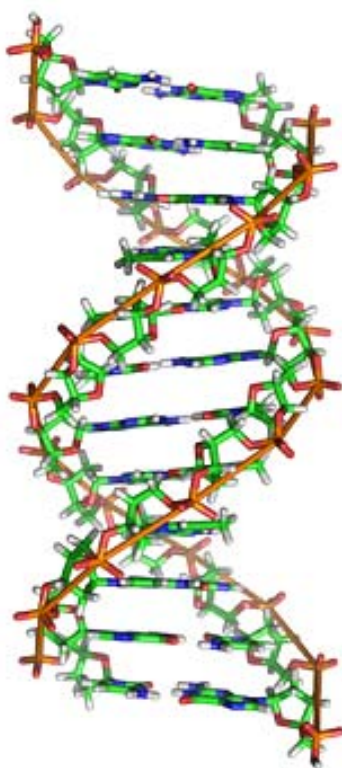




Mecanismos redox de fármacos e deteção eletroquímica *in situ* de danos causados ao DNA



ANA DORA RODRIGUES PONTINHA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA
2012

Mecanismos redox de fármacos e detecção eletroquímica *in situ* de danos causados ao DNA

Dissertação submetida à Faculdade de Ciências
e Tecnologia da Universidade de Coimbra para
obtenção do grau de Doutor em Bioquímica,
especialidade Tecnologia Bioquímica

sob a orientação da

Professora Doutora Ana Maria Coelho Ferreira de Oliveira-Brett
e da orientação interna da

Professora Doutora Maria Paula Marques Catarro

ANA DORA RODRIGUES PONTINHA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

2012

“À medida que o conhecimento
aumenta, o espanto aprofunda-se.”

Charles Morgan

AGRADECIMENTOS

Por detrás de todo o esforço, além de um considerável empenho próprio, esconde-se normalmente um número muito grande de contribuições, apoios, sugestões, comentários ou críticas provenientes de um grupo de pessoas, tendo sido uma preciosa valia e sem as quais teria sido muito difícil chegar a qualquer resultado digno de menção.

Em primeiro lugar, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos à minha orientadora, Professora Doutora Ana Maria Oliveira-Brett, pela orientação, apoio, críticas construtivas e pela disponibilidade ao longo deste trabalho. O seu apoio científico e seus ensinamentos constantes foram fundamentais e será sempre um exemplo de referência que me irá acompanhar para o resto da minha vida.

Ao Professor Doutor Christopher Michael Ashton Brett pelos conselhos científicos tão úteis no decorrer dos anos de doutoramento.

Agradeço à Fundação para a Ciência e a Tecnologia pelo apoio financeiro, bolsa de doutoramento SFRH/BD/46026/2008, e ao Instituto Pedro Nunes pelas condições disponibilizadas durante a realização dos trabalhos aqui apresentados.

Aos meus colegas e amigos do Instituto Pedro Nunes, Ana, Isabel, Adrian, Ilanna, Paulina, Oana e Eda pelo companheirismo, críticas e sorrisos. Ao Victor por toda a disponibilidade e ajuda ao longo destes quatro anos. Um especial obrigado ao Carlos, pela amizade companheirismo e por todos os conselhos e críticas dadas ao longo do doutoramento.

Um obrigado a todos os meus amigos.

Agradeço ao meu irmão, um dos alicerces da minha vida, não só pela paciência e pelos conselhos sábios mas principalmente pelo sorriso, que tornava os meus dias mais felizes.

Aos meus pais a quem serei ETERNAMENTE grata por me ensinarem a lutar e acreditarem SEMPRE que eu sou capaz. Obrigado por tudo o que são na minha vida.

Ao Sérgio pelo seu apoio permanente, materializado em quatro anos de paciência e de sacrifício; pelo tempo que não viveu para não me deixar sozinha, pelas más disposições e nervosismo de tantas horas e pelo carinho com que sempre as suportou.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar o comportamento eletroquímico de um grupo de fármacos, a metolazona (MT), o ácido úsnico (UA), o omeprazol (OMZ), o metotrexato (MTX), a cladribina (CLD), a clofarabina (CLF), os derivados de acridina-triazol e de fenil-triazol, na superfície de um eletrodo de carbono vítreo (GCE), utilizando as técnicas de voltametria cíclica, de impulso diferencial e de onda quadrada. O biossensor eletroquímico com DNA foi utilizado para investigar o mecanismo de interação dos agentes antineoplásicos com o DNA e para detetar os danos oxidativos causados na molécula de DNA.

A oxidação da MT é um processo controlado por difusão que ocorre em duas etapas. A oxidação do UA é um processo irreversível, que ocorre em três etapas que correspondem à oxidação dos grupos hidróxilo ligados aos anéis aromáticos. A oxidação do OMZ ocorre em duas etapas irreversíveis, e a redução do OMZ é um processo irreversível com formação de uma quinona. O MTX sofre oxidação e redução à superfície do GCE. A CLD e CLF apenas apresentam processos de oxidação. Os processos redox destes fármacos são dependentes do pH do eletrólito de suporte e foram propostos os mecanismos redox.

O biossensor eletroquímico com o DNA foi utilizado para investigar a interação com o DNA de fármacos e provou ser uma ferramenta muito útil para detetar os mecanismos de interação entre fármacos e o DNA, assim como os danos causados ao DNA por esses fármacos. A interação em incubações em solução dos agentes antineoplásicos com o dsDNA confirmou os resultados obtidos com o biossensor.

Os fármacos antineoplásicos utilizados, MTX, CLD e CLF, derivados de acridina-triazol e derivados de fenil-triazol, causam modificações na estrutura secundária do DNA, desenrolamento da dupla hélice e condensação do DNA de uma forma dependente do tempo. Verificou-se que os derivados de fenil-triazol causam dano oxidativo no DNA.

ABSTRACT

The objective of this project was to investigate the electrochemical behavior of a variety of drugs such as the: metolazone (MT), usnic acid (UA), omeprazole (OMZ), methotrexate (MTX), cladribine (CLD), clofarabine (CLF), derivatives of acridine-triazole and derivatives of phenyl-triazole, at a glassy carbon electrode (GCE) surface using cyclic, differential pulse and square wave voltammetry. The electrochemical biosensor DNA was used to investigate the mechanism of interaction between antineoplastic agents with DNA and to detect the oxidative damage to the DNA molecule..

The oxidation of MT is a diffusion controlled process that occurs in two steps. The oxidation of the UA is an irreversible process which occurs in three stages corresponding to the oxidation of the hydroxyl groups attached to aromatic rings. The OMZ oxidation occurs in two irreversible steps and the reduction of OMZ is an irreversible process forming a quinone. MTX undergoes oxidation and reduction on the surface of the GCE. CLD and CLF present only oxidation reaction. The redox processes of these compounds are dependent on the pH of the supporting electrolyte and redox mechanisms have been proposed.

The electrochemical DNA biosensor was used to investigate a wide range of toxic compounds and proved to be a very useful tool to detect the mechanisms of interaction between drug and DNA, as well as damage to DNA by these drugs. The interaction of solution incubation of the antineoplastics agents with the dsDNA confirmed the results obtained with the biosensor.

The antineoplastic agents, MTX, CLD e CLF, derivatives of acridine-triazole and derivatives of phenyl-triazole, caused changes in the secondary structure of the DNA, unwinding of the double helix DNA condensation in a time-dependent. Phenyl-triazole derivatives cause oxidative damage to DNA.

ÍNDICE

Notação: Símbolos principais	i
Subscritos	ii
Abreviaturas	ii
Constantes físicas	iii
Matemáticas fundamentais	iii

CAPÍTULO I

<i>INTRODUÇÃO</i>	1
1 FÁRMACOS	6
1.1 Metolazona	6
1.2 Ácido úsnico.....	8
1.3 Omeprazol	11
1.4 Antineoplásicos	16
1.4.1 Metotrexato	17
1.4.2 Análogos de purina	19
1.5 Moléculas inibidoras da telomerase	26
2 ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO	33
2.1 Eletroquímica do DNA	40
2.2 Biossensores eletroquímicos com DNA.....	47

3	PRINCÍPIOS DE ELETROQUÍMICA	51
3.1	Reações de eléctrodo	51
3.2	Técnicas de voltametria.....	56
3.2.1	Voltametria cíclica	57
3.2.2	Voltametria de impulso diferencial	60
3.2.3	Voltametria de onda quadrada	62

CAPÍTULO II

<i>EXPERIMENTAL</i>	65
1. REAGENTES E SOLUÇÕES.....	67
2. INSTRUMENTAÇÃO	71
3. PARÂMETROS VOLTAMÉTRICOS	73
4. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	73
4.1 Condicionamento da superfície do GCE.....	74
4.2 Modificação da superfície do GCE com DNA	74

CAPÍTULO III

<i>METOLAZONA, ÁCIDO ÚSNICO E OMEPRAZOL - MECANISMOS REDOX</i>	77
1. METOLAZONA	81
1.1 Oxidação	81
1.2 Mecanismo de oxidação	88
2. ÁCIDO ÚSNICO.....	89
2.1 Mecanismo de oxidação	90
2.2 Determinação analítica do AU	96
3. OMEPRAZOL.....	97
3.1 Mecanismo redox	97
3.1.1 Oxidação	98

3.1.2 Redução	104
3.2 Espectrofotometria do OMZ	107
4. CONCLUSÃO	110

CAPÍTULO IV

ESTUDO ELETROQUÍMICO DO METOTREXATO E

DA SUA INTERAÇÃO COM O DNA

1 ESTUDO ELETROQUÍMICO DO MTX	114
1.1 Oxidação	116
1.2 Redução	122
1.3 Mecanismo redox do MTX	127
2 DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DA INTERAÇÃO MTX-DNA	129
2.1 Soluções incubadas de MTX-dsDNA	129
2.2 Interação de MTX com biossensor eletroquímico com DNA	136
3 CONCLUSÃO	141

CAPÍTULO V

ESTUDO ELETROQUÍMICO DE ANÁLOGOS DE PURINA

E DA SUA INTERAÇÃO COM DNA

1 ESTUDO ELETROQUÍMICO	147
1.1 Oxidação	147
1.2 Mecanismo de oxidação	156
2 INTERAÇÃO DA CLD E CLF COM O DNA	158
2.1 Soluções incubadas de CLD-dsDNA e CLF-dsDNA	158
2.2 Interação CLD e CLF com biossensores eletroquímicos com DNA	161
3 CONCLUSÃO	166

CAPÍTULO VI

ESTUDO ELETROQUÍMICO DE DERIVADOS DE ACRIDINA-TRIAZOL E DETECÇÃO IN-SITU DA INTERAÇÃO COM O DNA167

1	ESTUDO ELETROQUÍMICO.....	170
1.1	Oxidação	172
1.2	Redução	177
2	INTERAÇÃO DOS COMPOSTOS GL15 E GL7 COM O DNA	182
2.1	Soluções incubadas de GL15-dsDNA e GL7-dsDNA	182
2.2	Interação CLD e CLF com biossensor eletroquímico com DNA	184
3	CONCLUSÃO.....	188

CAPÍTULO VII

ESTUDO ELETROQUÍMICO DE DERIVADOS DE FENIL-TRIAZOL E DA SUA INTERAÇÃO COM O DNA189

1	OXIDAÇÃO.....	193
2	INTERAÇÃO DE CL41, CL42 E CL2R50 COM O DNA.....	205
2.1	Soluções incubadas de CL42-dsDNA , CL41-dsDNA e CL2r50-dsDNA.....	205
2.2	Interação CL42, CL41 e CL2r50 com biossensor eletroquímico com DNA	210
3	CONCLUSÃO.....	212

CAPÍTULO VIII

	<i>CONCLUSÕES</i>	215
--	--------------------------------	-----

	<i>REFERÊNCIAS</i>	225
--	---------------------------------	-----

NOTAÇÃO: SÍMBOLOS PRINCIPAIS

		<i>Unidades</i>
A	área	m^2
C	concentração	$mol\ cm^{-3}$ (M)
C	capacidade da dupla camada	F
e	carga do electrão	C
E	potencial de eléctrodo	V
	$E^{\theta'}$ potencial formal	
	E_p potencial de pico	
	ΔE_s degrau de potencial	
E_F	energia de Fermi	eV
E_{redox}	energia do par redox	eV
f	frequência	Hz
I	corrente eléctrica	A
	I_C corrente capacitiva	
	I_f corrente faradaica	
	I_p corrente de pico	
k	constante de velocidade heterogénea	$m\ s^{-1}$
	k_0 constante de velocidade padrão	
	k_a constante de velocidade de oxidação	
	k_a constante de velocidade de redução	
n	número de electrões transferidos	—
Q	carga eléctrica	C
Q	elemento de fase constante	F
R	resistência	Ω
	R_{ct} resistência à transferência de carga	
	R_{Ω} resistência da solução numa célula	
t	tempo	s
T	temperatura	K
$W_{1/2}$	largura a meia-altura do pico	mV
X	reactância	Ω

α	coeficiente de transferência de carga	—
α	parâmetro de rugosidade do eléctrodo	—
Γ	concentração superficial	mol m ⁻²
λ	comprimento de onda	nm
Φ	diâmetro	m
φ	ângulo de fase	
ω	frequência	Hz

SUBSCRITOS

a	anódico
c	catódico
max	valor máximo
min	valor mínimo
p	pico

ABREVIATURAS

8-oxoGua	8-oxoguanina
2,8-DHA	2,8-dihidroxiadenina
A	adenina
AFM	microscopia de força atômica (<i>Atomic Force Microscopy</i>)
VMP	voltametria de micropartículas (<i>Voltammetry of immobilized microparticles</i>)
C	citossina
CPE	eléctrodo de pasta de carbono (<i>Carbon Paste Electrode</i>)
CV	voltametria cíclica (<i>Cyclic Voltammetry</i>)
dAdo	adenosina
dGuo	guanosina
DNA	ácido desoxiribonucleico (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
DPV	voltametria de impulso diferencial (<i>Differential Pulse Voltammetry</i>)
dT	timidina

EIS	espectroscopia electroquímica de impedância (<i>Electrochemical Impedance Spectroscopy</i>)
G	guanina
GCE	eléctrodo de carbono vítreo (<i>Glassy Carbon Electrode</i>)
μ GCE	micro-eléctrodo de carbono vítreo
HOPG	grafite pirolítica altamente ordenada (<i>Highly Ordered Pyrolytic Graphite</i>)
HPLC	cromatografia líquida de alta pressão (<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>)
NA	ácidos nucleicos (<i>Nucleic Acids</i>)
ODN	oligonucleotídeo (<i>Oligodeoxyribonucleotide</i>)
Poly [A]	ácido poliadenílico (<i>Polyadenilic acid</i>)
Poly [G]	ácido poliguanílico (<i>Polyguanilic acid</i>)
RNA	ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
ROS	radicais reativos de oxigénio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SWV	voltametria de onda quadrada (<i>Square Wave Voltammetry</i>)
T	timina

CONSTANTES FÍSICAS FUNDAMENTAIS

e	unidade de carga eléctrica	$1,602 \times 10^{-19} \text{ C}$
F	constante de Faraday	$9,648 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}$
k_B	constante de Boltzmann	$1,380 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$
R	constante dos gases ideais	$8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$
N_A	constante de Advogadro	$6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$

CONSTANTES MATEMÁTICAS

π	3,14159
e	2,71828

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Um fármaco é uma substância que se utiliza para o alívio, o tratamento e a cura de doenças, assim como para a prevenção das mesmas, é capaz de produzir alteração numa determinada função biológica através de ações químicas, inibindo fungos ou bactérias ou actuando diretamente sobre uma inflamação, não podendo recuperar sistemas que sofreram danos irreparáveis.

Uma preocupação actual é a ação limitativa dos fármacos no tratamento de doenças que degeneram ou destroem os tecidos, como é o caso da insuficiência cardíaca, da artrite, da distrofia muscular, da esclerose múltipla, da doença de Alzheimer, e, ainda, no tratamento do cancro.

No mundo inteiro, milhões de pessoas vivem com o diagnóstico de cancro. A investigação constante, numa área de intervenção tão importante como o cancro, é, inquestionavelmente, necessária. Os agentes quimioterápicos, antineoplásicos ou citostáticos são fármacos usados para o tratamento de neoplasias. Os agentes neoplásicos apresentam, muitas vezes, um mecanismo de ação ciclo celular não específico, atuando diretamente na molécula do ácido desoxirribonucleico (DNA) presente no núcleo.

Recentemente, uma grande quantidade de investigação tem ocorrido no sentido de demonstrar que a imortalização das células tumorais pode estar diretamente ligada à ativação da enzima telomerase. O aumento do comprimento dos telómeros é efetuado fundamentalmente pela ação de uma transcriptase reversa especializada denominada telomerase, cuja base consiste numa subunidade proteica catalítica e uma subunidade de RNA [1-4]. A telomerase tem um papel chave na manutenção do fenótipo e malignidade, uma vez que estabiliza o comprimento e a integridade do telómero, constituindo uma das chaves para a imortalização celular e para o cancro [5]. O desenvolvimento de pequenas moléculas inibidoras da telomerase tem sido objeto de estudo da comunidade científica. Consequentemente, a importância clínica dos agentes antineoplásicos induz a necessidade do estudo sistemático da sua interação com o DNA.

Uma molécula para se tornar num possível composto farmacêutico deve possuir determinadas características que lhe permitam ligar-se ao seu alvo molecular e atingir o efeito desejado. Muitos outros fatores devem também ser levados em consideração, entre eles, a actividade da molécula *in vivo*, a estereoquímica, difusão, solubilidade, liposolubilidade, metabolismo e as reacções redox envolvidas nos processos fisiológicos.

A utilização dos métodos eletroquímicos tem colaborado significativamente na caracterização de compostos farmacêuticos, com a importante vantagem de possibilitar uma melhor aplicação dos mesmos e o desenvolvimento de novos compostos farmacêuticos.

A investigação dos processos de transferência de elétrons em reações biológicas, fornece dados eletroquímicos que estão diretamente correlacionados com a estrutura e atividade da molécula, fornecendo informações úteis relativamente aos mecanismos dos compostos nas células vivas. Além disso, as interações de vários antineoplásicos com o DNA em dupla hélice, têm sido estudadas com sucesso recorrendo a biossensores eletroquímicos de DNA devido à sua elevada seletividade e sensibilidade [6-8].

O trabalho desenvolvido insere-se neste contexto, uma vez que foi investigado o comportamento electroquímico de compostos farmacêuticos com diferentes aplicações clínicas nomeadamente, a metolazona, um diurético; o ácido úsnico, um antibiótico; o omeprazol, um inibidor da produção de suco gástrico, e, os antineoplásicos: o metotrexato, a cladribina, a clofarabina, os derivados de acridina-triazol e os derivados de fenil-triazol, sob à superfície de um eléctrodo de carbono vítreo (GCE). Informações fundamentais não conhecidas sobre as propriedades intrínsecas dessas moléculas foram obtidas, tais como: os processos de oxidação e redução em vários meios, pKa e lipossolubidade.

O estudo da reatividade/toxicidade e interação *in-vitro* dos agentes antineoplásicos referidos anteriormente, o metotrexato, a cladribina, a clofarabina, os derivados de acridina-triazol e os derivados de fenil-triazol, com o DNA foi investigado usando o biossensor eletroquímico com DNA multicamada.

1. FÁRMACOS

1.1 Metolazona

Os diuréticos são os agentes que promovem a excreção de urina através dos seus efeitos sobre a função renal. Eles são amplamente utilizados no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva e da hipertensão [9].

Os diuréticos são classificados, normalmente, em quatro grupos diferentes: tiazídicos, diuréticos da ansa, diuréticos poupadores de potássio e inibidores da anidrase carbônica de acordo com as suas estruturas químicas e propriedades físico-químicas [10,11]. Com base no efeito de diurese, os diuréticos também podem ser classificados em diuréticos de alta eficiência (tais como diuréticos de alça), diuréticos de média eficiência (tais como as tiazidas) e diuréticos de baixa eficiência (tais como diuréticos poupadores de potássio e inibidores de anidrase carbônica) [12].

A metolazona (MT) [7-cloro-1,2,3,4-tetrahidro-2-metil-4-oxo-3-O-tolil-6-quinazolinona-sulfonamida], **Fig. 1.1**, é um diurético pertencente ao grupo dos diuréticos tiazídicos, que inibem a reabsorção de NaCl na parte inicial do túbulo contornado distal ao bloquear o transportador de Na^+/Cl^- [13]. Nas principais indicações dos diuréticos tiazídicos, onde se insere a MT, incluem-se a hipertensão arterial, a insuficiência cardíaca, a nefrolitíase resultante de hipercaleiúria e diabetes insípida nefrogénica.

A MT é estruturalmente semelhante à série de diuréticosquinazolinonas sulfonamidas [13] e é considerada um diurético relativamente forte, de ação prolongada. O efeito diurético inicia-se 1 a 2 horas após a administração oral, mantendo-se por 12 a 24 horas e é absorvido muito facilmente no trato gastrointestinal [14]. Todavia, pode

também ser administrado por via intravenosa. A excreção da MT é principalmente por filtração e secreção no rim, mas uma quantidade significativa deste fármaco aparece nas fezes nos dias seguintes após doses terapêuticas usuais por causa de reciclagem entero-hepática [14]. Os metabolitos da MT são sobretudo hidroxilados e de seguida oxidados por vários mecanismos [14-18].

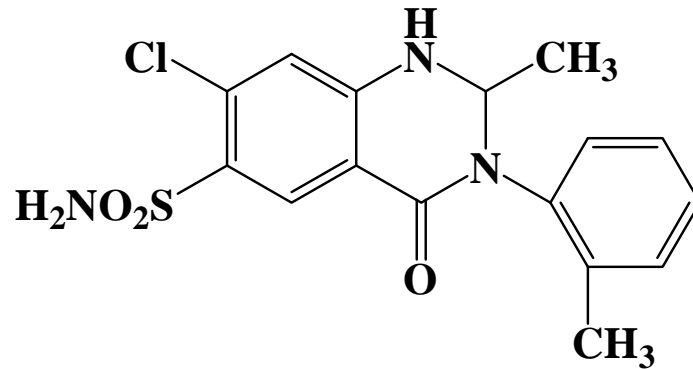


Figura 1.1 Estrutura química da MT

Contudo, e como qualquer outro tipo de fármaco apresenta alguma toxicidade e a MT pode causar dor no peito, trombose venosa, depleção de volume excessivo, hemoconcentração, neuropatia, náuseas, entre outros efeitos secundários [13,14].

Devido à importância deste diurético, torna-se pertinente a determinação da MT em amostras biológicas, como a urina [19], o plasma [20] e o sangue [20,21].

Diferentes métodos foram usados para a determinação da MT em preparações farmacológicas incluindo, espectrofotometria, cromatográfica líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia líquida com deteção de fluorescência, cromatografia líquida ligada à espectrometria de massa (LC-MS-MS) e LC-MS-MS com uma ionização por eletrospray [20-22].

No entanto é importante o desenvolvimento de métodos mais acessíveis em termos de custos e mais ecológicos uma vez que os métodos normalmente utilizados

acarretam custos elevados, não só relativamente aos dispositivos utilizados como também ao elevado número de solventes orgânicos que utilizam nas determinações.

Neste trabalho foi estudado o comportamento eletroquímico da MT e foram propostos os respectivos mecanismos redox, não existindo quaisquer estudos da eletroquímica da MT na literatura.

1.2 Ácido úsnico

Define-se líquen como um organismo simbiótico constituído por um fungo (micobionte) e uma ou mais algas (fotobionte) [23]. Os líquens são encontrados em qualquer ambiente na Terra, desde o nível da água até às montanhas mais altas, pois têm uma enorme resistência às mais diversas condições climáticas.

As propriedades terapêuticas contidas em algumas espécies de líquens estão relacionadas com a produção de metabolitos secundários, como depsídeos, depsidonas, dibenzofuranos, xantonas, antraquinonas, ácidos alifáticos, derivados do ácido pulvínico, terpenos e ácido úsnico [24].

