin A.; SHAW, James E.; MCLAURIN, JoAnne. Amyloid- $\beta$  fibrillogenesis: structural insight and therapeutic intervention. **Experimental neurology**, v. 223, n. 2, p. 311-321, 2010.

DE SOUZA, Rubens FV; DE GIOVANI, Wagner F. Synthesis, spectral and electrochemical properties of Al (III) and Zn (II) complexes with flavonoids. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 61, n. 9, p. 1985-1990, 2005.

FAUX, Noel G. et al. PBT2 rapidly improves cognition in Alzheimer's Disease: additional phase II analyses. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, n. 2, p. 509-516, 2010.

FENILI, Daniela et al. Properties of scyllo-inositol as a therapeutic treatment of AD-like pathology. **Journal of Molecular Medicine**, v. 85, n. 6, p. 603-611, 2007.

GRANZOTTO, Alberto; ZATTA, Paolo. Resveratrol acts not through anti-aggregative pathways but mainly via its scavenging properties against A $\beta$  and A $\beta$ -metal complexes toxicity. **PloS one**, v. 6, n. 6, p. e21565, 2011.

GRANZOTTO, Alberto; ZATTA, Paolo. Resveratrol and Alzheimer's disease: message in a bottle on red wine and cognition. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 6, 2014.

GÜLÇİN, İlhami. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 210-218, 2010.

HAYASHI, Hisao et al. Various copper and iron overload patterns in the livers of patients with Wilson disease and idiopathic copper toxicosis. **Medical molecular morphology**, v. 46, n. 3, p. 133-140, 2013.

KAPLAN, Jack H.; LUTSENKO, Svetlana. Copper transport in mammalian cells: special care for a metal with special needs. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 38, p. 25461-25465, 2009.

KUMAR JENA, Bikash; RETNA RAJ, C. Gold nanoelectrode ensembles for the simultaneous electrochemical detection of ultratrace arsenic, mercury, and copper. **Analytical chemistry**, v. 80, n. 13, p. 4836-4844, 2008.

LIU, An-Chiang et al. Application of cysteine monolayers for electrochemical determination of sub-ppb copper (II). **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 8, p. 1549-1552, 1999.

LOVELL, M. A. et al. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. **Journal of the neurological sciences**, v. 158, n. 1, p. 47-52, 1998.

MAO, Fei et al. New multi-target-directed small molecules against Alzheimer's disease: a combination of resveratrol and clioquinol. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 12, n. 31, p. 5936-5944, 2014.

MATLACK, Kent ES et al. Clioquinol promotes the degradation of metal-dependent amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) oligomers to restore endocytosis and ameliorate  $A\beta$  toxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 11, p. 4013-4018, 2014.

MCLAURIN, JoAnne et al. Inositol stereoisomers stabilize an oligomeric aggregate of Alzheimer amyloid  $\beta$  peptide and inhibit  $A\beta$ -induced toxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 24, p. 18495-18502, 2000.

NEMCOVA, Lenka; BAREK, Jiri; ZIMA, Jiri. Determination of Trans-Resveratrol Using Voltammetric and Amperometric methods at Carbon Fiber Rod Electrode and Carbon Paste Electrode. **Int. J. Electrochem. Sci**, v. 7, p. 9221-9231, 2012.

NODA, Yasuko et al. Hydroxyl and superoxide anion radical scavenging activities of natural source antioxidants using the computerized JES-FR30 ESR spectrometer system. **IUBMB Life**, v. 42, n. 1, p. 35-44, 1997.

NOGUCHI, Noriko; WATANABE, Akira; SHI, Honglian. Diverse functions of antioxidants. **Free radical research**, v. 33, n. 6, p. 809-817, 2000.

NOVAK, Ivana; ŠERUGA, Marijan; KOMORSKY-LOVRIĆ, Šebojka. Electrochemical Characterization of Epigallocatechin Gallate Using Square-Wave Voltammetry. **Electroanalysis**, v. 21, n. 9, p. 1019-1025, 2009.

OPAZO, Carlos M.; GREENOUGH, Mark A.; BUSH, Ashley I. Copper: from neurotransmission to neuroproteostasis. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 6, 2014.

PORFÍRIO, Demóstenes Amorim et al. Electrochemical study of the increased antioxidant capacity of flavonoids through complexation with iron (II) ions. **Electrochimica Acta**, v. 141, p. 33-38, 2014.