O ácido úsnico (UA), [2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8,9b-dimetil-1,3(2H,9bH)-dibenzo-furano-diona], **Fig. 1.2**, é um metabolito secundário dos líquens, derivado do dibenzofurano, que concede aos líquens proteção contra microrganismos invasores e raios UV [25].

O UA apresenta uma grande variedade de propriedades farmacológicas [25-29], tais como capacidade analgésica e antipirética [30], atividade anti-inflamatória [31], atividade antifúngica contra alguns patogénicos de plantas [32], efeito antiinsectos e atividade antiherbívora [33,34].

No entanto a função biológica mais interessante do UA é a sua atividade antibiótica, tendo crescido o interesse por este composto desde 1990, em parte devido à crescente resistência aos antibióticos tradicionais desenvolvida pelos pacientes nas últimas duas décadas [35].

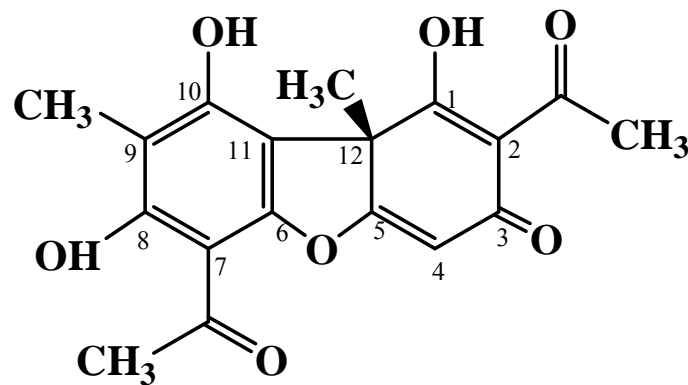


Figura 1.2 Estrutura química do ácido úsnico

Este derivado liquénico apresenta-se, na forma cristalina, com uma cor levemente amarelada e existe na natureza em duas formas enantioméricas: (+) UA e (-) UA, dependendo da posição do grupo metilo do carbono quiral 12 [25]. Ambos os enantiómeros do (+) UA e (-) UA são conhecidos por serem eficazes contra as bactérias patogênicas [36]. Outras características do UA são as propriedades de absorção e preservação no ultravioleta.

O UA é praticamente insolúvel em água (0,01 g/100 mL a 25 °C, Merck Index, 1995), todavia é solúvel em solventes orgânicos, tais como: dimetilsulfóxido, acetona, clorofórmio, metanol, acetato de etilo e diclorometano [24].

Dos três grupos hidroxilos presentes na molécula, o grupo enólico da posição 1 da molécula do UA é o que apresenta um carácter ácido mais forte ($pK_a = 4,4$) devido a um efeito indutivo do grupo ceto.

A acidez do grupo fenólico na posição 10 ($pK_a = 8,8$) é conhecido por um efeito indutivo do grupo acetil localizado na posição 6, enquanto o grupo fenólico da posição 8 é fracamente ácido ($pK_a = 10,7$), possivelmente devido ao seu envolvimento na ligação intramolecular de hidrogénio com o grupo 7-acetil [36].

Foram desenvolvidos diversos métodos para a determinação do UA, como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), eletroforese capilar de zona (CZE), cromatografia eletrocínética micelar (MEKC) [37-39]. Em todos estes métodos se utilizou uma percentagem de acetona ou metanol porque o UA apresenta baixa solubilidade em água.

Uma vez que a atividade do UA é dependente da sua estrutura (por exemplo, espécies tautoméricas presentes), uma elucidação completa das suas preferências conformacionais, bem como do seu comportamento eletroquímico é de extrema importância para a compreensão dos seus mecanismos de ação a nível molecular.

O UA é praticamente insolúvel em água e só a voltametria de estado sólido usando este composto mecanicamente imobilizado na superfície de um eletrodo de carbono vítreo (GCE) permitiu a investigação das propriedades redox deste fármaco em meio aquoso [40-42].

A voltametria de micropartículas (VMP - *Voltammetry of immobilized microparticles*), uma metodologia baseada na imobilização mecânica de partículas sólidas na superfície do eletrodo metálico na ausência de ligantes, aumenta as possibilidades da eletroanálise do estado sólido de compostos insolúveis em meio aquoso devido à sua ampla aplicabilidade [43,44]. A voltametria abrasiva de redissolução (AbrSV) é um caso especial e diz respeito a sistemas em os compostos sólidos são dissolvidos durante as reações eletroquímicas. Virtualmente, cada fase

sólida que contenha centros redox pode produzir um sinal voltamétrico característico [45]. A VPM é igualmente atrativa devido à facilidade de preparação de amostras sólidas e à reduzida escala temporal necessária para se obter as medidas eletroquímicas.

Informações sobre o comportamento eletroquímico do UA desempenham um papel fundamental para a compreensão das suas propriedades, e do seu metabolismo num sistema biológico.

1.3 Omeprazol

A mucosa gastrointestinal é muitas vezes afetada por efeitos agressivos, levando a doenças ácido-pépticas como refluxo gastroesofágico, úlceras gástrica e duodenal. Diferentes grupos de fármacos são importantes no tratamento de doenças do trato gastrointestinal. Utilizam-se fármacos que reduzem a acidez intragástrica ou agentes que promovem a defesa da mucosa.

Os inibidores da bomba de prótons reduzem a produção de ácido no estômago, suprimindo a secreção de ácido gástrico por meio da inibição específica da enzima H^+/K^+ -ATPase na superfície secretora da célula parietal gástrica, restringindo desta forma a quantidade de H^+ disponível para a formação de HCl. Este grupo de fármacos proporciona um alívio prolongado, todavia o início de ação demora algum tempo. Existem cinco fármacos pertencentes a este grupo: o omeprazol, o lansoprazol, o rabeprazol, o pantoprazol e o esomeprazol. Todos eles são compostos benzimidazólicos substituídos, **Fig. 1.3**.

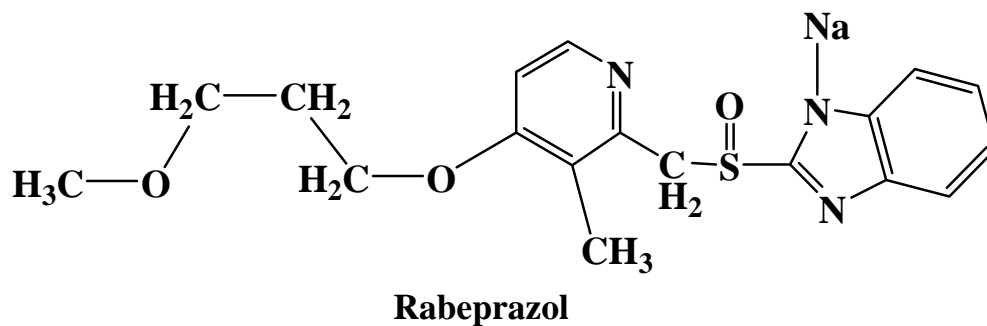
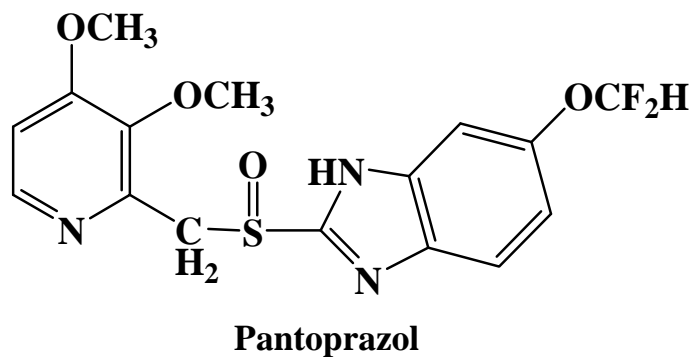
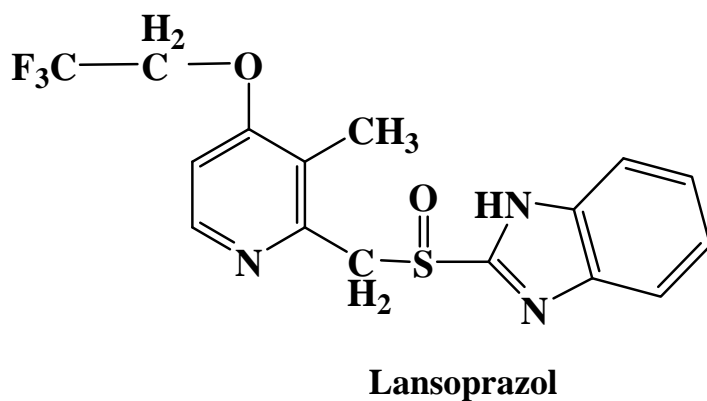
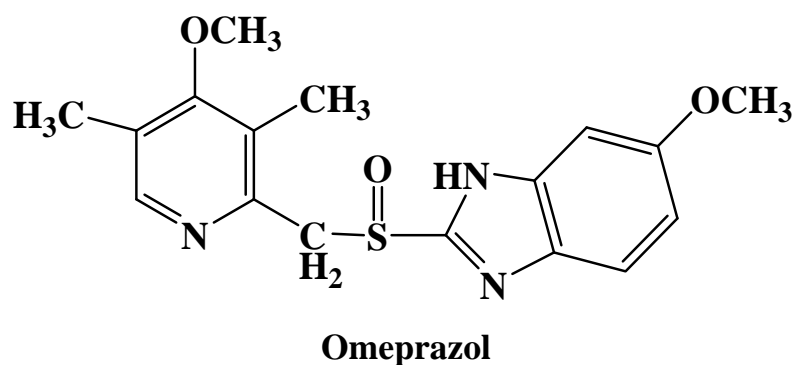


Figura 1.3 Estrutura química dos inibidores da bomba de prótons: omeprazol, lansoprazol, pantoprazol e rabeprazol.

O omeprazol (OMZ), 5-metoxi-2-[[[4-metoxi-3,5-dimetil-2-piridinil)metil]sulfinil]-1H-benzimidazol, é um derivado benzimidazol que atua como inibidor da bomba de prótons inibindo a enzima responsável pelo passo final na secreção do ácido clorídrico pelas células parietais gástricas [13] e é usado no tratamento de úlceras gástricas e duodenais (pépticas), doença do refluxo gastro-esofágico, dispepsia, esofagite de refluxo, síndrome de Zollinger-Ellison, e outras condições gastrointestinais onde a redução do ácido gástrico é benéfica, sendo que este medicamento encontrou popularidade a nível mundial nos últimos dez anos [46-49].

O OMZ é um ácido lábil com decomposição rápida em pH < 5,0, é sensível ao calor, à humidade, a solventes orgânicos e à luz. Este fármaco contém um grupo sulfóxido que mostra atividade ótica, apresentando uma mistura racémica de dois isómeros, S e R, em proporção de 1:1. O isómero S (esomeprazol) tem uma maior biodisponibilidade, resultando em concentrações plasmáticas mais elevadas que as realizáveis com o isómero R [48]. Contudo, estes dois enantiómeros têm um efeito inibitório semelhante sendo igualmente eficazes.

O OMZ é um fármaco administrado como grânulos com revestimento entérico, devido à sua instabilidade em ácido gástrico. Administrado por via oral, a sua absorção pode ser retardada por alimentos. No entanto, a biodisponibilidade sistêmica global não é afetado por uma refeição ou antiácidos. Um aumento constante na concentração plasmática ocorre com doses repetidas (5-7 dias), embora o fármaco aparente não se acumular quando administrado como uma dose única diária. O OMZ é rapidamente metabolizado com a excreção ocorrendo através da urina (80 %) e fezes (20 %). Este fármaco deve ser usado com precaução em pacientes com doença hepática, na gravidez e no aleitamento materno. É importante ressaltar que os inibidores da bomba de prótons

podem dissimular os sintomas de cancro gástrico. Sem efeitos potencialmente fatais relatados, pode causar distúrbios gastrointestinais (por exemplo, diarreia, náuseas, vômitos, obstipação, flatulência, dor abdominal), dor de cabeça, reações de hipersensibilidade [13].

Assim, diversos métodos foram utilizados para a determinação quantitativa do OMZ nas amostras biológicas, tais como: espectrofotometria [49-51], cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) [52-54], cromatografia de camada fina (CCF) [53] e eletroforese capilar (CE) [56,57], e é muito importante o desenvolvimento de novas técnicas capazes de determinar este fármaco.

A redução eletroquímica do OMZ foi estudada usando técnicas polarográficas [47, 58-62] e polarografia de corrente alternada (AC_i) [47]. A reação redox envolve redução do grupo sulfonil ao correspondente grupo tiol num elétrodo gotejante de mercúrio (DME).

Foram utilizadas várias técnicas de polarografia e eletrólitos de suporte na determinação do OMZ, onde os melhores resultados obtidos foram para polarografia de impulso diferencial (DPP) numa solução em pH = 9,0 (tampão de borato) [58]. As reações de OMZ, na ausência de um nucleófilo, foram monitorizadas com DPP num elétrodo de mercúrio de gota estática (SMDE) [59]. As experiências realizadas em soluções tampão com valores de pH que variaram entre 2,0 a 8,0 mostraram que os sinais DPP do OMZ e dos seus produtos de degradação são dependentes de pH do meio. O método voltamétrico de redissolução anódica (ASV) veio criar estratégias multivariadas e levou à determinação do OMZ em fluidos biológicos com concentrações muito baixas [60]. A DPP foi usada para monitorar a degradação do OMZ em meio ácido em dois produtos principais [61], seguindo-se as reações do

2-mercaptoetanol com os respectivos produtos de degradação, como simulação das possíveis reações *in vivo*. Depois de analisado o comportamento do OMZ por polarografia, foi proposto um mecanismo para a reação de redução [62].

O OMZ foi oxidado por diversas formas de sub-unidades do citocromo P450 de fígado humano *in vitro* e *in vivo* [63-69]. Este fármaco é metabolizado antes da sua excreção e os principais metabolitos no sangue são o OMZ sulfona e 5-hidroxiomeprazol [70]. Os principais metabolitos urinários identificados são 5-hidroxiomeprazol e o ácido carboxílico correspondente, mas nem o OMZ nem o OMZ sulfona foram detetados na urina.

O metabolismo do OMZ a 5-hidroxiomeprazol co-segrega 4'-hidroxilação de (S)-mefenitoína [71], indicando o papel polimórfico da enzima CYP2C19 nesta via metabólica. A taxa de hidroxilação do OMZ tem sido utilizada como um índice para a atividade hepática da enzima CYP2C19 *in vivo* [72,73]. Os estudos *in vivo* sugerem que a enzima CYP3A4 é a principal responsável para a sulfoxidação do OMZ [74]. Consistente com esta ideia, estudos *in vivo* tem mostrado que a formação do OMZ sulfona é fortemente inibida por um inibidor de CYP3A4, o cetoconazol [75] e aumentou após um tratamento prolongado com um indutor CYP3A4, a carbamazepina [76]. Aproximadamente 3% dos caucasianos e 15-20% das populações orientais são pobres metabolizadores de (S)-mefenitoína. Tanto o 5-hidroxiomeprazol como o OMZ sulfona podem sofrer oxidação originando um metabólito secundário, 5-hidroxiomeprazol sulfona, mediados pelas enzimas CYP3A4 e CYP2C19, respetivamente [68, 77-78].

Os métodos voltamétricos e o processo de oxidação foram também descritos para a determinação quantitativa do OMZ [48, 79]. A oxidação eletroquímica do OMZ

foi estudada num elétrodo de pasta de carbono por voltametria cíclica e impulso diferencial [48]. Um método de determinação foi desenvolvido e aplicado na análise de OMZ em cápsulas. O processo de oxidação do OMZ num elétrodo de carbono vítreo (GCE) em diferentes eletrólitos de suporte foi investigado usando voltametria cíclica e impulso diferencial [79]. Este método foi utilizado para a determinação do OMZ em comprimidos entéricos numa solução a pH = 5,1 (tampão acetato).

Embora a voltametria tenha sido usado para a determinação do OMZ, não foi realizada uma investigação sistemática do mecanismo redox deste fármaco.

1.4 Antineoplásicos

Os agentes antineoplásicos apresentam uma grande heterogeneidade e é possível fazer uma subclassificação, segundo o mecanismo de ação: agentes citotóxicos, hormonas e anti-hormonas e imunomoduladores.

Os agentes citotóxicos interferem por vários mecanismos de ação com os ácidos nucleicos, levando à destruição celular. Esta classe de antineoplásicos pode ainda ser dividida em: antimetabólitos, alquilantes, inibidores da topoisomerase I e inibidores da topoisomerase II, intercaladores de DNA, inibidores das tirosinacinas e citotóxicos que interferem com a tubulina. Os antimetabólitos interferem nas fases da síntese do DNA ou do RNA, inibindo a divisão celular. Este grupo de citotóxicos divide-se em análogos do ácido fólico, análogos da pirimidina, análogos da purina e inibidores relacionados. Os antimetabólitos são estruturas semelhantes aos metabolitos naturais que são fundamentais para que a célula realize todas as suas funções. A célula não consegue distinguir o fármaco da molécula natural, deixando que aquele ocupe o seu lugar, impossibilitando assim, algumas funções celulares, nomeadamente a reprodução.

1.4.1 Metotrexato

Os fármacos pertencentes à classe antifolato foram os primeiros fármacos antimetabólicos a demonstrarem eficácia no tratamento de doenças neoplásicas.

O metotrexato (MTX), ácido 2,4-diamina-N10-metilpteroil-glutâmico, **Fig 1.4**, é um análogo do ácido fólico, tendo um grupo amino substituído na posição do grupo hidroxilo, posição C4 do anel pteridina. A molécula é constituída por três grupos diferentes: pteridina, p-aminobenzoico e ácido glutâmico [13].

Este fármaco impede a síntese de purinas e pirimidinas através da inibição de enzimas chaves no processo de síntese de bases nitrogenadas [80,81]. Esta inibição da enzima dihidrofolato redutase (DHFR) [81,82] leva a um decréscimo nos níveis de tetrahydrofolato (THF), do qual resulta uma redução da metilação do DNA, proteínas e lípidos. Contudo, este fármaco inibe também a enzima timidilato sintase (TS), interferindo na síntese de DNA, bloqueando assim a síntese da nova purina ao agir sobre o 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeos (AICAR) [83].

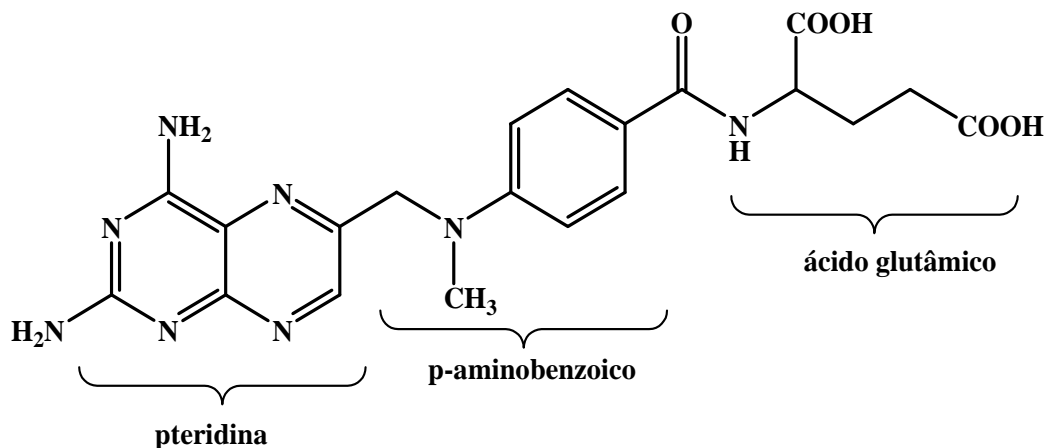


Figura 1.4 Estrutura química do MTX

O MTX é um fármaco citotóxico com origem na década 1940, quando Sidney Farber efetuava tratamentos com ácido fólico na leucemia aguda em crianças e tem uma ampla utilização na oncologia, seja no tratamento leucemia linfática grave, coriocarcinoma, linfoma não-Hodgkin, carcinoma do osso, bem como diversas neoplasias da cabeça, do pescoço, da mama, e do pulmão [84-87]. Também é utilizado como coadjuvante no tratamento de doenças não malignas pelas suas propriedades anti-inflamatórias, como psoríase, lúpus eritematoso sistémico, artrite reumatoide e psoriática [88] e granulomatose de Wegener. Este fármaco pode ser utilizado como um agente imunossupressor no transplante de órgãos e na terapia da asma [13].

O MTX é administrado tanto pela via oral como intratecal ou intravenosa e é rapidamente distribuído para os tecidos do corpo. Este fármaco é eliminado inalterado pelos rins, onde o baixo pH permite que ocorra a deposição de cristais, lesivos a esse órgão, sendo que a alcalinização do filtrado glomerular previne esta condição.

Como efeitos secundários, este fármaco causa náuseas, vômitos (ligeiramente emetogénico), diarreia, alteração da função hepática, estomatites, alterações no hemograma: leucopenia, trombocitopenia, anemia, pancitopenia; insuficiência renal, tosse persistente e outros problemas respiratórios e ainda alopecia (reversível) [13].

A diversidade de efeitos colaterais associados ao MTX mostra a necessidade de monitorização da droga e dos seus metabolitos. Deste ponto de vista, a determinação quantitativa de MTX em amostras biológicas [89] surgiu como uma questão muito importante e algumas técnicas tem sido utilizadas para esse fim, tais como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) [90-92], fluorimetria [93], e a espectrofotometria [94]. A voltametria de MTX foi realizada utilizando uma estratégia multivariada [95-97], e foi determinado em concentrações muito baixas no plasma, no

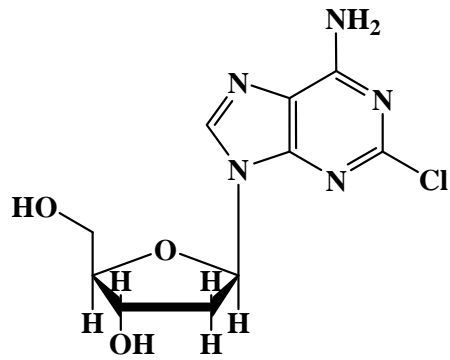
sangue e na urina humana [98,99]. Estudos sobre o comportamento da redução eletroquímica do MTX foram realizados utilizando um eletrodo sólido de amálgama de prata modificado com menisco de mercúrio [100] e um eletrodo de gota estática de mercúrio [101-104], todavia, este eletrodo torna-se limitativo devido à gama de potencial, tendo sido só investigado o mecanismo de redução do MTX. Uma investigação sistemática do mecanismo de redox do MTX não foi ainda realizada, sendo necessário um estudo que proporcione a obtenção de informações muito importantes e úteis sobre o comportamento redox do MTX e dos seus metabolitos.

1.4.2 Análogos da purina

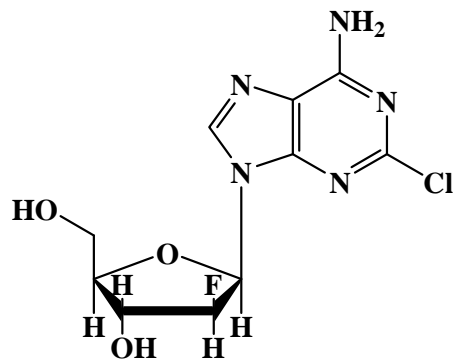
Os análogos de purina, devido à sua semelhança estrutural com os nucleosídeos fisiológicos, são absorvidos pelas células, metabolizados e incorporados no DNA ou RNA. Os principais alvos destes análogos de nucleosídeos ativados são as enzimas envolvidas na síntese de nucleosídeos. Os análogos de purina atuam, em geral, como antimetabólicos, competindo assim com os nucleosídeos fisiológicos e interagindo com os alvos celulares induzindo citotoxicidade.

Todos os análogos de nucleosídeos de purina desenvolvem um mecanismo semelhante de citotoxicidade, requerendo a ativação do metabolismo intracelular, mas uma vez presente na célula são incorporados no DNA, inibindo a síntese e reparação dos ácidos nucleicos, levando à quebra na cadeia do DNA, sendo a apoptose o ponto final da sua ação [105,106].

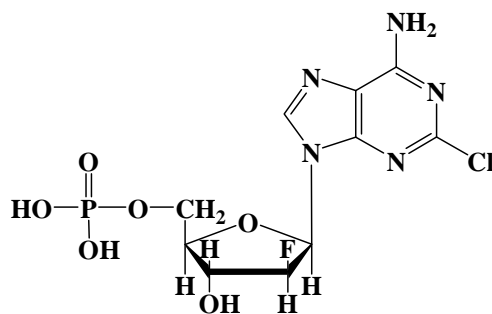
No entanto, existem diferenças significativas não só nas enzimas-alvo, mas também nas interações fármaco-alvo destes antimetabolitos, o que pode explicar as suas diferentes atividades biológicas [105].



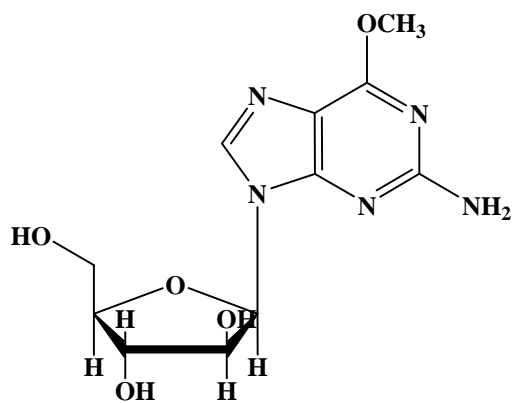
Cladribina



Clofarabina



Fludarabina



Nelarabina

Figura 1.5 Estrutura química dos diversos análogos de nucleosídeos.

Assim, a cladribina, **Fig. 1.5A**, e a fludarabina, **Fig. 1.5C**, são usadas em oncologia no tratamento de doenças malignas hematológicas e alguns tumores sólidos [6]. Nos últimos anos novos nucleósidos de purina foram desenvolvidos. Alguns destes compostos, tais como a clofarabina, **Fig. 1.5B**, ou a nelarabina, **Fig. 1.5D**, estão atualmente sob investigação em estudos clínicos [107].

A maioria dos derivados de purina apresenta um grupo amino ou outro (alcoxi, cloro) na posição 6 da base heterocíclica que pode ser essencial para estabelecer ligações de hidrogénio com polimerases e outras enzimas-chave do metabolismo dos ácidos nucleicos [108]. No entanto, os nucleósidos de purina tendo substituintes no C-6 (arilo, alquilo, benzilo, ou heteroarilo) também possuem efeitos citostáticos significativos [108-110]. Além disso, a substituição em C-2 do anel da purina por halogéneo favorece os efeitos pretendidos [111].

A adenosina desaminase é uma enzima importante envolvida no metabolismo da purina, catalisando irreversivelmente a adenosina desaminase e a desoxiadenosina em inosina e deoxiadenosina, respetivamente. Mutações no gene para a adenosina-desaminase podem conduzir a uma deficiência desta enzima, causando uma síndrome denominada como imunodeficiência combinada severa (SCID).

O mecanismo primário para a maioria da citotoxicidade dos análogos de nucleosídeos é a incorporação dos seus correspondentes trifosfatos de nucleósidos no DNA, causando a terminação da cadeia da síntese de ADN e a ativação da apoptose.

Cladribina

Apenas a substituição do átomo de hidrogénio por um átomo de cloro na posição 2 distingue a cladribina do seu nucleosídeo, a 2'-desoxiadenosina. A cladribina (CLD),

2-cloro-2'-desoxiadenosina, **Fig. 1.5A**, foi primeiro o análogo a ser utilizado como um agente terapêutico, em Fevereiro de 1981 por Beutler num paciente com leucemia mieloide aguda (LMA). No entanto, surgiu grande interesse na CLD, vários anos depois, devido à sua eficácia na leucemia linfocítica crónica [112]. Este fármaco é ainda utilizado em doenças auto-imunes como a esclerose múltipla [113] e lupus eritematoso sistémico [114].

A CLD é um fármaco que é rapidamente captado pelas células após administração parentérica e é fosforilado por via intracelular no nucleótido ativo 2-clorodesoxiadenosina-5'-trifosfato (CdATP) pela desoxicidina cinase (dCK). Em seguida, a CLD é incorporada no DNA, levando à inibição da síntese de ácido nucléico, quebras de fita de DNA e, finalmente, a apoptose [115-117].

O acumular de nucleotídeos da CLD leva a quebras na dupla cadeia de DNA, interrompendo a síntese de DNA e interferindo com a sua reparação. A CLD atua de forma citotóxica nas células em divisão e células que não estão em divisão [118], ou seja, ao contrário de outros análogos de nucleósidos, a CLD é tóxica tanto em células de proliferação rápida como em células inativas. Em células em divisão, a CLD induz citotoxicidade pela inibição da síntese de DNA prejudicando através de dois mecanismos principais: inibição da ribonucleótido redutase, e competição com o trifosfato de desoxiadenosina (dATP), para incorporação no DNA [119-121].

Além dos benefícios obtidos durante o tratamento com CLD, podem surgir inúmeros efeitos colaterais como: anemia; arrepios; hiperuricémia; taquicardia; prurido; obstipação; diarréia; trombocitopenia; anorexia; cefaleias; mialgias; dor abdominal; artralgias; toracálgias; erupção cutâneas; fadiga; febre; entre outros efeitos secundários [13].

Devido à importância deste fármaco no tratamento de diversas doenças, vários métodos vem sendo desenvolvidos para a sua rápida determinação em fluidos corporais. A detecção da CLD tem sido feita principalmente por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa [122-125] e voltametria [126].

Foram realizados estudos sobre o comportamento eletroquímico da CLD usando polarografia d.c. e c.a. [127]. A oxidação da CLD foi também mencionada em estudos sobre o processo metabólico de diferentes derivados halogenados da adenosina utilizando elétrodos de grafite [128].

Foram realizados estudos com um outro derivado halogenado da adenosina, a fludarabina, de modo a compreender a interação com o DNA. A fludarabina tem uma estrutura semelhante à CLD, a única diferença é o halogênio substituinte [129]. Esta molécula sofre oxidação com a transferência de um elétron e um próton, interagindo com o DNA, causando mudanças na sua estrutura.

Devido à toxicidade da CLD, já referida em cima, há uma necessidade contínua de estimativa da farmacocinética da CLD de modo que possam ser avaliadas questões como as interações fármaco-fármaco ou fármaco-DNA.

A maioria dos trabalhos realizados foi sobre o processo metabólico e o efeito da CLD em moléculas biologicamente importantes em linhagens celulares. Embora o mecanismo de dano no DNA pela CLD, aparentemente, envolva uma conjunto de reações bioquímicas secundárias, existem vários estudos indicando que a CLD pode levar a processos que originam ou induzem perturbações ou ruturas no material genético. A formação de quebras na cadeia de DNA pode resultar em aberrações cromossômicas, sendo importante um estudo da interação eletroquímica da CLD com o DNA.

Clofarabina

A clofarabina (CLF), (2-cloro-9-(2-desoxi-2-fluor-beta-d-arabinofuranosil) adenina), **Fig. 1.5B**, é um análogo da nova geração da desoxiadenosina. A CLF foi desenvolvida, de modo a se obter uma maior eficácia e evitar a toxicidade extramedular relativamente à CLD e à fludarabina. Durante a última década esta foi a única aprovação de um medicamento concedida para o tratamento de leucemia aguda pediátrica.

A CLF contém flúor na segunda posição do açúcar, que a protege da fosforilase bacteriana nucleosídica e da hidrólise ácida. A estabilidade de CLF no meio ácido faz com que seja possível uso por via oral no tratamento do cancro. Como previsto, o valor de $pK_a = 1,75$ da CLF é maior do que o $pK_a = 1,28$ da CLD [130]. Além disso, a CLF ainda apresenta a mais elevada lipofilia entre os análogos de purinas [131] e é resistente à degradação pela enzima fosforilase de nucleosídeo das bactérias *E. Coli* [132].

Foi observado que os metabólitos da CLF são retidos pelas células em maior quantidade do que metabólitos de CLD, sendo que quanto maior for o tempo de retenção, maior o efeito anti-tumoral [133].

A sua atividade antitumorigênica deve-se: à inibição da polimerase α do DNA, resultando no fim da extensão da cadeia de DNA e/ou da síntese/reparação do DNA; inibição da reductase do ribonucleotídeo com a redução das concentrações de trifosfato de desoxinucleotídeo celular (dNTP); ruptura da integridade da membrana mitocondrial com a libertação do citocromo C e outros fatores pró-apoptóticos, levando à morte programada das células [134, 135]. Esta ampla gama de atividades, explica a eficiência deste fármaco contra os tumores que crescem rapidamente e tumores quiescentes [130-132].

A CLF tem de se difundir ou ser transportada para as células-alvo, onde é sequencialmente fosforilada em monofosfato e bifosfato por quinases intracelulares e, depois, finalmente, no conjugado activo 5'-trifosfato de clofarabina.

A CLF tem uma alta afinidade com uma das enzimas ativadoras da fosforilase – a quinase da desoxicidina – que excede a do substrato natural: a desoxicidina. Além disso, a CLF possui uma maior resistência à degradação dentro da célula pela adenosina deaminase e uma susceptibilidade à segmentação fosforolítica mais reduzida do que outras substâncias ativas do seu grupo, embora a afinidade do trifosfato da CLF à polimerase α do DNA e à reductase do ribonucleotídeo seja similar ou superior à da desoxiadenosina trifosfato.

Dada a importância da CLF, alguns métodos analíticos tem sido alvo para a determinação deste tipo de biomoléculas em amostras biológicas.

Para a extração da CLF foi utilizada a cromatografia de ultra eficiência (UPLC), uma micro-coluna de HPLC acoplada a diferentes espectrómetros de massa [136]. O mesmo método foi também utilizado para a determinação de CLF em amostras de soro de pacientes em hemodiálise [137]. Outro estudo foi baseado na identificação e separação de impurezas e produtos de degradação do processo de CLF usando ^1H NMR [138].

Contudo, é necessário o uso de técnicas com menor custos associados, como é o caso das técnicas eletroquímicas.

Por se tratar de um fármaco utilizado no tratamento do cancro, uma área de grande interesse na saúde, o estudo eletroquímico da interação entre da CLF com o DNA, é importante para complementar estudos sobre este fármaco.

1.5 Moléculas inibidoras da telomerase

Os telómeros são complexos de DNA presentes nas extremidades dos cromossomas, cuja principal função é protegê-los de quaisquer danos, garantindo assim a integridade do material genético que eles comportam.

Estas estruturas estão associadas a diferentes tipos de proteínas, sendo compostos por sequências repetidas de nucleótidos, nomeadamente 5' – TTAGGG – 3' [139,140].

As sequências ricas em guanina podem formar estruturas de unidades de quatro bases empilhadas, ao invés dos pares de base usuais encontrados em outras moléculas de DNA. Aqui, quatro bases de guanina formam uma placa plana e depois estas unidades planas de quatro bases empilham-se no topo umas das outras, para formarem estruturas G-quadruplex estáveis [141]. Estas estruturas são estabilizadas por pontes de hidrogénio entre as margens das bases e por quelação de um ião metálico no centro de cada unidade de quatro-bases [5]. Outras estruturas podem também ser formadas, com o conjunto central de quatro bases a vir quer de uma cadeia simples enrolada à volta das bases ou de diversas cadeias paralelas, cada uma contribuindo com uma base para a estrutura central.

A telomerase é uma enzima ribonucleoproteica, pertencente à classe das DNA polimerases, que tem por principal função estabilizar o comprimento dos telómeros por adição de repetições teloméricas nas extremidades dos cromossomas, de modo a compensar a erosão contínua destes, a cada divisão celular [142].

Esta enzima é composta por dois tipos de subunidades, uma subunidade proteica com actividade catalítica de transcriptase reversa (hTERT– *human Telomerase Reverse*

Transcriptase) e uma subunidade de RNA (hTERC – *human Telomerase RNA Component*) com uma sequência complementar à sequência do telômero, **Fig. 1.6**.

A enzima encontra-se ativa em células embrionárias e em células germinativas, não sendo detetada em células somáticas normais, excetuando algumas células proliferativas de tecidos renováveis, embora em baixa concentração.

A telomerase procede ao reconhecimento de uma zona rica em guaninas, presente na extremidade de uma sequência telomérica de uma cadeia de DNA, e procede ao seu alongamento, no sentido de 5' para 3', contrariando o encurtamento que ocorre a cada repetição da cadeia de DNA [143]. A ação desta enzima leva a que as células tumorígenas não apresentem encurtamento dos telómeros em cada divisão celular. A imortalização celular pode assim ser o resultado da mutação de um gene na via de repressão da telomerase, permitindo a expressão da telomerase nestas células.

O desenvolvimento de pequenas moléculas capazes de interagir reversivelmente com a estrutura do DNA, conhecidas como intercaladores, tipicamente caracterizadas por uma fração heterocíclica planar, inserindo-se perpendicularmente no DNA e estabilizado-o por forças hidrofóbicas, forças Van der Waals, ligações de hidrogénio e forças de transferência de carga, tem sido demonstrado que estas interações podem induzir desenrolamento, de alongamento da dupla hélice, afetando os processos de replicação das células e causando a morte celular.

Os ligantes possuem normalmente características comuns, são cromóforos aromáticos planos com cadeias laterais carregadas positivamente [144]. Existem várias classes de agentes que estabilizam os telómeros, incluindo quinonas, complexos de metal, e compostos aromáticos nitrados.

Derivados de acridina-triazol

O cromóforo acridina, **Fig. 1.6**, foi desenvolvido de modo a contornar a fraca solubilidade aquosa dos derivados de antraquinonas, utilizados na inibição da telomerase [145]. O átomo de azoto central de anel na acridina é protonado a pH fisiológico, auxiliando a solubilidade, bem como aumentando a deficiência de elétrões através do cromóforo e levando a melhores interações [146].

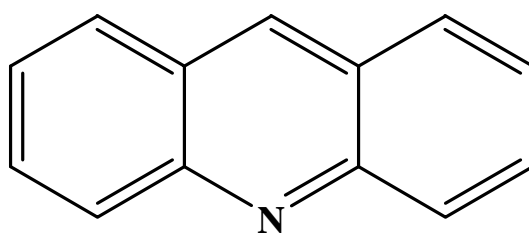


Figura 1.6 – Estrutura química da acridina

A atividade biológica das acridinas tem sido atribuída à planaridade destas estruturas aromáticas, que podem intercalar na cadeia dupla de DNA, interferindo assim nas funções celulares [147]. Na verdade, o modo de ação das acridinas tem sido um tópico de pesquisa contínua na quimioterapia, os alvos biológicos de acridinas incluem topoisomerasas I de DNA e / ou II, a telomerase / telómeros e proteína-quinases [148]. O anel poliaromático do núcleo das acridinas tem elevada afinidade com o DNA, todavia, com pouca selectividade [144].

Diversos derivados de acridinas tem sido alvo de investigação. As acridinas dissustituídas pertencem a uma classe de ligandos que têm mostrado ser agentes estabilizadores e podem inibir a telomerase de baixa concentração [149-151].

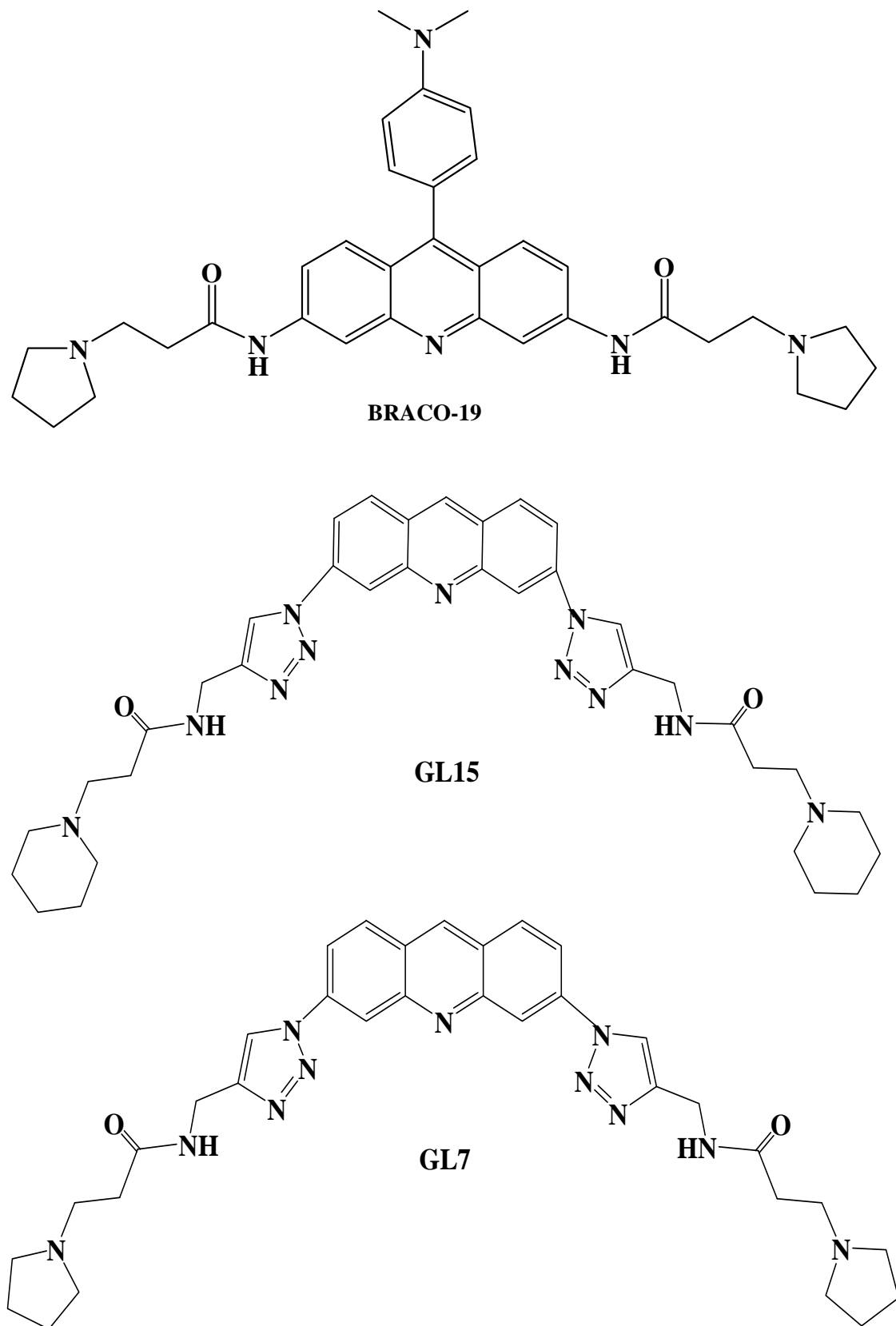


Figura 1.7 – Estrutura química de derivados de acridina.

Substituições nas posições 3 e 6 geralmente têm pouca influência sobre a seletividade, no entanto, alguns compostos de acridina mostraram seletividade para sequências teloméricas humanas, combinado com a ligação limitada ao DNA duplex [152].

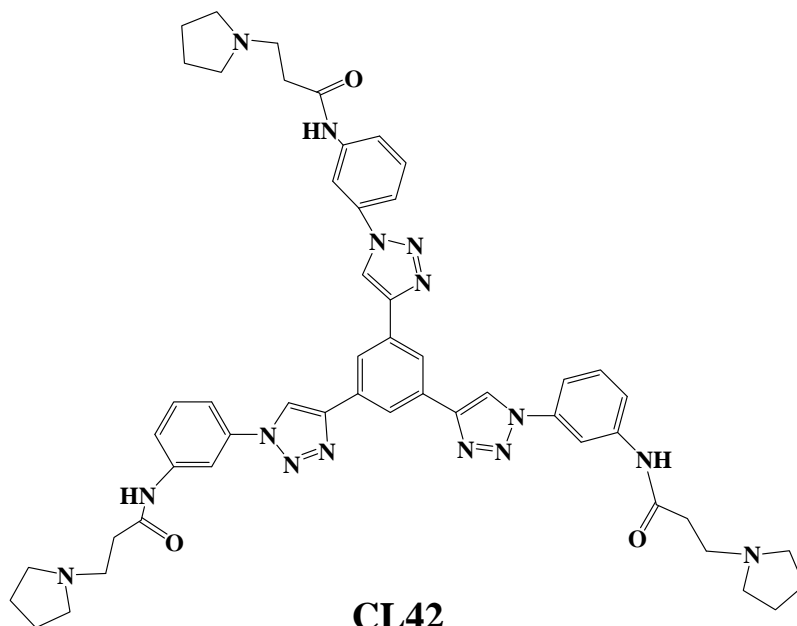
As acridinas têm vantagens: solubilidade aquosa melhorada, uma vez que o azoto do anel central de acridina é normalmente protonado a pH fisiológico; e, afinidade melhorada com o G-quadruplex [141, 153-155].

A molécula BRACO-19, **Fig. 1.7**, um derivado de 3,6,9-trissubstituído de acridina com um grupo anilino na posição 9 tem propriedades farmacológicas. e tem sido a base de várias séries de compostos modificados de acridina. Dímeros ligados na posição 9 por cadeias de carbono acíclicos são mais seletivos para o G-quadruplex [156].

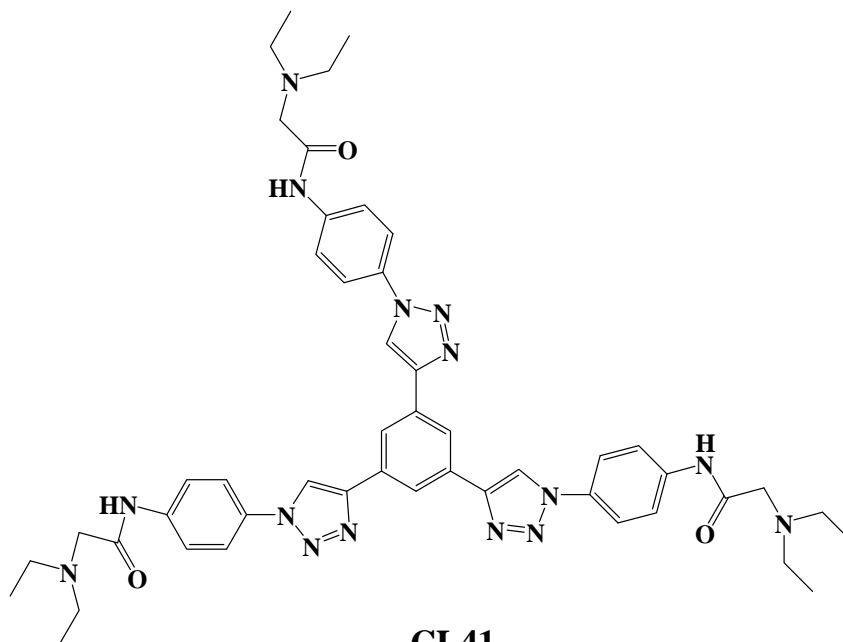
De modo a melhorar a coplanaridade e empilhamento no G-quarteto, foram introduzidos grupos substituintes triazólicos nas posições 3- e 6 [152] das acridinas disubstituídas. A natureza do ligante determina a estrutura detalhada do local de ligação.