PUSHIE, M. Jake et al. The solution structure of the copper clioquinol complex. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 133, p. 50-56, 2014.

RAMAN, Bakthisaran et al. Metal ion-dependent effects of clioquinol on the fibril growth of an amyloid  $\beta$  peptide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 16, p. 16157-16162, 2005.

ŘÍHA, Michal et al. In vitro evaluation of copper-chelating properties of flavonoids. **RSC Advances**, v. 4, n. 62, p. 32628-32638, 2014.

RITCHIE, Craig W. et al. Metal-protein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting A $\beta$  amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease: a pilot phase 2 clinical trial. **Archives of neurology**, v. 60, n. 12, p. 1685-1691, 2003.

SILVA, Daiane H. et al. Fast and simultaneous determination of Pb<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> in water samples using a solid paraffin-based carbon paste electrode chemically modified with 2-aminothiazole-silica-gel. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 9, p. 1727-1735, 2011.

SINGH, Itender et al. Low levels of copper disrupt brain amyloid- $\beta$  homeostasis by altering its production and clearance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 36, p. 14771-14776, 2013.

SOARES, Helena MVM; VASCONCELOS, M. T. S. D. Potentiometric stripping analysis vs. differential pulse anodic stripping voltammetry for copper (II) analysis at relatively positive deposition potential. **Analytica chimica acta**, v. 303, n. 2, p. 255-263, 1995.

SOARES, Helena MVM; VASCONCELOS, M. T. S. D. Potentiometric stripping analysis vs. differential pulse anodic stripping voltammetry for copper (II) analysis at relatively positive deposition potential. **Analytica chimica acta**, v. 303, n. 2, p. 255-263, 1995.

SQUITTI, Rosanna; SALUSTRI, Carlo. Agents complexing copper as a therapeutic strategy for the treatment of Alzheimer's disease. **Current Alzheimer Research**, v. 6, n. 6, p. 476-487, 2009.

TOMÉ-CARNEIRO, Joao et al. Resveratrol and clinical trials: the crossroad from in vitro studies to human evidence. **Current pharmaceutical design**, v. 19, n. 34, p. 6064, 2013.

VESTERGAARD, Mun'delanji; KERMAN, Kagan; TAMIYA, Eiichi. An electrochemical approach for detecting copper-chelating properties of flavonoids using disposable pencil graphite electrodes: possible implications in copper-mediated illnesses. **Analytica chimica acta**, v. 538, n. 1, p. 273-281, 2005.

WEINREB, Orly et al. Neuroprotective molecular mechanisms of (-)-epigallocatechin-3-gallate: a reflective outcome of its antioxidant, iron chelating and neuritogenic properties. **Genes & nutrition**, v. 4, n. 4, p. 283-296, 2009.

XIANG, Hai Yan; LI, Wei Guo. Electrochemical Sensor for trans-Resveratrol Determination Based on Indium Tin Oxide Electrode Modified with Molecularly Imprinted Self-Assembled Films. **Electroanalysis**, v. 21, n. 10, p. 1207-1210, 2009.

YUAN, Xiujuan et al. Functionalized graphene oxide-based carbon paste electrode for potentiometric detection of copper ion (II). **Anal. Methods**, v. 4, n. 10, p. 3332-3337, 2012.

ZHANG, Biao et al. Electroanalysis of the interaction between (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and amyloid- $\beta$  in the presence of copper. **Metallomics**, v. 5, n. 3, p. 259-264, 2013.

ZHANG, Dongdong; ZHANG, Yanmin; HE, Langchong. Sensitive Voltammetric Determination of Baicalein at Thermally Reduced Graphene Oxide Modified Glassy Carbon Electrode. **Electroanalysis**, v. 25, n. 9, p. 2136-2144, 2013.

ZHANG, She-Qing et al. Baicalein reduces  $\beta$ -amyloid and promotes nonamyloidogenic amyloid precursor protein processing in an Alzheimer's disease transgenic mouse model. **Journal of neuroscience research**, v. 91, n. 9, p. 1239-1246, 2013.

ZHOU, Jing et al. Electrochemical sensor for Baicalein using a carbon paste electrode doped with carbon nanotubes. **Microchimica Acta**, v. 178, n. 1-2, p. 179-186, 2012.