Derivados de fenil-triazol

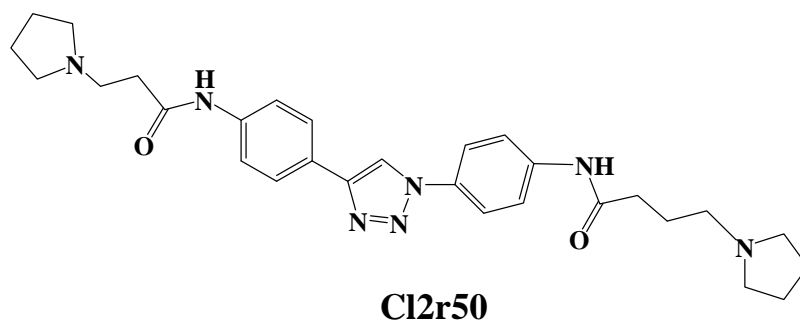
Na tentativa de criar moléculas novas diversos métodos foram utilizados para analisar as estruturas dos ligandos e interação com o G-quadruplex [157-161]. O núcleo de acridina foi substituído por um anel fenil simetricamente trissubstituído, **Fig. 1.8**, com cadeias laterais de comprimento adequado e grandes quantidades para encher cada um das três ranhuras, **Fig. 1.8**.



CL42



CL41



Cl2r50

Figura 1.8– Estrutura química de derivados de fenil-triazol.

Os compostos sintetizados foram tendo maior afinidade para o G-quadruplex telomérico acoplado humano e com afinidade muito menor para o dsDNA em comparação com BRACO-19 [162].

Um fator chave é a transferência de carga entre as espécies intercaladas e o ácido nucleico, que pode contribuir para a ligação [163].

Evidências da transferência de carga com acridinas foram fornecidas por estudos com 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina, intercalados com o DNA, na sua forma protonada [164]. A protonação é facilitada com o aumento da densidade de elétrons, que é prevista para aumentar a eficácia terapêutica de 9-anilinoacridinas [164]. Alternativamente, o radical catião pode reagir irreversivelmente com o O₂ para formar espécies reativas, com subsequente geração de 8-oxoguanina, existindo a quebra da cadeia dupla do DNA [165].

O radical acridina com a transferência de elétrons para o oxigênio pode servir como uma fonte de superóxido com a consequente formação de espécies de oxigênio reativas diferentes. Foram pois observadas rupturas nos filamentos do DNA, assim como, danos cromossômicos, características do stress oxidativo [166].

Os danos oxidativos sofridos pelo DNA, a identificação da presença da 8-oxoguanina são possíveis de se detetar num único ensaio por técnicas voltamétricas. Os biossensores eletroquímicos com DNA são bons modelos para simular as interações que ocorrem entre o DNA e as membranas celulares ou entre o DNA e os compostos cancerígenos e servem para clarificar os mecanismos de ação de vários fármacos utilizados como agentes em quimioterapia.

2. ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO

O ácido desoxirribonucléico (DNA) é um ácido nucleico, descoberto em 1869 por Friedrich Miescher, cujo principal papel na genética só foi reconhecido em meados do século XX.

A molécula do DNA tem como principais funções conter a informação necessária à replicação e síntese de DNA para os cromossomas das células filhas, e, armazenar a informação necessária para a síntese de proteínas. Esta informação está contida no DNA como código genético expresso pela sequência das bases adenina, guanina, citosina e timina.

As duas bases purínicas são, a adenina (6-aminopurina) e a guanina (2-amino-6-oxopurina). As bases pirimidínicas são o uracil (2,4-dioxopirimidina) que só ocorre no RNA, a timina (5-metil-2,4-dioxopirimidina), que é encontrada apenas no DNA e a citosina (4-amino-2-oxopirimidina) que está presente em ambos os ácidos nucleicos. As bases codificam a informação genética celular. As proporções em que existem estas bases e a respectiva ordem de sequência ao longo da cadeia polinucleotídica é conhecida como a estrutura primária do DNA e diferem de espécie para espécie de ácido nucleico. É a estrutura primária que armazena a informação genética. O DNA consiste em duas cadeias de polinucleotídeos paralelas e helicoidais que são mantidas juntas por pontes de hidrogénio entre as bases purínicas de uma cadeia e as bases pirimidínicas da outra, e vice-versa. As duas cadeias estão dispostas de tal forma que as bases purínicas e pirimidínicas se encontram orientadas para o eixo longitudinal da dupla hélice, e dispostas num plano perpendicular a esse mesmo eixo.

A combinação, base-açúcar-fosfato é chamada nucleotídeo, e, nada mais é do que um éster fosfórico de um nucleosídeo, **Fig. 1.9**.

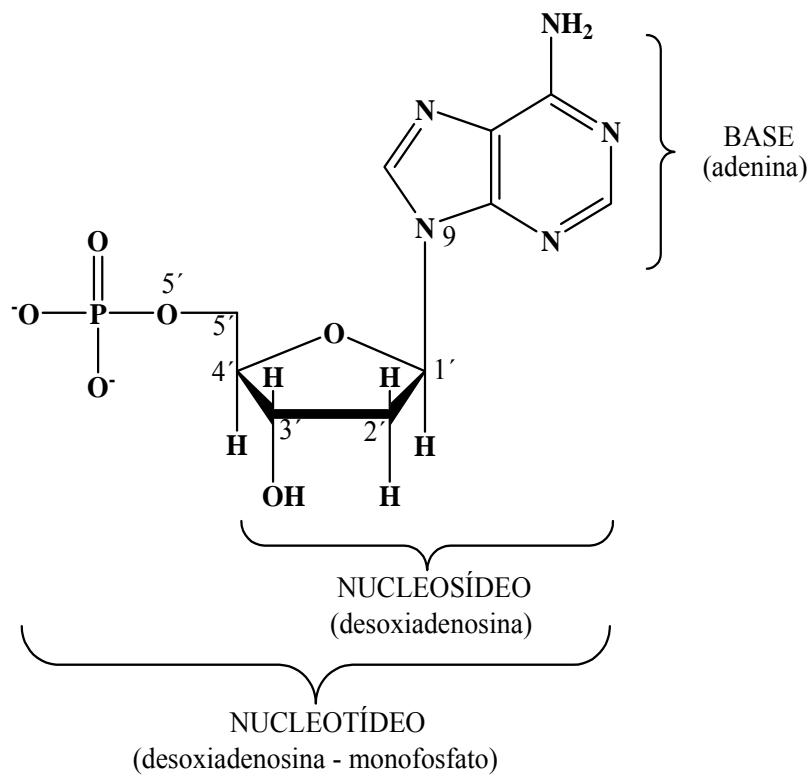
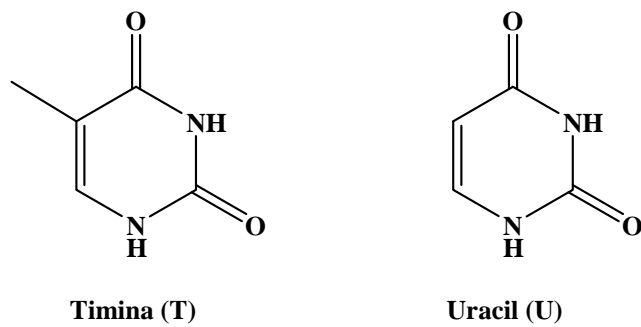
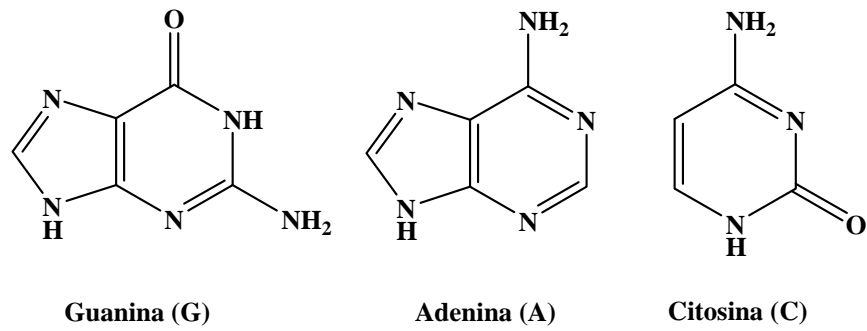


Figura 1.9– Estruturas das bases do DNA e RNA; Exemplo de nucleotídeo: a base adenina, o nucleosídeo-desoxiadenosina e o nucleotídeo-adenosina monofosfato..

As bases ficam suficientemente próximas umas das outras ligadas por pontes de hidrogénio, assegurando a estabilidade da dupla hélice. Esta pode ser reversivelmente separada quando as pontes de hidrogénio são rompidas entre as suas bases emparelhadas.

Na dupla hélice é possível identificar topologicamente um sulco maior e outro menor. O sulco menor possui uma maior densidade de carga negativa relativamente ao sulco maior. As ligações glicosídicas que ligam as bases aos esqueletos açúcar-fosfato encontram-se na configuração *cis* uma relativa à outra. Disto resulta o facto de existirem menos grupos funcionais de um lado do par de bases (expostos no sentido do sulco menor) do que no outro (exposto no sulco maior).

Os polinucleotídeos são moléculas extremamente flexíveis, com uma grande capacidade de adoptar várias conformações estruturais em função da sequência, concentrações de iões, temperatura e humidade relativa [167]. Em condições de humidade baixa, o B-DNA efectua uma transição estrutural para a forma A-DNA [168,169]. A-DNA é mais compacto, com 11 pares de bases numa volta completa da hélice e apresenta uma inclinação maior relativamente ao eixo da hélice, **Fig. 1.10B**. Esta alteração conformacional diminui substancialmente o volume delimitado pelo sulco menor.

O facto de alguns grupos nas bases estarem suficientemente acessíveis para permitirem interações com moléculas pequenas, proteínas e outras cadeias polinucleotídicas é uma característica importante das propriedades e da função do DNA.

A molécula de DNA é bastante maleável, podendo adquirir uma grande variedade de estruturas secundárias, fundamental para uma compreensão dos danos

provocados no DNA. Os danos no DNA podem ser provocados diretamente através da sua interação do DNA com outras moléculas.

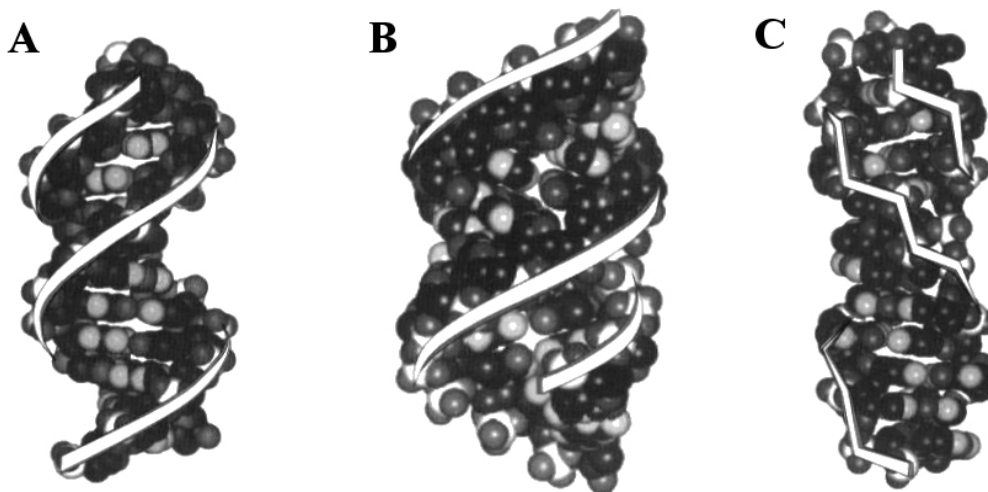


Figura 1.10 - Estruturas de A) B-DNA, B) A-DNA e C) Z-DNA [169].

Existem três tipos principais de interação entre as moléculas geralmente encontradas no organismo e o DNA: atracção electrostática, ligação de uma molécula em qualquer um dos sulcos do DNA e intercalação dos anéis aromáticos de uma molécula entre os pares de bases do DNA. Enquanto os primeiros dois tipos de interação não modificam a estrutura do DNA, a intercalação poderá induzir torções no esqueleto fosfato-açúcar de modo a que os pares de bases adjacentes sejam separados.

Os danos no DNA também podem ocorrer de forma indirecta. Quando a radiação ionizante é direccionada contra as moléculas de água que rodeiam o DNA são produzidos radicais livres com grande capacidade de interaccionar e de danificar o DNA.

As interações entre o DNA e compostos perigosos incluem, não necessariamente nesta ordem, mudanças conformacionais, quebras numa ou ambas as cadeias de DNA, quebra nas pontes de hidrogénio, oxidação do C1' do açúcar com libertação de bases

inalteradas - depurinação, **Fig. 1.11**, e /ou oxidação ou outro tipo de modificação das bases [170]. Neste contexto, tem existido um interesse acrescido ao estudo dos mecanismos de várias moléculas, espécies químicas reativas e iões metálicos de transição que levam a danos biologicamente relevantes no DNA.

Nos últimos anos, vários resultados experimentais têm vindo a evidenciar a existência de uma correlação estreita entre o desenvolvimento de tumores e os danos no DNA [171,172]. Elevadas concentrações de vários produtos resultantes de danos oxidativos no DNA foram encontrados em tecidos de cancro da mama, pulmão, cólon, estômago, ovário e cérebro, em relação aos respetivos níveis presentes no DNA de áreas adjacentes [173].

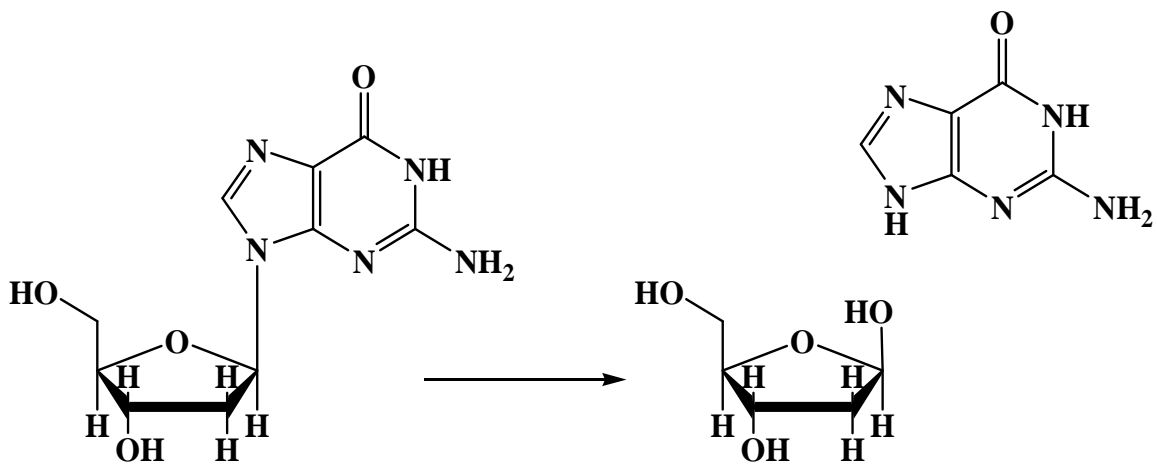


Figura 1.11 - Depurinação da guanosina

Sendo que o produto de oxidação do DNA mais detetado no processo de monitorização dos danos oxidativos é a 8-oxoguanina (8-oxoGua), **Fig. 1.12**, produto da oxidação da base guanina a [174-178].

Desde que foi descoberta, a 8-oxoG tem sido alvo de várias investigações que a levaram a ser considerada como um biomarcador dos danos oxidativos do DNA [1175,176].

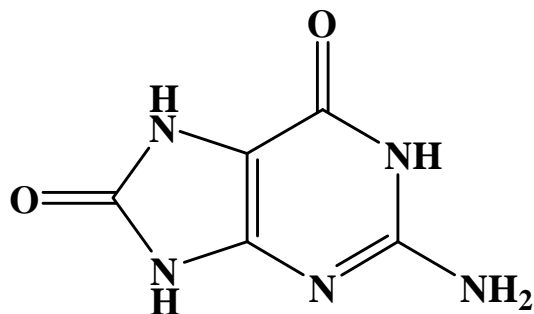


Figura 1.12 – Estrutura química da 8-oxoguanina

Foram desenvolvidos vários métodos a fim de avaliar os danos causados no DNA, nomeadamente utilizando HPLC-ECD, GC-MS, métodos enzimáticos e de marcação com P^{32} [184]. Um segundo procedimento para avaliar os danos oxidativos no DNA tem sido dirigido para a determinação dos níveis urinários de 8-oxoG, pois níveis elevados de 8-oxoG foram detetados na urina de pacientes com cancro [174].

Também os produtos normais do metabolismo celular, como espécies reativas de oxigénio (ROS), produtos da peroxidação lipídica, agentes alquilantes estrógenos, espécies reativas de nitrogénio (NOS) e certos intermediários de algumas vias metabólicas, e fontes exógenas inevitáveis, tais como a radiação UV, a radiação ionizante, radioisótopos de ocorrência natural e numerosas substâncias químicas presentes naturalmente ou como contaminantes na dieta e no ar [179, 180] são agentes oxidantes causam danos no DNA.

O radical hidróxilo (OH^\bullet) e o ião peroxinitrito (ONOO^-) são extremamente reativos, podendo adicionar-se às bases do DNA ou remover átomos de hidrogénio. Os metais de transição, também conhecidos como metais do bloco d, têm as orbitais d parcialmente preenchidas e, conseqüentemente, podem ser considerados como tendo um comportamento semelhante dos radicais livres. Os iões metálicos de transição interagem com o dsDNA em mais de dois sítios diferentes e por isto as suas interações são complexas. Os iões metálicos carregados positivamente interagem direta ou indiretamente em sítios do dsDNA caracterizados por elevada densidade electrónica ou em resíduos do DNA carregados negativamente. Esses sítios do dsDNA podem ser os grupos fosfatos localizados em qualquer cadeia ou os átomos doadores de electrões das bases, tais como N e O. O modo predominante de ligação dos iões metálicos de transição ocorre no N7 e O6 da guanina, no N7 e N1 da base adenina e N3 das pirimidinas [167, 181].

Os fármacos antineoplásicas e cancerígenos interagem com o DNA, podendo provocar diferentes danos. Esta interação depende de algumas características como hidrofobicidade, carga e a estrutura espacial (tamanho da molécula). As moléculas hidrofóbicas ou anfífilas, de tamanhos adequados, podem intercalar nas bases nitrogenadas do DNA, ou, se possuem carga positiva, podem interagir electrostaticamente com os grupos fosfatos [167, 182-183].

A oxidação do DNA está na origem da instabilidade genómica uma vez que existem evidências que os produtos de oxidação de DNA têm um papel muito importante na mutagénese e carcinogénese [175,177]. A interação do DNA com os radicais livres ou com a radiação ionizante gera dentro da dupla hélice, além da

8-oxoG, produtos mutagênicos como 2,8-dihidroxiadenina, 5-formiluracil, 5-hidroxicitosina e 5,6-dihidroxitimina [175].

As bases empilhadas facilitam a transferência de elétrons através do DNA [176]. A criação de aceitadores de elétrons em sítios específicos numa duplex de oligonucleotídeos de sequências conhecidas, permitiu observar como um elétron é transferido através da dupla hélice de DNA, a partir de um doador para um aceitador de elétrons [184-187].

Para avaliar os danos oxidativos no DNA têm vindo a ser seguidos dois procedimentos distintos. Um deles mede o conteúdo em bases modificadas no DNA extraído de tecidos e representa os níveis estacionários resultantes do equilíbrio dinâmico entre os danos e a reparação enzimática [175, 177]. A modificação química de cada uma das bases do DNA induz alterações moleculares durante a transcrição genética o que conduz ao mau funcionamento e conseqüentemente à morte das células.

A oxidação do DNA é uma fonte importante de instabilidade genômica uma vez que existe evidência de que os produtos de oxidação de bases do DNA desempenham papéis importantes na mutagênese, carcinogênese, envelhecimento e doenças relacionadas com a idade avançada [188-190].

2.1 Eletroquímica do DNA

Os métodos eletroquímicos são muito promissores no estudo do dano oxidativo de DNA e na investigação dos mecanismos de interação de drogas com o DNA [191-193].

O uso de elétrodos sólidos estendeu de forma significativa o campo de aplicação dos métodos eletroquímicos para análise dos ácidos nucleicos. Os elétrodos de carbono, como por exemplo o carbono vítreo, as fibras de carbono, a pasta de carbono ou diferentes formas de grafite, possuem normalmente um intervalo de potencial útil bastante largo, em especial para os valores de potencial positivo, que permite a detecção dos danos oxidativos causados ao DNA, seguindo os picos de oxidação das bases de DNA [194,195].

Vários estudos foram realizados nas últimas décadas sobre o comportamento eletroquímico das bases do DNA tendo em vista a determinação dos mecanismos redox. Foi mostrado que todas as bases – guanina, adenina, timina e citosina sofrem oxidação em elétrodos de carbono [196], **Fig. 1.13**.

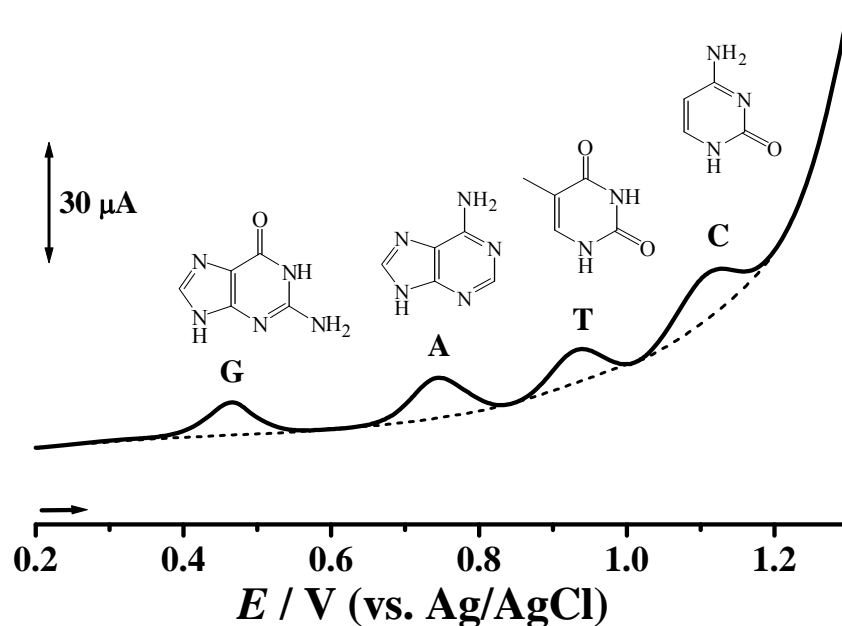


Figura 1.13 – Voltamograma de DP obtidos com um elétrodo de carbono vítreo, mostrando a oxidação das quatro bases do DNA. Adaptado a partir de [196].

O primeiro pico, de menor potencial, está associado à oxidação de resíduos de guanina, a base mais fácil oxidável de todas as bases de DNA [191,192], enquanto um

segundo pico de corrente é devido à oxidação dos resíduos de adenina. Os picos de oxidação seguintes correspondem à oxidação da timina e da citosina [197]. A oxidação de todas as bases de DNA em elétrodos de carbono vítreo (GCE) confirmou que a guanina e adenina são mais facilmente detetadas.

A oxidação das bases pirimidínicas ocorre para potenciais mais elevados do que as purínicas. O estudo da oxidação do DNA em elétrodos de carbono tem sido direcionado para a deteção da oxidação da guanina e da adenina, **Fig. 1.13**.

Misturas equimolares de todas as quatro bases do DNA e também dos seus nucleosídeos e nucleotídeos foram estudadas em pH próximo ao fisiológico [198], **Fig. 1.14A**. As intensidades de correntes observadas para a oxidação das bases pirimidínicas são muito menores do que as observadas para as bases purínicas [198].

Devido à grande complexidade da estrutura dos ácidos nucleicos é útil estudar moléculas semelhantes aos ácidos nucleicos para obter informações sobre o comportamento dos mesmos. Destas moléculas destacam-se os polihomorribonucleotídeos sintéticos, cujas estruturas são semelhantes às estruturas do DNA.

Nos polihomorribonucleotídeos existe um único tipo de base o que facilita a interpretação dos resultados. Por comparação, os resultados obtidos podem ser utilizados para explicar o comportamento com o DNA. Assim a oxidação para os polihomorribonucleotídeos de todas as bases, nomeadamente, poly [G], poly [A], poly [T], poly [C] e poly [U] foi investigada num eléctrodo de carbono [199, 200]. Foi mostrado que estes polihomorribonucleotídeos são oxidados para um potencial igual ao do correspondente nucleotídeo, **Fig. 1.14B**.

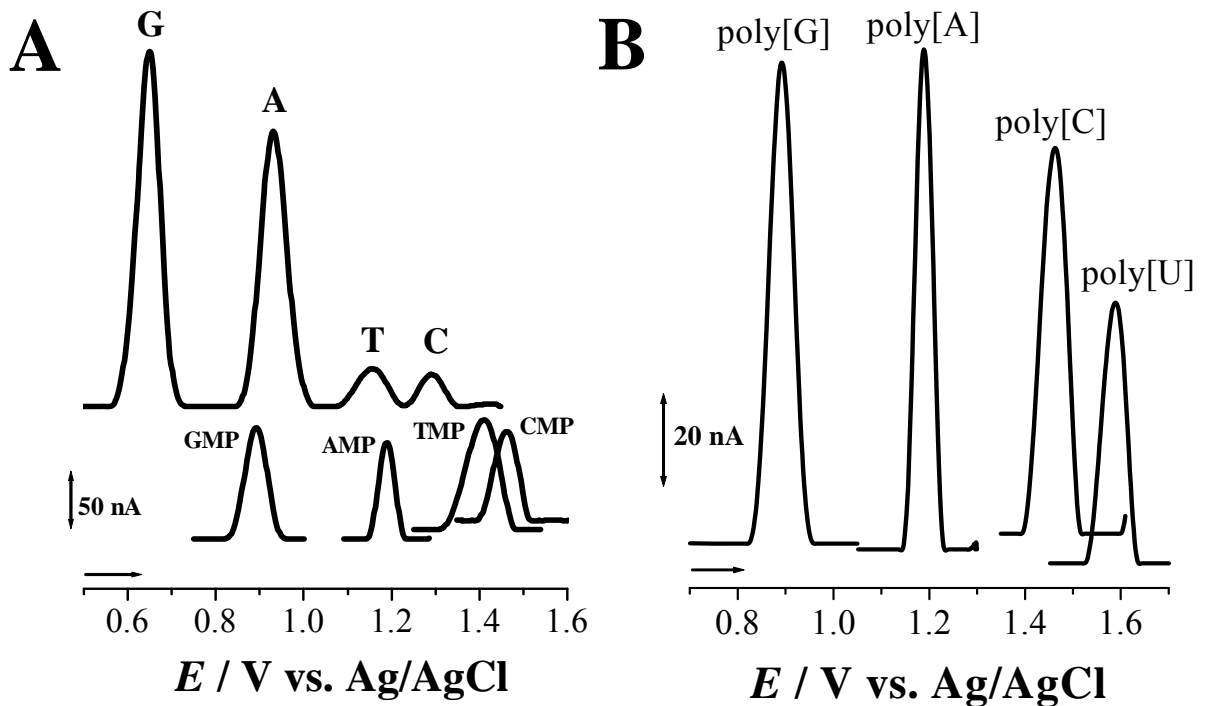


Figura 1.14 - Voltamograma de DP com linha de base corrigida obtidos com um GCE para soluções em tampão fosfato 0,1 M pH = 7,4 de: (A) uma mistura equimolar de guanina (G), adenina (A), timina (T), e citosina (C) de 20 μ M; 20 μ M guanosina-5-monofosfato (GMP); 20 μ M adenosina-5-monofosfato (AMP); 500 μ M timidina-5-monofosfato (TMP) e 500 μ M citidina-5-monofosfato (CMP) (B) 40 μ g/mL poly [G] e 40 μ g/mL poly [A], 100 μ g/mL poly [C] e 250 μ g/mL poly [U]. Amplitude de impulso 50 mV; largura do impulso 70 ms; e velocidade de varrimento 5 mV/s [179,180].

A adsorção do dsDNA sobre a superfície hidrofóbica do HOPG foi investigada por AFM, e a influência de cada componente, das bases purinas e pirimidinas, do açúcar e dos grupos fosfatos foi determinada [201, 202]. A adsorção do dsDNA é muito dependente da estrutura da dupla hélice do dsDNA carregada negativamente, um polianião hidrofílico. Consequentemente uma vez que todas as bases do dsDNA (parte hidrofóbica) estão no interior da dupla hélice a sua imobilização por adsorção espontânea na superfície do HOPG envolve fracas interações hidrofílicas – hidrofóbicas.

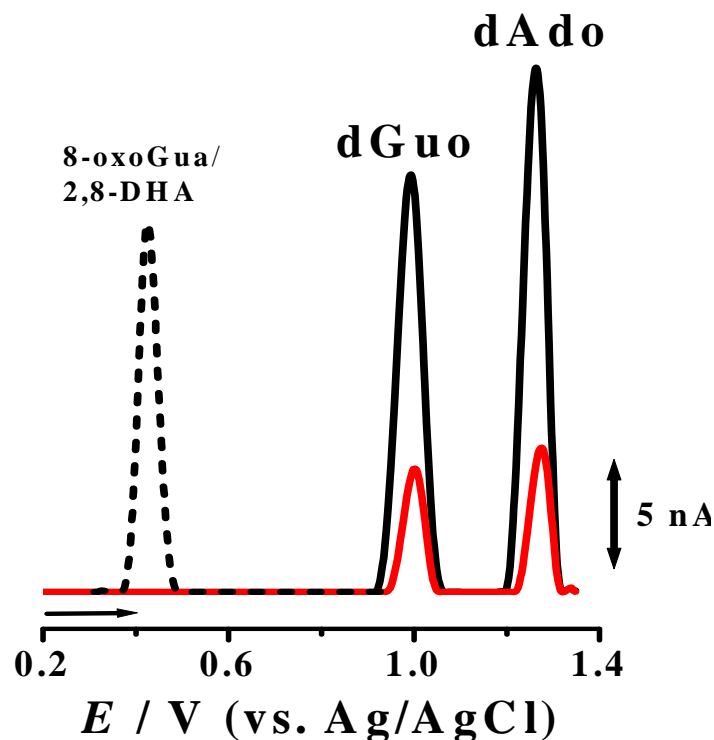


Figura 1.15 – Voltamogramas de DP com linha de base corrigida obtidos com o eletrodo de carbono vítreo para soluções em tampão acetato 0,1 M pH = 4,5: 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ssDNA (—); 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA (—) e 5 μM de 8-oxoGua ou 2,8 DHA (---).

No ssDNA as bases estão mais expostas na solução, o que facilita a interação dos anéis aromáticos hidrofóbicos das purinas e das pirimidinas com o substrato também hidrofóbico. Consequentemente o ssDNA interage e adsorve muito mais fortemente sobre o HOPG, quando comparado com o dsDNA a partir de uma solução da mesma concentração [203].

A oxidação da guanina origina a 8-oxoguanina (8-oxoGua) [195]. A presença da 8-oxoGua leva à codificação errada da base adenina durante a síntese do DNA. Por seu lado, a oxidação da adenina leva à formação de 2-hidroxiadenina ou de 8-hidroxiadenina [183, 184], **fig. 1.15**. Por voltametria de DP é possível identificar a presença dos produtos de oxidação, 8-oxoGua e/ou 2,8-DHA [192, 204] no DNA, **Fig. 1.15**.

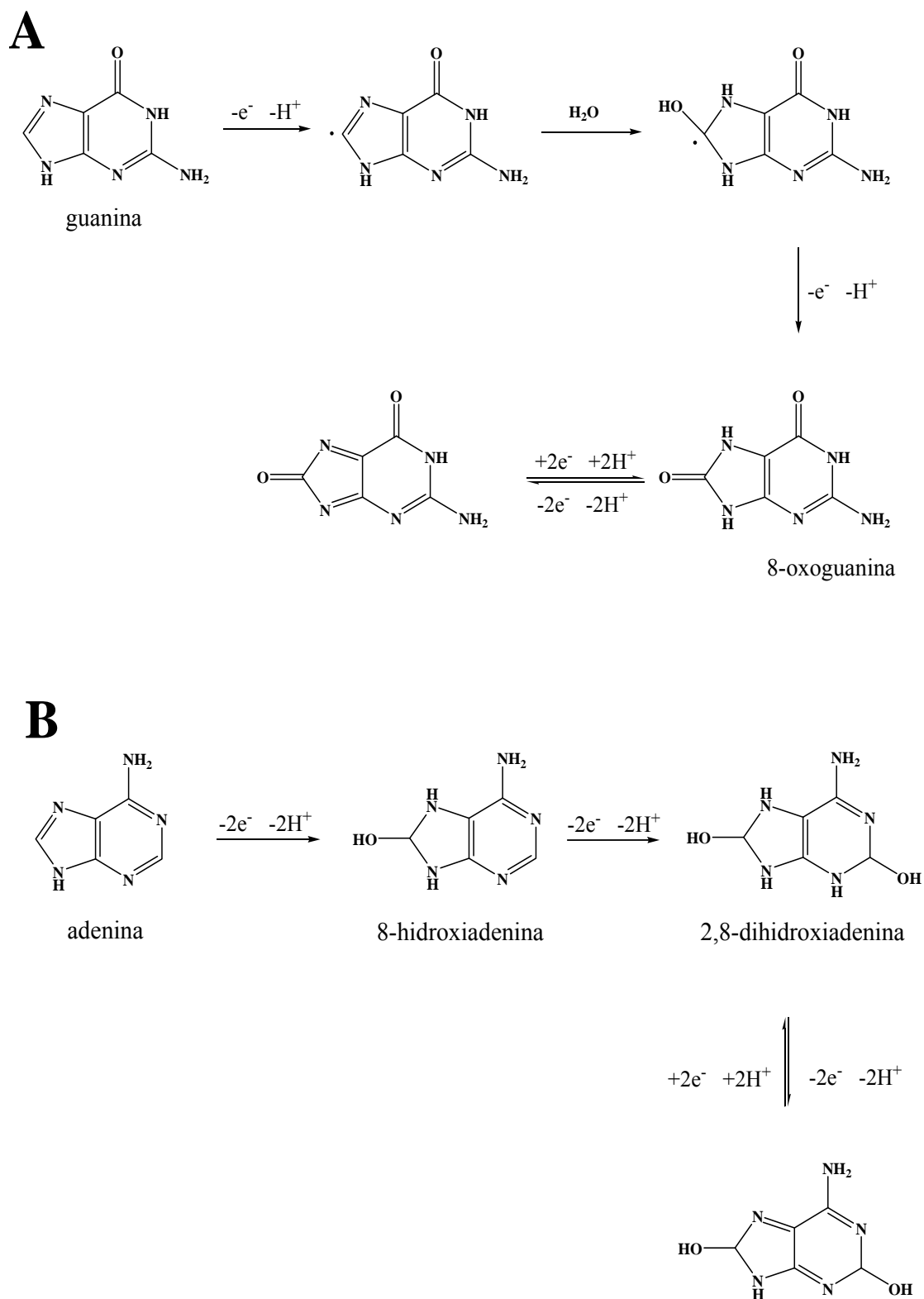


Figura 1.16- Mecanismos de oxidação da (A) guanina e (B) adenina. Adaptado de [205,206].

Sendo a 8-oxoGua o produto da oxidação da guanina, a reação ocorre com transferência de dois prótons e dois elétrons num processo irreversível [174], **Fig. 1.16A**.

Por sua vez a 8-oxoGua sofre oxidação num processo reversível seguido da rápida hidrólise. A reação é dependente do pH do meio, tendo sido descritos vários produtos de oxidação de 8-oxoGua, entre estes: a ureia, 2-amino-4,5,6-trioxipirimidina ou 5-guanidinohidantoína.

A oxidação da adenina é um processo irreversível que envolve a perda de dois elétrons e de dois prótons [204] com a formação de produtos intermediários, 2-hidroxiadenina ou 8-hidroxiadenina, como pode ser observado na **Fig. 1.16B**. Estes produtos intermediários podem sofrer oxidação, com a transferência de dois elétrons e de dois prótons, levando à formação da 2,8-dihidroxiadenina.

O estudo da oxidação do DNA em elétrodos de carbono está baseado na monitorização de variações nas correntes das bases purínicas ou na deteção dos seus produtos de oxidação principais, 8-oxoGua e/ou 2,8-DHA, considerados marcadores biológicos de dano oxidativo [192].

Várias aplicações práticas norteiam e impulsionam o estudo electroquímico dos ácidos nucleicos.

Estas técnicas são ainda muito importantes no desenvolvimento de métodos de sequenciação de DNA e principalmente, para no estudo do mecanismo da interacção específica do DNA com agentes cancerígenos assim como com outros componentes celulares.

2.2 Biossensores eletroquímicos com DNA

Os biossensores eletroquímicos com DNA consistem num eletrodo com DNA imobilizado na sua superfície e permitem a detecção rápida e sensível simultaneamente dos danos no DNA e dos agentes responsáveis por esses danos no DNA. Os biossensores eletroquímicos de DNA provaram ser excelentes ferramentas para investigar os efeitos de várias fontes endógenas e exógenas perigosas material genómico, devido à fácil e simples construção, à rapidez do ensaio e à sua elevada especificidade, eliminando a necessidade de outras técnicas de purificação, tempo e custos associados a isso [207-209].

O desenvolvimento de um biossensor eletroquímico com DNA implica uma boa compreensão do comportamento eletroquímico do DNA, pois as diferentes estruturas que o DNA pode adotar na solução influenciam a morfologia e o grau de cobertura com DNA da superfície do transdutor eletroquímico. As diferentes estruturas e conformações adotadas pelos ácidos nucleicos na superfície do eletrodo conduzem a modificações na acessibilidade dos fármacos para os sulcos do DNA.

A formação e a estabilidade dos filmes de DNA, bem como a resposta eletroquímica dos eletrodos modificados dependem das características e das condições de pré-tratamento da superfície do eletrodo, do método de imobilização utilizado, do tempo de adsorção, da sequência de bases de DNA, do comprimento da cadeia, da concentração, do pH, da força iónica e da composição dos eletrólitos de suporte utilizados. Consequentemente, a compreensão do modo como estes fatores influenciam as características dos biossensores com DNA é essencial para o seu desenvolvimento e correta aplicação, e, a sensibilidade e a confiança na resposta eletroquímica dos biossensores eletroquímicos com DNA está relacionada com o procedimento escolhido

para a sua construção. O fator mais importante é a imobilização do DNA na superfície do eletrodo, usualmente feito para $4,5 < \text{pH} < 5,5$, devido à melhor adsorção do DNA sobre a superfície do carbono, conseqüentemente conduzindo um melhor sinal eletroquímico.

Existem diferentes procedimentos experimentais que podem ser seguidos para construção de diferentes biossensores eletroquímicos com DNA e os mesmos são dependentes da aplicação requerida, sendo que os procedimentos usados são:

Biossensor de dsDNA de camada fina

Preparado por imersão do GCE ($d = 1,5 \text{ mm}$) numa solução $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA durante 10 minutos com aplicação de um potencial de $+ 0,30 \text{ V}$ (vs Ag/AgCl), **Fig. 1.17B**. Depois de seco, o biossensor é incubado com a composto a estudar.

Biossensor de dsDNA multicamada:

Preparado pela cobertura, camada por camada, do GCE ($d = 1,5 \text{ mm}$) com três gotas sucessivas de $5 \mu\text{L}$ de uma solução $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA. Entre cada gota adicionada, a superfície do eletrodo é seca com fluxo constante de azoto, **Fig. 1.17C**. Depois de completamente seco, o biossensor é incubado com o composto a estudar.

Biossensor de dsDNA de camada espessa:

Preparado pela cobertura do GCE ($d = 1,5 \text{ mm}$) com uma gota de $10 \mu\text{L}$ de uma solução 35 mg mL^{-1} dsDNA. Depois o biossensor é seco em atmosfera normal durante aproximadamente 24 h e por último novamente hidratado na solução tampão $\text{pH} = 4,5$ por volta de 30 minutos, **Fig. 1.17D**. Depois de completamente hidratado, o biossensor é incubado com o composto a estudar.

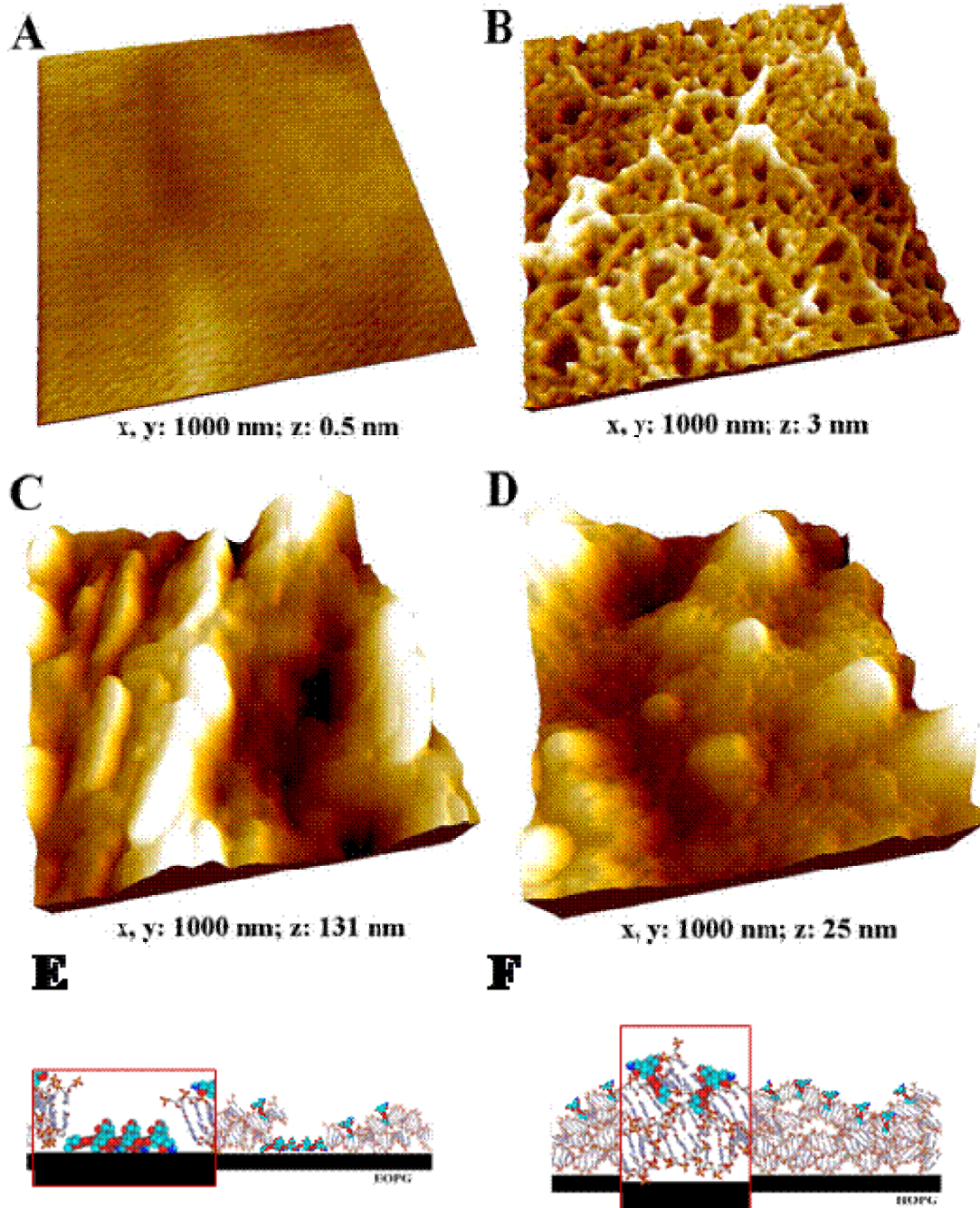


Figura. 1.17 – Imagens topográficas obtidas em ar com o modo MAC de AFM para: (A) a superfície do electrodo de HOPG limpa; (B) um biossensor de dsDNA de camada fina com uma solução de dsDNA em tampão acetato pH 4,5; (C) um biossensor de dsDNA multicamada com uma solução de dsDNA em tampão acetato pH 4,5 (D) um biossensor de dsDNA de camada espessa com uma solução de dsDNA em tampão acetato pH = 4,5; (E, F) Modelo esquemático para a interacção dsDNA-droga antineoplásica usando um biossensor electroquímico de dsDNA (E) de camada fina e (F) de camada espessa [201,202].

A adsorção do DNA num biossensor de camada fina preparado num eléctrodo de HOPG mostrou um filme reticular de DNA ligeiramente irregular que apresentava poros, correspondentes à região escura das imagens de AFM, **Fig. 1.17**, e exibindo no fundo dos poros a superfície do HOPG situada por baixo. Esses poros permitem que as moléculas no interior da solução se difundam e adsorvam na superfície não coberta do eléctrodo. Se a molécula é hidrofóbica e eletroativa, serão obtidas duas contribuições diferentes para o sinal eletroquímico, uma da molécula adsorvida e a outra do DNA modificado ou danificado.

Muitas vezes estas duas contribuições podem dificultar a interpretação e análise de resultados, devido à difícil distinção destas contribuições do sinal eletroquímico, **Fig. 1.17E**.

A adsorção não-específica da substância no eléctrodo não ocorre nos biossensores electroquímicos com DNA multicamada ou de camada espessa, uma vez que é obtida uma cobertura completa da superfície do eléctrodo em ambos os biossensores, **Fig. 1.17C, D e F**.

Consequentemente a resposta do biossensor eletroquímico é determinada apenas pela interacção do dsDNA com as moléculas intercaladas na camada do filme, **Fig. 1.17F**, sem a contribuição da molécula existente no interior da solução devido à total cobertura da superfície do eléctrodo [209].

A principal vantagem do biossensor eletroquímico multicamada quando comparado com o biossensor de camada espessa é o curto tempo de preparação necessário para a construção do biossensor eletroquímico multicamada.

3. PRINCÍPIOS DE ELETROQUÍMICA

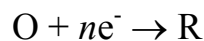
A eletroquímica [210, 211] envolve o estudo dos fenômenos químicos associados à separação de cargas. A separação de cargas pode ocorrer homoganeamente em solução, ou heterogeneamente na superfície do eletrodo e resulta da transferência de elétrons.

Para assegurar a eletroneutralidade, ocorrem duas ou várias reações de transferência de carga, em direções opostas. Com exceção das reações homogêneas, as reações de transferência de carga estão separadas no espaço, ocorrendo em eletrodos diferentes, imersos em solução numa célula eletroquímica.

De modo à carga ser transportada, estes eletrodos estão ligados por meios condutores, tanto na solução (através do *eletrólito de suporte* – transporte iônico) como externamente (através de fios elétricos).

3.1 Reações de eletrodo

No caso das espécies oxidadas O, e reduzidas R, a reação redox pode ser esquematicamente representada:



onde O recebe n elétrons para se transformar em R.

O par O | R tem uma energia associada que pode ser relacionada com o potencial de eletrodo, chama-se a esta energia redox, E_{redox} . A aplicação de um potencial ao eletrodo, influencia o nível eletrônico ocupado mais elevado no eletrodo, o nível Fermi,

E_F – os elétrons num eletrodo de trabalho são sempre transferidos de e para o nível Fermi.

A reação eletroquímica a investigar ocorre na superfície do *eletrodo de trabalho*, na interface eletrodo-eletrólito de suporte.

O potencial deste eletrodo é controlado através do *eletrodo de referência* com a ajuda de um potenciostato. O eletrodo de referência utilizado numa experiência eletroquímica deve possuir uma impedância elevada de forma a por ele não passar corrente.

A corrente da célula eletroquímica flui entre o eletrodo de trabalho e o *eletrodo auxiliar* através do eletrólito de suporte.

Quando se aplica um potencial conhecido ao eletrodo de trabalho durante uma experiência eletroquímica, as espécies eletricamente carregadas serão eletrostaticamente atraídas para a superfície do eletrodo; as espécies não carregadas também podem ser atraídas para a superfície do eletrodo por adsorção.

Portanto, quando se descreve um processo de eletrodo deve ter-se em conta tanto o transporte das espécies para a superfície do eletrodo e a reação no eletrodo.

Na célula eletroquímica, o movimento dos compostos designa-se por transporte de massa [210] e existem três modos de transporte de massa, a migração, a convecção e a difusão.

O transporte de massa por migração consiste no movimento das espécies carregadas devido à sua interação com um campo elétrico, este efeito de migração é minimizado com a utilização de um eletrólito de suporte inerte [210].

A convecção é provocada pelo movimento mecânico do fluido; a solução agitada transporta as moléculas de e para a superfície do eletrodo [210].

A difusão representa o transporte das espécies devido a um gradiente de concentração do interior da solução (de maior concentração) para a superfície do eletródo (de menor concentração e a migração é o movimento. Junto à superfície do eletródo (*camada de difusão*) as espécies são transportadas apenas através da difusão,

Fig. 1.18. Alguns parâmetros são definidos:

1- k_d – o coeficiente de transferência de massa que descreve o processo de difusão da solução para proximidade da superfície do eletródo. O processo é seguindo as leis do Fick.

2- k_a e k_c – as constantes que descrevem a cinética da reação, constantes de velocidade de transferência de carga anódica e catódica, respetivamente. As constantes de transferência de carga estão descritas pelas fórmulas de Butler – Volmer:

$$k_a = k_0 \exp [\alpha_a n F (E - E^{0'}) / RT] \quad (1.1)$$

$$k_c = k_0 \exp [-\alpha_c n F (E - E^{0'}) / RT] \quad (1.2)$$

onde k_0 é a constante de velocidade padrão da reação eletroquímica.

Dos processos apresentados na **Fig. 1.18** distinguem-se dois casos extremos:

a - $k_0 \gg k_d$ – *reação reversível*, para qualquer potencial, há sempre equilíbrio na superfície do eletródo. A corrente é determinada só pelas diferenças de energia eletrónica entre o eletródo e as espécies na solução e a sua velocidade para alcançar a superfície do eletródo.

b - $k_0 \ll k_d$ – *reação irreversível*, quando são atingidos potenciais bastante elevados para que a reação ocorra, o transporte de massa não influencia a constante de transferência de carga e então o processo é controlado pela cinética lenta da reação.

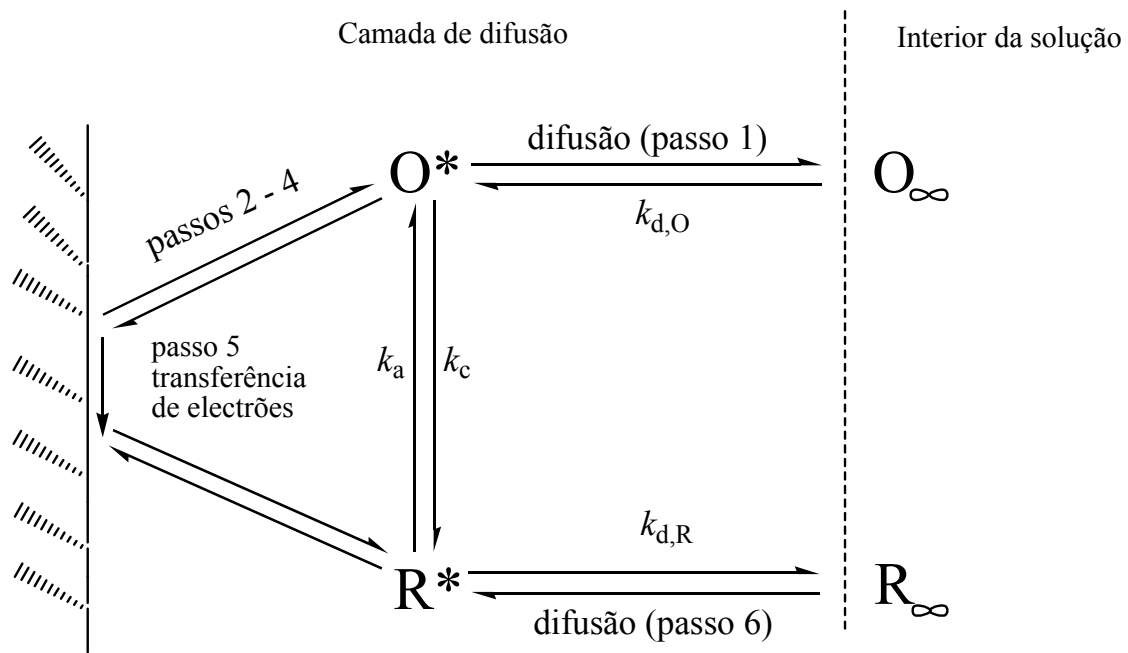


Figura 1.18 - Esquema da transferência de elétron num eletrodo; Passo 1 - difusão; Passo 2 - rearranjo da atmosfera iônica; Passo 3 – Reorientação dos dipolos do solvente; Passo 4 – Alterações nas distâncias entre o íon central e os ligandos; Passo 5 – Transferência do elétron, Passo 6 - difusão.

3- a formação da *dupla camada eletrolítica*. A dupla camada eletrolítica é a região interfacial onde ocorrem as reações eletroquímicas e onde o valor do potencial eletrostático difere do interior da solução. A designação reflete os primeiros modelos desenvolvidos para descrever esta região. O conceito básico consiste num ordenamento de cargas na superfície do eletrodo e num ordenamento de uma quantidade igual de carga oposta para neutralizar a carga do eletrodo. A constante de proporcionalidade entre o potencial aplicado ao eletrodo e a carga devida às espécies ordenadas na região interfacial é a *capacidade de dupla camada*.

Considera-se por convenção, em todas as experiências eletroquímicas, que durante a reação de oxidação o eletrodo de trabalho funciona como recetor de elétrons transferidos e a corrente tem um valor positivo, a corrente anódica, I_a . Ao contrário,

durante a reação de redução o eletrodo de trabalho funciona como dador de elétrons e a corrente registrada tem um valor negativo, a corrente catódica, I_c .

A escolha de um material de eletrodo depende em principal do intervalo útil de potencial do eletrodo no solvente utilizado, e da qualidade e pureza do material.

As reações eletroquímicas são normalmente mais lentas no carbono do que nos eletrodos metálicos, sendo a cinética da transferência eletrônica dependente da estrutura do material e da preparação da superfície. No entanto, o carbono tem um intervalo de potencial positivo até 1,3 V, muito maior que os metais que formam óxidos metálicos para potenciais de $\sim 0,8V$.

O carbono tem uma grande atividade superficial, o que explica a sua suscetibilidade ao bloqueamento do eletrodo por compostos orgânicos. Na superfície de carbono podem ser realizadas ligações com hidrogênio, grupos hidroxilo e carbonil, o que significa que o comportamento desses eletrodos pode ser sensível ao pH [210].

O carbono vítreo é impermeável a líquidos e gases, fácil de polir e compatível com todos os solventes comuns. Estas propriedades têm conduzido à sua utilização generalizada na eletroquímica para determinar o mecanismo de várias reações e na análise voltamétrica. A resistência do carbono vítreo é suficientemente baixa para ser significativa na maioria das aplicações eletroanalíticas. A estrutura de poros desconexos impede a entrada de solvente, mas foi descrita a inserção pouco profunda de íons de eletrólito nos poros localizados na superfície do eletrodo. As cavidades ocasionais, originadas pela formação de bolhas de gás durante o tratamento térmico, cobrem uma pequena fração da área do eletrodo e não parecem afetar significativamente a resposta eletroquímica. A rugosidade da superfície depende assim da técnica de preparação, tem sido relatados fatores de rugosidade no intervalo de 1,3 a 3,5 [212, 213].

3.2 Técnicas de voltametria

A voltametria consiste na medição da corrente que atravessa o eletrodo de trabalho em função de um potencial aplicado. A corrente registrada é composta por uma componente faradaica, I_f , que está diretamente relacionada a transferência de elétrons, e uma componente capacitiva I_c , que é necessária para organizar as moléculas e os íons presentes na dupla camada do eletrodo. A corrente total registrada é:

$$I_t = I_c + I_f$$

Em cada experiência voltamétrica o potencial aplicado tal como a corrente medida variam com o tempo.

A curva de corrente em função de potencial, $I = I(E)$, é registrada sob a forma de um *voltamograma* ou *onda voltamétrica* e a variação de potencial com o tempo designa-se por *velocidade de varrimento*, v .

As técnicas voltamétricas mais usadas são:

- 1 - *métodos de varrimento cíclico de potencial*, que consistem na aplicação ao eletrodo de trabalho de um potencial que varia de forma cíclica ao longo do tempo.
- 2 - *métodos de degrau e impulso*, que consistem na aplicação de um degrau de potencial ou de corrente ao eletrodo de trabalho, que altera instantaneamente o sistema eletroquímico, como a voltametria de impulso diferencial e de onda quadrada.

3.2.1 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (CV – “*Cyclic Voltammetry*”) é a técnica normalmente utilizada para se iniciar o estudo eletroquímico de um determinado composto, sendo vista como uma das técnicas eletroquímicas mais eficazes e versáteis no estudo de mecanismos de sistemas redox. Esta técnica permite obter de forma rápida a informação sobre os potenciais em que ocorrem os processos de transferência de elétron e caracterizar a natureza destes. Nesta técnica, o potencial aplicado ao eletrodo varia linearmente a uma velocidade de varrimento constante, $v = dE / dt$, entre um potencial inicial (E_i), e um potencial final (E_f), previamente escolhidos, **Fig. 1.19**.

Após a inversão da direção do varrimento para o sentido positivo, as espécies R são oxidadas de volta para O, conforme indicado pela corrente anódica [214]. Assim, a voltametria cíclica pode gerar rapidamente uma nova espécie durante o varrimento e, em seguida, analisar a espécie gerada no varrimento em sentido contrário, um aspeto muito importante desta técnica [215].

Na voltametria cíclica, os parâmetros importantes que permitem a caracterização do processo de eletrodo são:

- o potencial do pico anódico (E_{pa})
- a intensidade máxima de corrente que resulta da reação de oxidação ou pico de corrente anódica (I_{pa})
- o potencial de pico catódico (E_{pc})
- a intensidade máxima de corrente que resulta da reação de redução ou pico de corrente catódica (I_{pc})

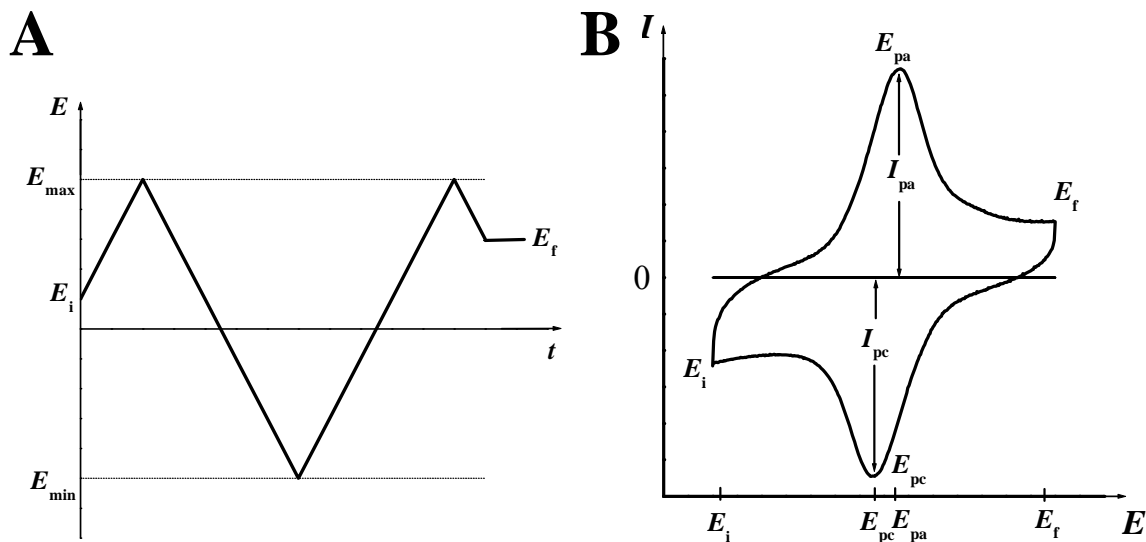


Figura 1.19 – Voltametria cíclica: (A) Representação esquemática da variação do potencial em função do tempo; (B) Voltamograma para um sistema reversível.

Existem várias relações entre os parâmetros definidos e a velocidade de varrimento de potencial, que fornecem informações de natureza termodinâmica e cinética e que permitem caracterizar o sistema.

As condições necessárias para que um determinado sistema eletroquímico possa ser considerado como tendo um comportamento reversível são:

- $I_p \sim v^{1/2}$
- E_p independente de v
- $|E_p - E_{p/2}| = 56/n$ (mV)
- $|E_{pa} - E_{pc}| = 57/n$ (mV)
- $|I_{pa} / I_{pc}| = 1$

Quando estas condições não são verificadas, o sistema pode ser considerado como quase-reversível ou irreversível. A extensão da irreversibilidade de um sistema

intensifica-se com o aumento da velocidade de varrimento, e o valor de $|I_{pa}/I_{pc}|$ tornam-se diferente de 1.

A curva corrente-potencial para uma espécie adsorvida na superfície do eletrodo é dada por:

$$I_{pa} = nFAv \Gamma (4RT)^{-1} \quad (1.4)$$

onde Γ é a concentração de superfície da espécie adsorvida, R é a constante dos gases ideais, T é a temperatura absoluta, I_p é o valor da corrente de pico, n é o número de elétrons transferidos, F é a constante Faraday, A é a superfície do eletrodo e v é a velocidade de varrimento.

A partir desta equação, que só é válida para espécies adsorvidas e para velocidades de varrimento inferiores a 10 mV s^{-1} , pode deduzir-se, para sistemas reversíveis, que a largura a meia altura do pico de corrente é $W_{1/2} = 90,6/n \text{ mV}$ o que permite o cálculo do número de elétrons transferidos, **Fig. 1.20**.

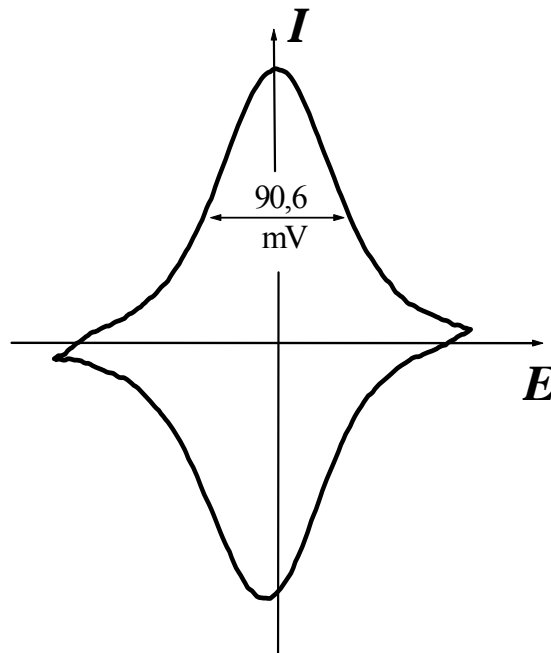


Figura 1.20 – CV para um sistema reversível de espécie adsorvida na superfície do eletrodo.

O voltamograma cíclico de um sistema eletroquímico irreversível pode apresentar picos de corrente que não têm associado qualquer pico no varrimento inverso.

Os principais parâmetros para sistemas irreversíveis são:

- E_p dependente de ν
- $|E_p - E_{p/2}| = 47,7 / (\alpha n)$ (mV)
- $|dE_p/d \log \nu| = 29,6 / (\alpha n)$ (mV)

Entre os processos de eletrodo reversíveis e irreversíveis encontram-se os processos *quasi*-reversíveis, onde se observam picos inversos aquando do varrimento do potencial no sentido oposto, e em que $|E_{pa} - E_{pc}| > 57 / n$ (mV)

3.2.2 Voltametria de impulso diferencial

O principal objetivo no desenvolvimento das técnicas de impulso de potencial foi diminuir o efeito da corrente capacitiva na corrente total registada. Se por um lado a corrente capacitiva decai exponencialmente com o tempo, por outro, a corrente de origem faradaica, proveniente da reação eletroquímica decai a uma velocidade inferior, proporcional a $t^{-1/2}$, **Fig. 1.21**.

Na **Fig. 1.21A** apresenta-se o tipo de onda de potencial aplicado ao eletrodo de trabalho em voltametria de DP e na **Fig. 1.21B** um voltamograma típico de impulso diferencial.

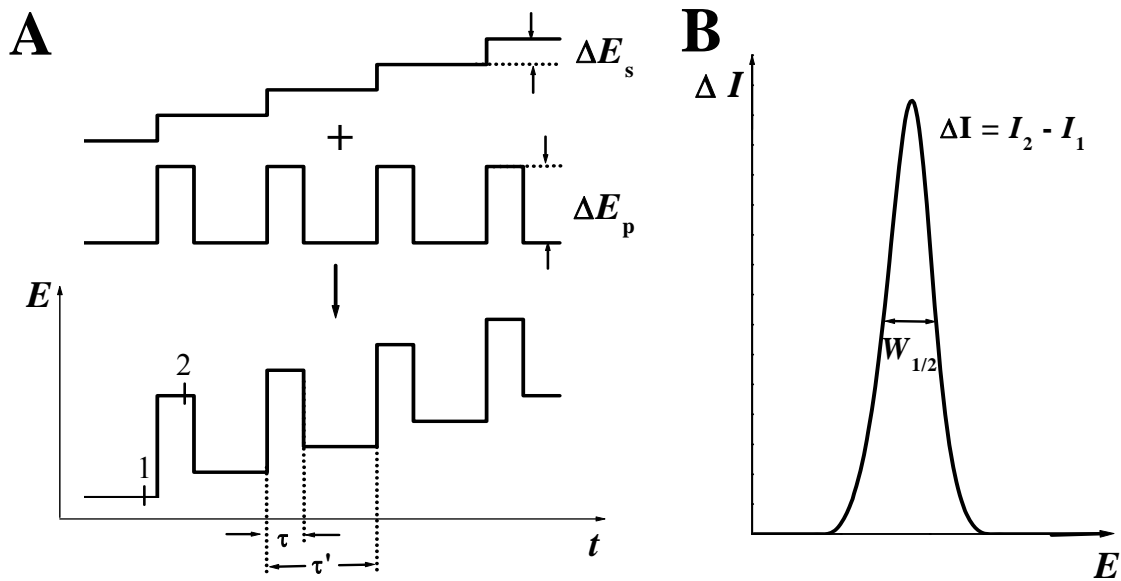


Figura 1.21 – Voltametria de DP: (A) Esquema de aplicação de potenciais; (B) Resposta típica.

A voltametria de impulso diferencial (voltametria de DP – “*Differential Pulse Voltammetry*”) consiste na aplicação de pequenos impulsos de amplitude crescente ΔE_p (amplitude de impulso) sobre um potencial-base, E_{base} , sendo o aumento de amplitude sempre igual, ΔE_s .

As medições de corrente são efetuadas um certo tempo antes (I_1) e depois (I_2) da aplicação de impulso, **Fig. 1.21A**. A diferença entre estas correntes é o valor de corrente registrado num voltamograma de impulso diferencial, **Fig. 1.21B**.

O tempo τ é o intervalo entre duas aplicações sucessivas de impulso e determina conjuntamente com o valor de ΔE_s a velocidade de varrimento, $\nu = \tau \Delta E_s$. Normalmente, a velocidade de varrimento varia entre 1 e 10 mV s^{-1} .

A amplitude escolhida para o impulso de potencial ΔE_p deve ter em conta não só a sensibilidade como a reação em estudo, sendo que amplitudes elevadas geram

correntes capacitivas residuais que podem diminuir a possibilidade de detetar a corrente faradaica.

Para pequenas amplitudes de impulso, a largura a meia altura $W_{1/2}$ do pico de corrente, é inversamente proporcional ao número de eletrões transferidos ($91/n$),

$$W_{1/2} = 3,52 RT / nF$$

o que permite caracterizar o mecanismo da reação de transferência de carga. A intensidade do pico de corrente I_p é proporcional à concentração do analito, mas também depende da velocidade da reação eletroquímica.

3.2.3 Voltametria de onda quadrada

A voltametria de onda quadrada (Voltametria SW - “*Square Wave Voltammetry*”) tornou-se uma importante técnica analítica. A onda gerada consiste numa onda quadrada de impulso ΔE_p de larga amplitude sobreposta a uma escada de potencial com degraus de amplitude ΔE_s e com um período τ [216-218] ,**Fig. 1.22**.

Devido à construção da onda, durante cada ciclo de frequência $f = \tau^{-1}$, um impulso de potencial positivo é aplicado ao elétrodo durante metade do ciclo a que se segue, na restante metade, a aplicação de um impulso de potencial igual negativo.

Na voltametria de SW, o tipo de onda de potencial e a resposta típica de um sistema reversível estão na **Fig. 1.22**. Em voltametria de SW a amostragem da corrente é efetuada antes do fim de ambos os impulsos, positivo e negativo, em cada ciclo (1 e 2 na **Fig. 1.22A**). A corrente total, $\Delta I (I_t)$ que é registrada, corresponde à diferença entre a corrente $I(1)$ registrada no final do impulso de potencial direto - corrente direta (I_f - forward current), e a corrente $I(2)$ registrada no final do impulso inverso – corrente

inversa (I_b – backward current), logo $I(2)$ possui sinal contrário a $I(1)$. Daqui resulta que, para sistemas reversíveis $\Delta I = I(1) - I(2)$ é maior do que $I(1)$.

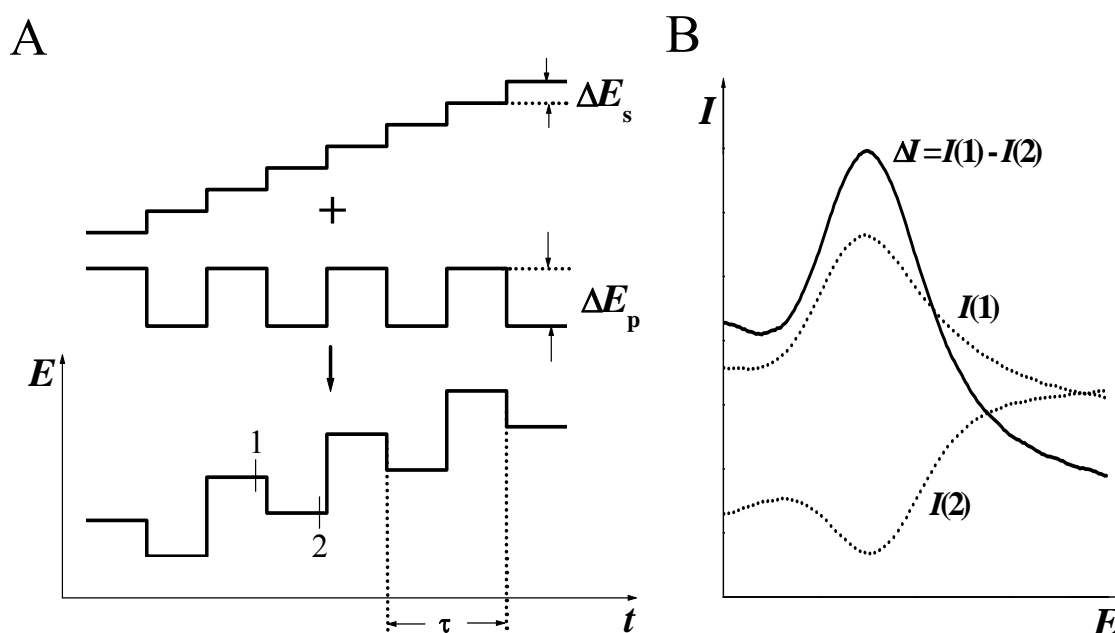


Figura 1.22 – Voltametria SW: (A) Esquema de aplicação de potenciais; (B) Resposta típica.

A velocidade efetiva para uma análise por voltametria SW é dada em função do incremento do varrimento de potencial e a frequência de aplicação dos pulsos de potencial ($f\Delta E_s$). Sendo assim, tempos experimentais muito curtos podem ser obtidos utilizando-se frequências moderadas, de maneira que os dados obtidos possam oferecer informações sobre a cinética do processo eletrodico. Este tipo de amostragem e tratamento da corrente é responsável pela maior sensibilidade apresentada pela voltametria de onda quadrada relativamente à voltametria de impulso diferencial, no caso de sistemas reversíveis. Outra característica desta técnica, que advém da subtração das correntes diretas e inversas, é o facto de permitir a realização de determinações eletroanalíticas sem necessidade de desoxigenação da amostra para estudos de redução, o que torna a análise menos morosa e dispendiosa.

CAPÍTULO II

EXPERIMENTAL

Neste capítulo é feita uma descrição dos reagentes e soluções, da instrumentação das técnicas de análise e execução das experiências, exposição dos parâmetros voltamétricos utilizados nos métodos eletroquímicos usados ao longo do trabalho e das condições experimentais relativamente ao condicionamento da superfície do GCE e a modificação da sua superfície com o DNA.

1. REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os compostos, **Tab. 2.1**, foram utilizados sem purificação adicional. Não só as soluções mãe de cada um dos compostos, assim como, todas as soluções de

eletrólito de suporte, foram preparadas em água (condutividade < 0,1 $\mu\text{S cm}^{-1}$) purificada pelo sistema Millipore Milli-Q System, Millipore S.A., Molsheim, França.

Tabela 2.1 – Compostos e as concentrações das soluções utilizadas

Compostos	Abreviatura	Concentração	Proveniência
metolazona	MT	$6,6 \times 10^{-5}$ M	Sigma-Aldrich
ácido úsnico	UA	estado sólido	Sigma-Aldrich
omeprazol	OMZ	$6,0 \times 10^{-5}$ M	Sigma-Aldrich
metotrexato	MTX	$2,0 \times 10^{-4}$ M	Sigma-Aldrich
cladribina	CLD	$1,3 \times 10^{-3}$ M	Sigma-Aldrich
cloforabina	CLF	$1,6 \times 10^{-3}$ M	Sigma-Aldrich
derivados de acridina-triazol	GL15 GL7	$3,1 \times 10^{-4}$ M	Sintetizados e purificados e posteriormente publicados [151]
derivados de fenil-triazol	CL42 CL41 CL2r40	$3,1 \times 10^{-4}$ M	Sintetizados e purificados e posteriormente publicados [158]
ferrocianeto de potássio	$\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	10×10^{-3} M	Sigma-Aldrich
ácido poliguanílico	Poly [G]	$300 \mu\text{g mL}^{-1}$	Sigma-Aldrich
ácido poliadenílico	Poly [A]	$300 \mu\text{g mL}^{-1}$	Sigma-Aldrich
DNA dupla hélice	dsDNA	$300 \mu\text{g mL}^{-1}$	Sigma-Aldrich

Após a preparação das soluções mãe, estas foram guardadas a 4°C até à sua utilização. As concentrações específicas utilizadas durante as medidas voltamétricas estão referidas no texto e foram obtidas na célula eletroquímica através da diluição do composto no eletrólito desejado.

As soluções saturadas com N₂ foram preparadas pela passagem do fluxo de gás de elevada pureza através das soluções durante 10 minutos antes do início do ensaio voltamétrico. Durante o ensaio foi mantido um fluxo do gás sobre as soluções.

Todas as soluções mãe de DNA de dupla hélice (dsDNA), proveniente do timo de vitela (calf thymus) tipo II (“altamente polimerizado” 62% de Na/13% de água e comprimento de 10,000-15,000 bp), foram preparadas com água desionizada e a concentração foi determinada por espectrofotometria: 1u A_{260nm} = 50 µg mL⁻¹ dsDNA.

Foi adicionado 5 µL de HCl 0,2M às soluções mãe de GL15, GL7, CL41, CL41 e CL2r50 para garantir a sua completa dissolução.

A solução de K₄[Fe(CN)₆] foi preparada em ácido sulfúrico 0,5 M com pH = 0,55.

No caso do ácido úsnico (UA), como o composto é muito pouco solúvel em água, utilizou-se o sólido mecanicamente ligado à superfície do CGE.

Todas as medidas experimentais foram efetuadas à temperatura ambiente de 25 ± 1 °C. As soluções de eletrólito de suporte de diferentes valores de pH, com força iónica igual a 0,1 M, foram preparadas em conformidade com a **Tab. 2.2**, a partir de reagentes de pureza analítica.

As medições de pH foram realizadas com um medidor de pH Crison micropH 2001 com um elétrodo de vidro Ingold.

Tabela 2.2 - Composição das soluções de eletrólito de suporte.

Eletrólito de suporte	pH
HCl + KCl	1,0
HCl + KCl	2,0
HAcO + NaAcO	3,4
HAcO + NaAcO	4,3
HAcO + NaAcO	5,4
NaH ₂ PO ₄ + Na ₂ HPO ₄	6,0
NaH ₂ PO ₄ + Na ₂ HPO ₄	7,0
NaH ₂ PO ₄ + Na ₂ HPO ₄	8,0
Na ₂ B ₄ O ₇ + NaOH	9,2
NH ₃ + NH ₄ Cl	10,5
NaHCO ₃ + NaOH	11,0
NH ₃ + NH ₄ Cl	12,0

Para dosear os nano e os micro-volumes de solução preparados e utilizados ao longo das experiências, foram usadas pipetas ajustáveis Pipetman P1000, P200 e P20 da Gilson S.A., Villiers-le-Bel, França, e micropipetas computadorizadas EP-10 e EP-100 Plus da Rainin Instruments Co. Inc., Woburn, USA.

2. INSTRUMENTAÇÃO

As medidas de voltametria foram efetuadas utilizando um potenciostat/galvanostat Autolab, da Autolab Electrochemical Instruments, Utrecht, Holanda, funcionando no modo potenciostático, **Fig. 2.1**.



Figura 2.1 – Imagem do potenciostat Autolab

O controlo dos parâmetros voltamétricos, a aquisição e o tratamento dos dados obtidos, foram efetuados por intermédio do software GPES (General Purpose Electrochemical System) versão 4.9, da Echo-Chemie, Utrecht, Holanda.

Todos os voltamogramas eletroquímicos e espectros de absorvância estão apresentados utilizando o programa ORIGIN, versão 6.0 da Microcal Software, Inc., USA. Os algoritmos *Savitsky-Golay*, *adjacent averaging* e *FFT Filter* foram utilizados sempre que houve necessidade de eliminar o ruído de fundo sobreposto ao sinal voltamétrico.

Os programas CHEMDRAW ULTRA e CHEM3D ULTRA, versão 8.0, de Cambridge Soft Corporation, foram utilizados para desenhar as estruturas das moléculas.

Todas as experiências foram efetuadas numa célula eletroquímica, **Fig. 2.2**, de um único compartimento com uma capacidade volumétrica máxima de 3 mL. Utilizou-se como eletrodo de trabalho um eletrodo de carbono vítreo - GCE ($\Phi = 1,5$ mm). O eletrodo de referência foi um eletrodo Ag/AgCl e o eletrodo auxiliar um fio de platina, **Fig. 2.2**.



Figura 2.2 Eléttodos utilizados nos estudos eletroquímicos e respetiva célula eletroquímica

Os espectros de absorção foram registados utilizando o espectrofotómetro UV-Vis SPECORD S100 da Analytik Jena GmbH, Jena, Alemanha, com o programa Win Aspect.

As condições experimentais para os espectros de absorção foram: tempo de integração de 25 ms e acumulação de espectros de 1000. Todos os espectros de UV-Vis foram medidos a partir de 190 nm até 350 nm.

3. PARÂMETROS VOLTAMÉTRICOS

Para as medidas voltamétricas por voltametria cíclica (CV) foi sempre utilizado um degrau de potencial $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

Em todos os ensaios realizados em voltametria de DP, foram sempre mantidos constantes os seguintes parâmetros: largura do impulso 70 ms, amplitude de impulso 50 mV e velocidade de varrimento $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Durante as medidas por voltametria de SW foram sempre mantidos constantes os seguintes parâmetros: o degrau de potencial a $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, a amplitude de impulso a 50 mV e velocidade efetiva $\nu_{\text{ef}} = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

A frequência do impulso foi modificada em função da experiência efetuada. Alguns voltamogramas de DP foram sujeitos à correção de linha de base através de um algoritmo matemático “moving average” utilizando um degrau de 1 mV.

Sempre que foram usadas outras condições, elas serão devidamente referidas no texto.

4. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

As soluções utilizadas ao longo deste trabalho foram obtidas por diluição direta da respectiva solução mãe, **Tab. 2.1**, no eletrólito de suporte desejado.

As concentrações e os eletrólitos de suporte utilizados estão referidos no texto. Todavia, existem alguns procedimentos especiais que vão ser descritos.

4.1 Condicionamento da superfície do GCE

Antes de cada utilização a superfície do eléctrodo de trabalho foi limpa mecanicamente e electroquimicamente. A limpeza mecânica do GCE envolve o polimento sequencial com “spray” de grão de diamante de vários tamanhos, de 6 a 1 μm , numa placa de polimento, seguida duma lavagem com água desionizada.

O condicionamento electroquímico da superfície dos eléctrodos foi efetuado depois da limpeza mecânica da superfície do eléctrodo, através do registo de vários voltamogramas de impulso diferencial ou voltamogramas cíclicos na solução de eletrólito de suporte, até que a resposta electroquímica permanece inalterável, comprovando-se assim a limpeza da sua superfície.

Após a limpeza do eléctrodo realizou-se a medição voltamétrica das espécies que se pretenderam estudar. A diluição do composto foi efectuada na própria célula electroquímica a partir da solução mãe. A escolha do eletrólito de suporte e a concentração da solução foi estudada para cada caso. Aplicaram-se as técnicas de voltametria cíclica, impulso diferencial e de onda quadrada nas condições já referidas anteriormente. Depois de cada varrimento registado limpou-se a superfície do eléctrodo para retirar o composto que poderia ter ficado adsorvido, ou os possíveis produtos de oxidação das espécies estudadas, de maneira a não influenciar os varrimentos seguintes.

4.2 Modificação da superfície do GCE com DNA

A modificação do GCE pela imobilização do DNA na sua superfície, conduziu à construção de um biossensor electroquímico com DNA. Esta modificação superficial do eléctrodo de carbono vítreo com DNA consiste na imobilização de DNA na superfície do GCE, previamente limpa e condicionada numa solução de eletrólito de suporte.

Dependendo da concentração da solução de DNA foram obtidos elétrodos modificados com diferentes áreas de superfície.

A aplicação de diferentes métodos de imobilização depende do uso final do eletrodo modificado e da sua interação com as espécies e analitos utilizados como já foi descrito na *secção 2.2 do Capítulo I*. Ao longo deste trabalho apenas foi utilizado o biossensor eletroquímico de dsDNA multicamada:

Biossensor eletroquímico de dsDNA multicamada: preparado pelo cobrimento camada por camada da superfície do GCE ($d = 1,5$ mm) a partir de três gotas sucessivas de 5 μ L de uma solução 50 μ g mL⁻¹ dsDNA. Entre cada gota adicionada a superfície do eletrodo era sempre seca sobre um fluxo constante de azoto. Depois de completamente seco o biossensor foi incubado com a substância de interesse.

Foram sempre realizadas experiências de controle com os biossensores eletroquímicos de dsDNA em eletrólitos de suporte seguindo as mesmas etapas que as usadas para o estudo da interação com os compostos referidos.

Para efetuar experiências de controle foram efetuadas modificações da superfície do GCE com soluções 50 μ g mL⁻¹ poly [G] e 50 μ g mL⁻¹ poly [A] preparadas da mesma maneira que o biossensor eletroquímico com DNA. Assim foram usados também biossensores eletroquímicos com poly [G] e poly [A] de multicamada, com o mesmo procedimento experimental que o efetuado para os biossensores eletroquímicos com dsDNA.

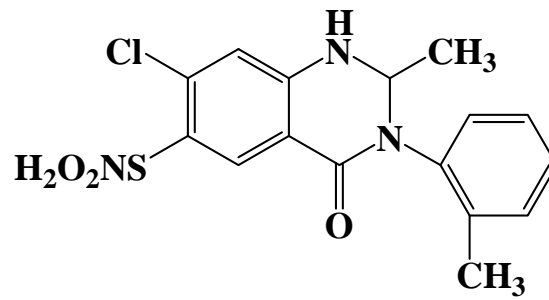
A interação entre dos fármacos antineoplásicos, MTX, CLD, CLF, GL15, GL7, CL42, CL41 e CL2r50, e o DNA foi investigada também diretamente nas amostras incubadas, por detecção eletroquímica no GCE. No caso da interação com o DNA em

solução, as amostras de controlo de dsDNA foram preparadas no tampão escolhido para estudar a interação, armazenadas nas mesmas condições e analisadas após os mesmos períodos de tempo que as amostras incubadas.

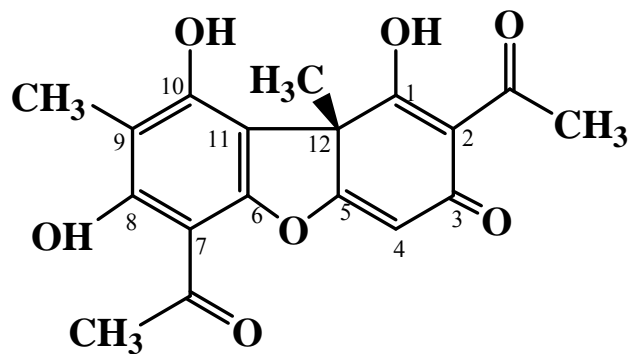
CAPÍTULO III

*METOLAZONA, ÁCIDO ÚSNICO E
OMEPRAZOL – MECANISMOS REDOX*

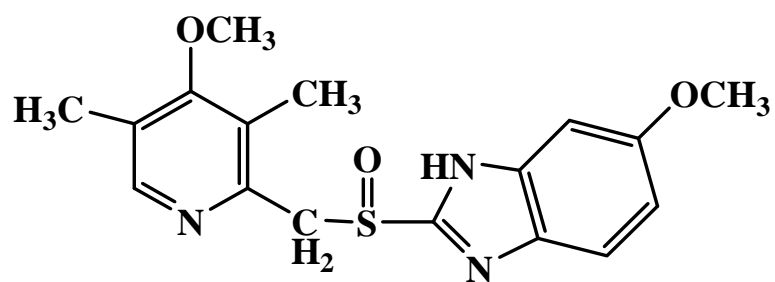
Neste capítulo foi descrito o comportamento eletroquímico de três fármacos, estando dividido em três partes: na primeira parte foi feita uma caracterização sistemática do comportamento eletroquímico de um diurético, a metolazona (MT), numa segunda parte a de um metabolito secundário de líquen usado como analgésico e anti-inflamatório, o ácido úsnico (UA), na terceira o estudo voltamétrico de um inibidor do ácido gástrico, o omeprazol, (OMZ) numa faixa de pH entre 2 e 12. A caracterização foi efetuada por CV, voltametria de DP e voltametria de SW, utilizando sempre um GCE. Foram obtidas informações fundamentais sobre as propriedades intrínsecas destes fármacos, como processos de oxidação e redução em vários meios e o estudo dos mecanismos envolvidos na reação redox na superfície do GCE.



Metolazona



Ácido úsnico



Omeprazol

Figura 3.1 – Estrutura química de: metolazona, ácido úsnico e omeprazol

1. METOLAZONA

A metolazona (MT) [7-cloro-1,2,3,4-tetrahidro-2-metil-4-oxo-3-O-tolil-6-quinazolina-sulfonamida], **Fig. 3.1**, é um diurético tiazídico e antihipertensor.

O comportamento eletroquímico da MT foi inicialmente estudado por CV, com velocidade de varrimento $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, em soluções de concentração $30 \text{ }\mu\text{M}$, preparadas em eletrólitos de suporte com diferentes valores de pH numa faixa de potencial - 1,2 V a + 1,2 V. As soluções foram saturadas com N_2 de forma a evitar a difusão do oxigênio atmosférico para o interior das mesmas.

Os resultados obtidos mostraram apenas picos anódicos em todos os eletrólitos de suporte. A MT não apresenta redução das condições utilizadas, tendo-se procedido ao estudo da oxidação da MT.

1.1 Oxidação

Voltametria cíclica

O estudo da oxidação por CV numa solução $30 \text{ }\mu\text{M}$ MT preparada numa solução de eletrólito de suporte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão de fosfato $0,1 \text{ M}$), saturada com N_2 , num intervalo de potencial + 0,2 V até + 1,3 V, utilizando-se um GCE, **Fig 3.2**, mostrou a ocorrência de dois picos consecutivos bem definidos e separados, pico 1_a e pico 2_a .

A primeira oxidação é reversível, **Fig. 3.2B**, picos 1_a-1_c , sendo a segunda oxidação, pico 2_a , a $E_{p2a} = + 0.815 \text{ V}$, correspondente a um processo irreversível, **Fig. 3.2A**.

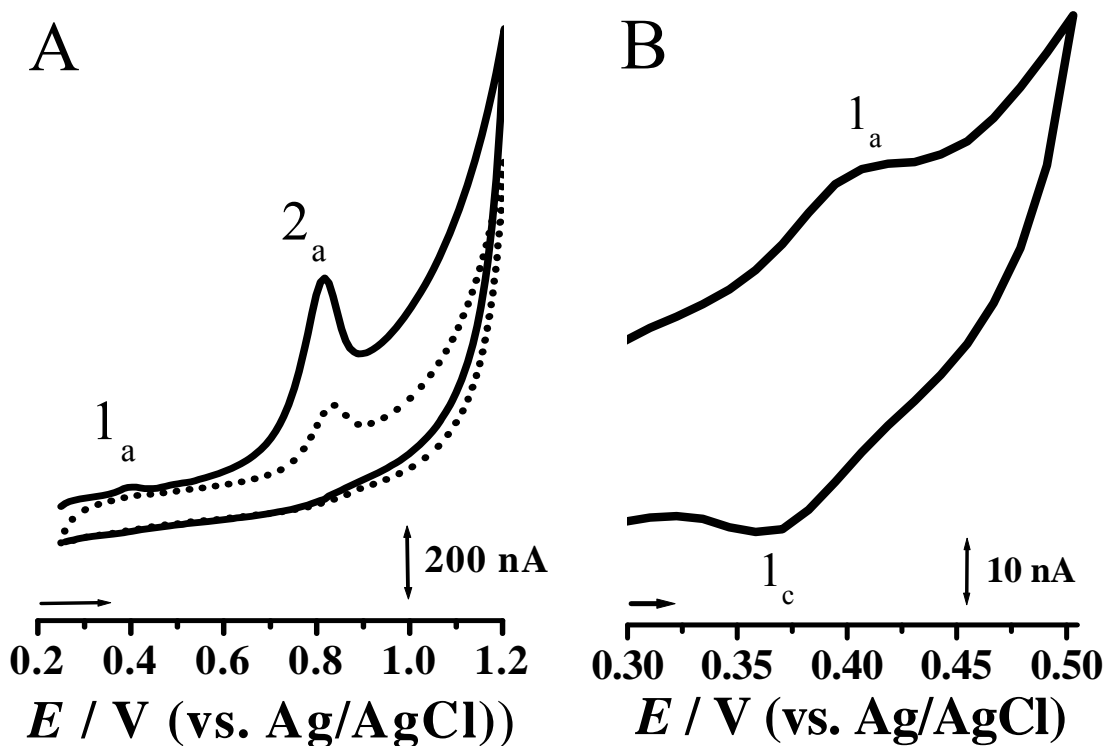


Figura 3.2 - CVs obtidos numa solução 30 μM MT em $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0,1 M): (A) primeiro (—) e segundo (•••) varrimento de potencial entre + 0,20 V e 1,20 V (B) primeiro varrimento numa faixa de potencial entre + 0,30 V e + 0,50 V, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Ainda na mesma solução de MT e sem limpar a superfície de GCE foram registados varios varrimentos sucessivos do potencial. Nesses varrimentos não se verificou a existência de novos picos, o que evidenciou que a oxidação da MT não envolve a formação de quaisquer produtos eletroactivos. Contudo foi observado uma diminuição significativa da intensidade de corrente do pico 2_a e a ausência de corrente referente ao pico 2_a, **Fig. 3.2A**. Esta observação é consequência da forte adsorção dos respectivos produtos de oxidação da MT não eletroactivos à superfície do GCE.

A influência da velocidade de varrimento sobre a corrente do pico 2_a da MT foi avaliada em soluções 30 μM MT preparadas diretamente numa solução de eletrólito de

suporte pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M). Os voltamogramas cíclicos foram registados para diferentes velocidades de varrimento entre 5 e 300 mV s^{-1} , **Fig. 3.3**.

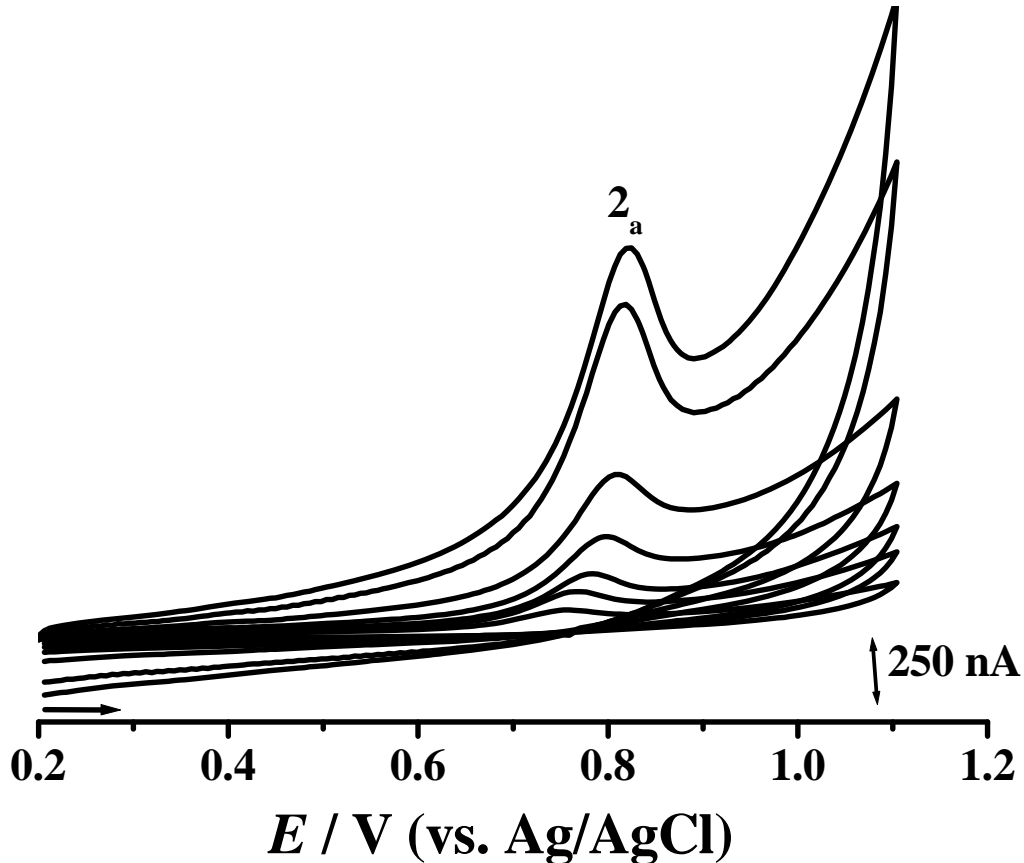


Figura 3.3 - CVs obtidos numa solução 30 μM MT em pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M) para diferentes velocidades de varrimento 5, 10, 20, 50, 100, 200 e 300 mV s^{-1} .

Entre cada medida voltamétrica a superfície do eléctrodo foi sempre limpa. Verificou-se com o aumento da velocidade de varrimento uma variação do potencial do pico 2_a para valores mais positivos, confirmando assim mais uma vez a irreversibilidade deste processo. Uma dependência linear de I_{pa} com v ($R= 0,988$) foi também observada. Este tipo de comportamento é específico das substâncias que adsorvem na superfície do eléctrodo. Isto poderá ser explicado, tendo em consideração que durante uma medida voltamétrica, a quantidade da espécie adsorvida é constante enquanto que a quantidade

de material que difunde para a superfície do eléctrodo varia com o tempo. Em consequência do aumento da velocidade de varrimento ocorre a diminuição dos compostos que difundem da solução e que podem ser oxidados.

Voltametria de impulso diferencial

A influência do pH na oxidação da MT foi estudada em diferentes eletrólitos de suporte numa faixa de pH entre 2 e 12 usando voltametria de DP, **Fig. 3.4**.

Os voltammograms de DP registados foram obtidos a partir de soluções 30 μM MT preparadas em diferentes eletrólitos com força iónica 0,1 M. Os resultados mostraram que a oxidação da MT ocorre em duas etapas, com a formação dos picos 1_a e 2_a. O potencial de ambos os picos é dependente do pH, e o potencial foi deslocado para valores mais negativos com o aumento do pH, **fig. 3.4**.

O declive de 59 mV por unidade de pH é característico dos mecanismos de oxidação que envolvem o mesmo número de eletrões e protões [210], portanto o mecanismo deste primeiro processo de oxidação da MT adsorvida envolve o mesmo número de eletrões e protões, **Fig. 3.4C**.

O número de eletrões transferidos, n , foi determinado pela largura a meia-altura do pico 1_a $W_{1/2} \sim 54$ mV, e como o valor teórico é 90 mV, *secção 3.2.2 do capítulo I*, corresponde a uma reacção de oxidação envolvendo a transferência de dois eletrões. Por consequência, foi concluído que o primeiro processo de oxidação ocorre com a transferência de dois eletrões e dois protões. A inclinação da reta do potencial de oxidação do pico 2_a, 59 mV por unidade de pH, mostrou que o mecanismo deste segundo processo de oxidação da MT adsorvida envolve o mesmo número de eletrões e de protões [210].

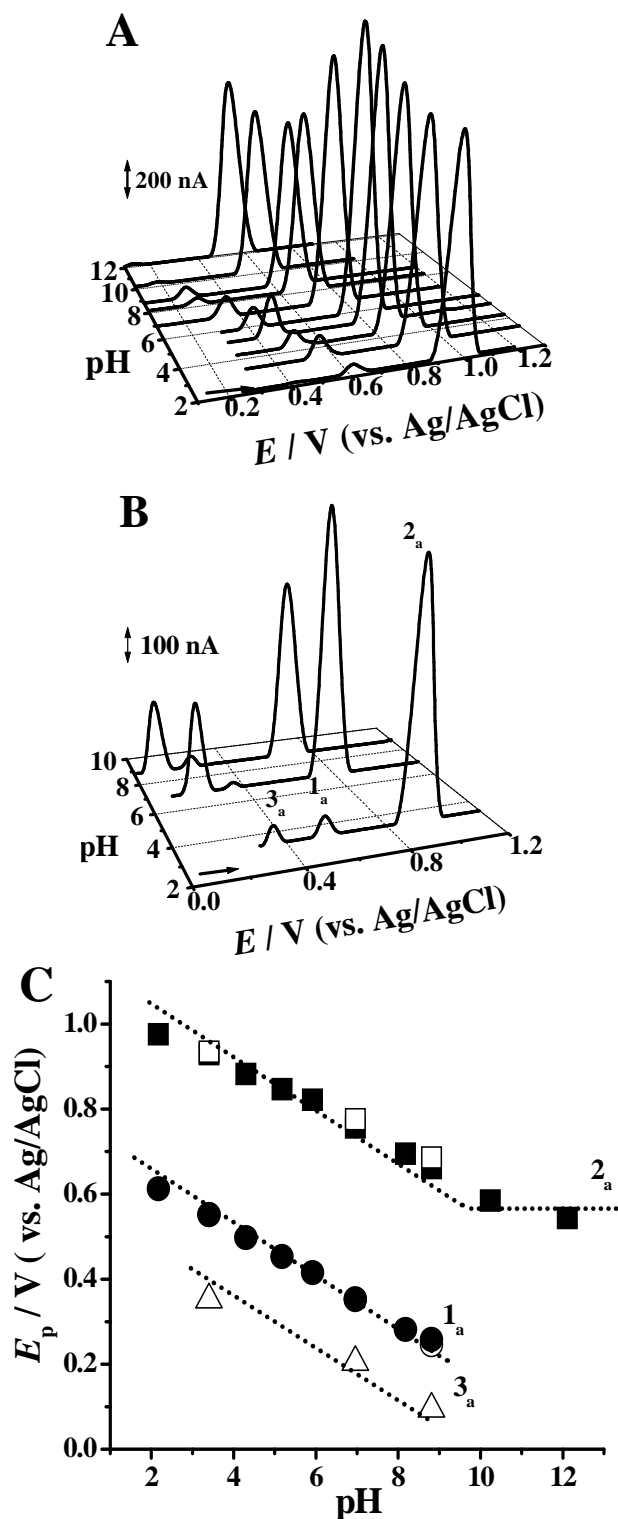


Figura 3.4 –Gráfico 3D dos voltamogramas de DP obtidos em soluções 30 μ M MT em eletrólitos de diferentes valores de pH: (A) primeiro e (B) segundo varrimento obtidos; (C) Gráfico da variação do (●) E_{p1a} e (■) E_{p2a} com o pH para: o primeiro varrimento (○) E_{p1a} (□) E_{p2a} e (Δ) E_{p2a} para o segundo varrimento. A linha pontilhada corresponde a uma inclinação de 59 mV por unidade de pH.

Levando em consideração que a largura a meia altura do pico de oxidação 2_a é de $W_{1/2} \sim 100$ mV, pode concluir-se que esta reação de oxidação da MT ocorre com a transferência de um eletrão e um protão. Para $\text{pH} > 10$, o potencial do pico 2_a manteve-se constante. Assim sendo, o mecanismo não depende do pH, envolvendo apenas a transferência de um eletrão. O produto da oxidação da MT pode sofrer desprotonação química em eletrólitos alcalinos [219] e pela intersecção da reta com inclinação de 59 mV por unidade de pH com a reta horizontal, **Fig. 3.4C**, determinou-se para a MT o valor de $\text{pK}_a \sim 10$.

Durante estas experiências, para cada uma das soluções preparadas nos diferentes eletrólitos de suporte, foram registados voltamogramas sucessivos sem limpar a superfície do GCE. Para eletrólitos com pH 3,4, 7,0 e 9,2 foi observado no segundo varrimento, o aparecimento de um novo pico, pico 3_a , correspondente a produtos de oxidação da MT formados à superfície do GCE durante o primeiro varrimento de potencial. O comportamento eletroquímico deste produto foi estudado em função do pH do eletrólito de suporte, **Fig. 3.4B**.

Aumentando o pH foi observada uma diminuição do potencial do pico de oxidação; e o declive da reta, 59 mV por unidade de pH, evidenciou que o mecanismo deste processo de oxidação, pico 3_a , em meios aquosos, também envolve o mesmo número de eletrões e protões. Também foi verificado que o pH influencia a intensidade de corrente de ambos os picos de oxidação da MT, **Fig. 3.4A**. A intensidade de corrente dos picos 1_a e 2_a aumentou com o pH e atingiu um valor máximo em tampão fosfato 0,1 M com pH compreendido entre 6,0 e 7,0. Devido a este facto, estes eletrólitos de suporte foram escolhido para os estudos adicionais dos processos de eléctrodo.

Voltametria de onda quadrada

O voltamograma de SW obtido numa solução 30 μM MT preparada diretamente numa solução de eletrólito de suporte em $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0,1 M) mostrou o mesmo comportamento eletroquímico quando comparado com os resultados obtidos por CV e voltametria de DP. Na **Fig. 3.5** estão representadas as correntes total, I_t , directa, I_f , e inversa, I_b , do primeiro e segundo varrimento de potencial a $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

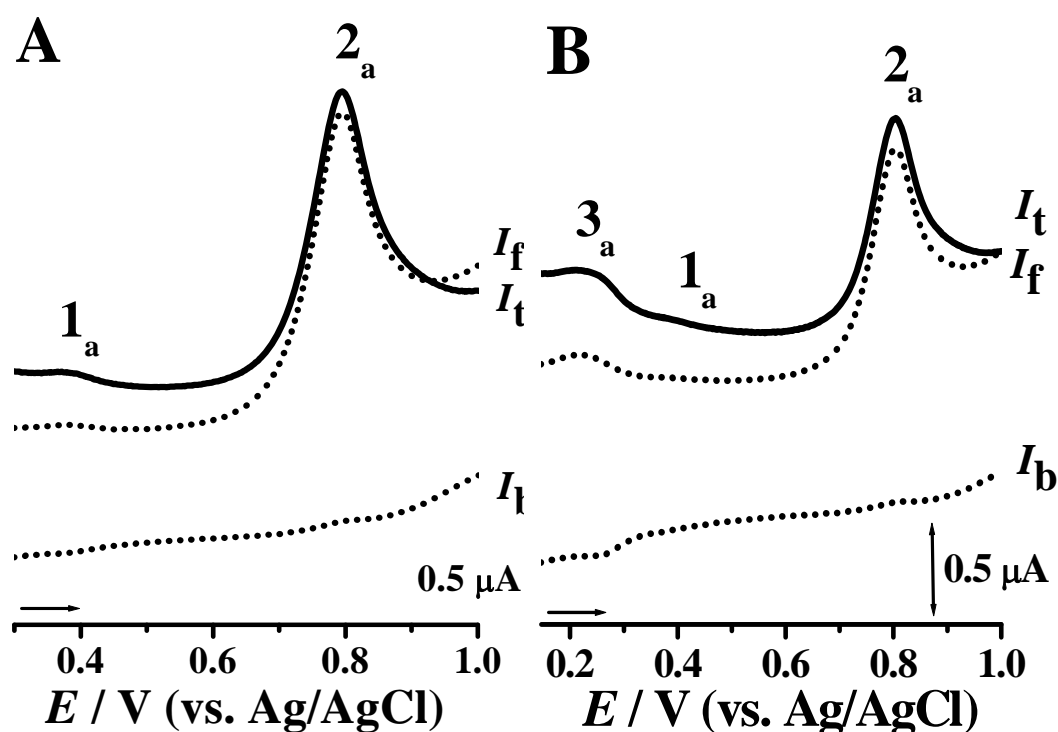


Figura 3.5 – Voltamogramas de SW obtidos numa solução 30 μM MT em $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0,1 M): (A) primeiro e (B) segundo varrimento; I_t – corrente total, I_f – corrente directa e I_b – corrente reversa, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Verificou-se a ocorrência dos três picos de oxidação, pico 1_a , pico 2_a e pico 3_a . Por conseguinte, a reversibilidade dos picos 1_a e 3_a e a irreversibilidade do pico 2_a foram confirmados pelas curvas de corrente directa (I_f) e inversa (I_b), **Fig. 3.5**.

1.2 Mecanismo de oxidação

Com base nos resultados obtidos pelas técnicas eletroquímicas foi proposto o mecanismo de oxidação da MT em pH = 7 (tampão fosfato 0.1 M), Fig. 3.6, que está de acordo com os dados de MT obtidos utilizando outras metodologias [14, 20, 220, 221].

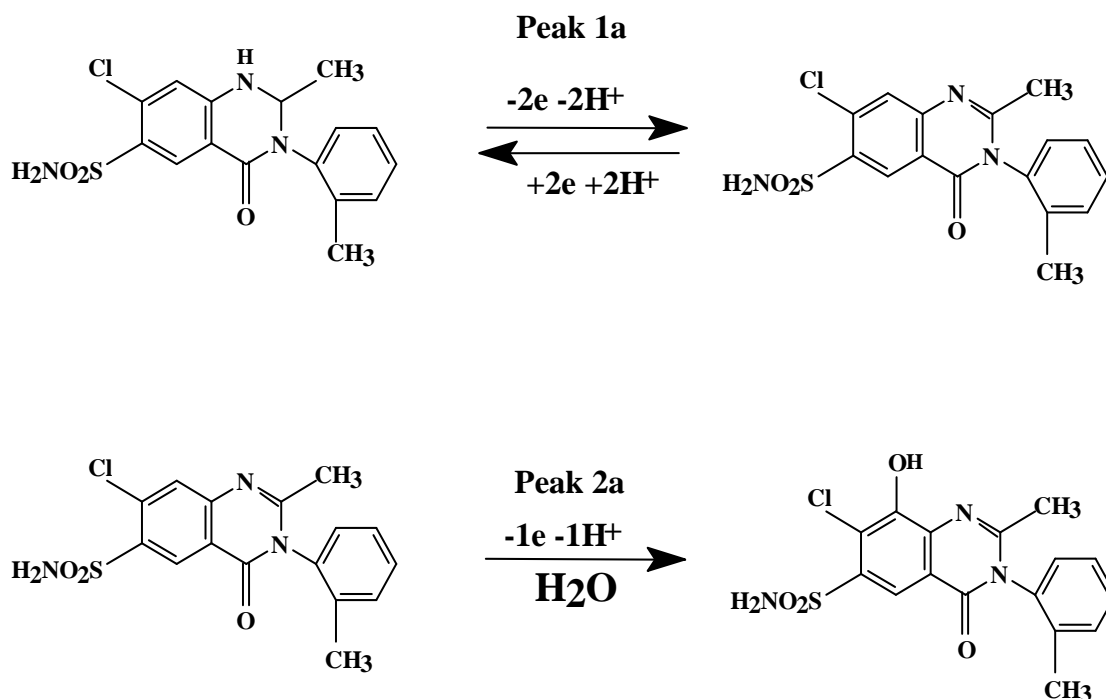


Fig. 3.6 – Mecanismo de oxidação proposto para a MT .

O primeiro passo, pico 1_a, é atribuído à oxidação do azoto no grupo da sulfonamida e envolve a transferência de dois elétrões e dois protões.

A segunda etapa ocorre também no grupo da sulfonamida, pico 2_a um eletrão é removido do anel na sequência ocorre a desprotonação para formar o radical catiónico, que reage com a água e origina um produto final hidroxilado.

2. ÁCIDO ÚSNICO

O UA, **Fig. 3.1**, é um líquen que apresenta uma grande variedade de propriedades farmacológicas tais como, inibição do efeito de vírus; capacidade analgésica e antipirética; atividade anti-inflamatória e atividade antifúngica contra alguns patogênicos de plantas. No entanto a função biológica mais interessante do UA é a sua atividade antibiótica. Uma vez que a atividade do UA é dependente da sua estrutura (por exemplo, espécies tautoméricas), uma elucidação completa das suas estruturas conformacionais, bem como do seu comportamento redox é de extrema importância para a compreensão dos seus mecanismos de ação a nível molecular.

O UA é praticamente insolúvel em água, por isso teve de ser usada uma metodologia diferente, a voltametria de estado sólido usando o UA mecanicamente imobilizado na superfície do GCE permitiu a investigação das propriedades redox do UA em meio aquoso.

A eletroquímica do estado sólido é importante na análise direta de compostos sólidos sem pré-tratamento adicional ou procedimentos de deposição demorados [43] e tem sido utilizada no estudo eletroquímico de uma variedade de compostos sólidos insolúveis [40-42].

O comportamento eletroquímico do UA no GCE mecanicamente imobilizado na superfície do GCE foi estudado em eletrólitos com diferentes pHs utilizando-se a CV, a voltametria de DP e de SW numa faixa de potencial de $-1,2$ V a $+1,2$ V. As soluções foram saturadas com N_2 de modo a evitar a difusão de O_2 no interior das mesmas. Verificou-se que o UA nas condições experimentais usadas apenas apresentou picos anódicos, procedendo-se ao estudo da oxidação do UA.

2.1 Mecanismo de oxidação

Voltametria cíclica

Os CVs obtidos com o UA mecanicamente imobilizado na superfície do GCE em diferentes eletrólitos de suporte não permitiram identificar todos os picos de oxidação do UA e mostraram apenas o pico anódico, pico 2_a , e nenhum pico na região catódica. A oxidação do UA é um processo irreversível, e varia de acordo com o pH da solução eletrolítica, **Fig. 3.7**.

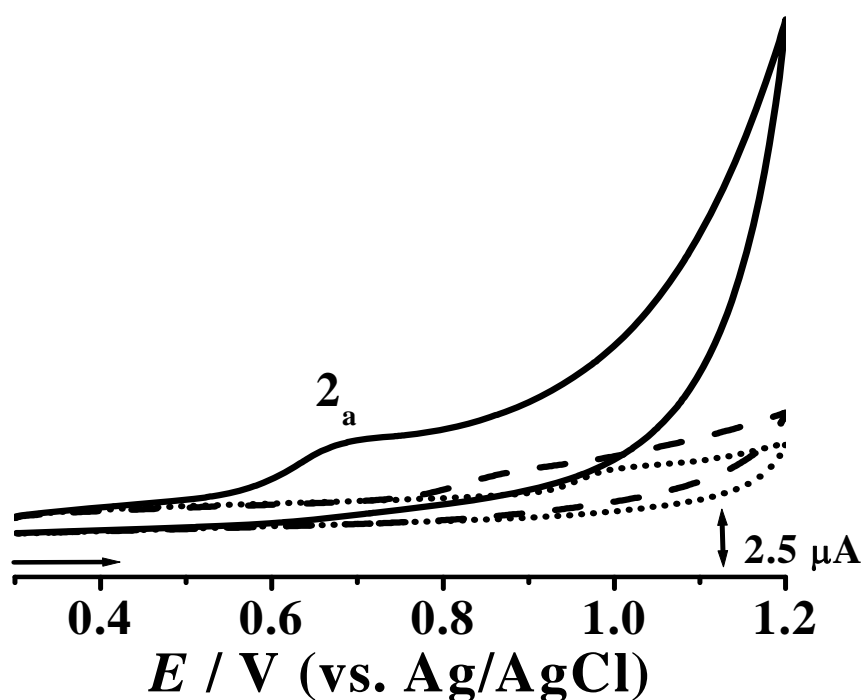


Figura 3.7 – CVs para diferentes valores de pH do UA mecanicamente imobilizado à superfície do GCE, $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$, (•••) pH = 3,4 (tampão acetato 0,1 M), (---) pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M) e (—) pH = 10,5 (tampão amónia 0,1 M).

O pico anódico 2_a ocorreu numa solução de eletrólito de suporte em pH = 3,4 (tampão acetato 0,1 M) depois do UA se imobilizado na superfície do GCE, apresentando o potencial de oxidação $E_{p2a} = + 1,04 \text{ V}$, sendo deslocado para valores

mais negativos com o aumento do pH. Quando comparado este valor de potencial com o potencial medido em meio alcalino, pH = 10,5 (tampão amónia 0,1 M), verifica-se que o valor do potencial obtido é menos positivo que em pH = 3,4 a $E_{p2a} = + 0,68$ V.

O processo de oxidação correspondente ao pico 2_a do UA deve-se aos grupos hidroxilo ligados aos anéis aromáticos.

Voltametria de impulso diferencial

Para o estudo e caracterização mais detalhada da oxidação eletroquímica do UA utilizou-se a voltametria de DP. O estudo contemplou uma vasta gama de pH – de 2,0 a 12,0, **Fig. 3.8** e **Fig. 3.9**.

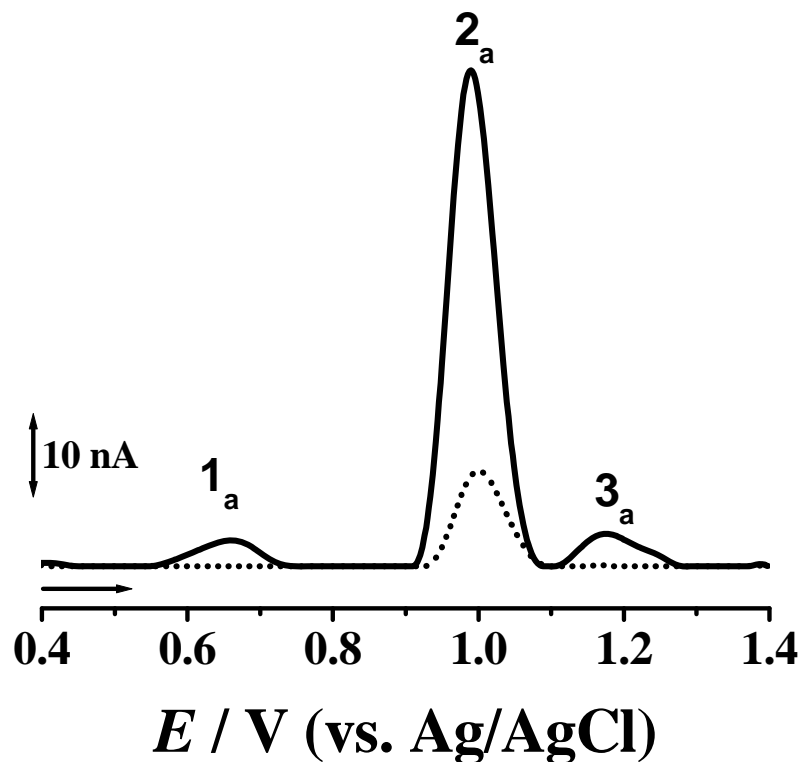


Figura 3.8 - Voltamogramas de DP com linha de base corrigida obtidos em pH = 3,4 (tampão acetato 0,1 M) para a oxidação do UA mecanicamente imobilizado à superfície do GCE, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$: (—) primeiro e (•••) segundo varrimento.

O voltamograma de DP obtido numa solução tampão de pH = 3,4 (tampão de acetato 0,1 M) apresentou dois novos picos de oxidação, quando comparado com a CV, pico 1_a, a $E_{p1a} = + 0.66$ V e pico 3_a a $E_{p3a} = + 1.18$ V, **Fig. 3.8**.

Enquanto que o pico 2_a foi detetado para todos os valores de pH estudados, o pico 1_a não aparece para valores de pH elevados, e, pico 3_a não ocorre em meios ácidos fortes, isto é, em meios com um pH inferior a 3. Com o número de varrimentos sucessivos, em meio ácido, pH = 3,4 (tampão de acetato 0,1 M), verificou-se que a intensidade da corrente do pico 2_a diminuiu drasticamente logo no segundo varrimento, enquanto picos 1_a e 3_a desaparecem completamente, **Fig. 3.8**.

Um comportamento semelhante foi observado em meios alcalinos. No entanto, numa solução de pH = 7 a diminuição da corrente do pico 2_a não foi tão rápida. A diminuição drástica da corrente do pico 2_a deve-se à forte adsorção dos produtos de oxidação não eletroativos do UA, que bloqueiam a superfície do eletrodo.

O grupo hidroxilo do UA, **Fig 3.1B**, cede eletrões e os radicais fenoxil formados originam produtos poliméricos, que adsorvem na superfície do eletrodo [222, 223].

Comparando os potenciais de oxidação para diferentes pHs conseguem obter-se informações sobre o mecanismo de oxidação do UA.

Para soluções tampão $2,0 < \text{pH} < 9,2$, o potencial do pico 2_a é deslocado para valores mais negativos com o aumento do pH, **Fig. 3.9A**. O declive da curva E_{p2a} vs pH, **Fig. 3.9B**, 59 mV por unidade de pH, mostra que o mecanismo de oxidação deste processo envolve o mesmo número de eletrões e protões. A intensidade de corrente do pico 2_a diminui até pH = 6,0, **Fig. 3.9B**, aumentando a partir deste valor de pH; o máximo de corrente foi observado para um pH = 10, mas de seguida a corrente do pico diminui novamente.

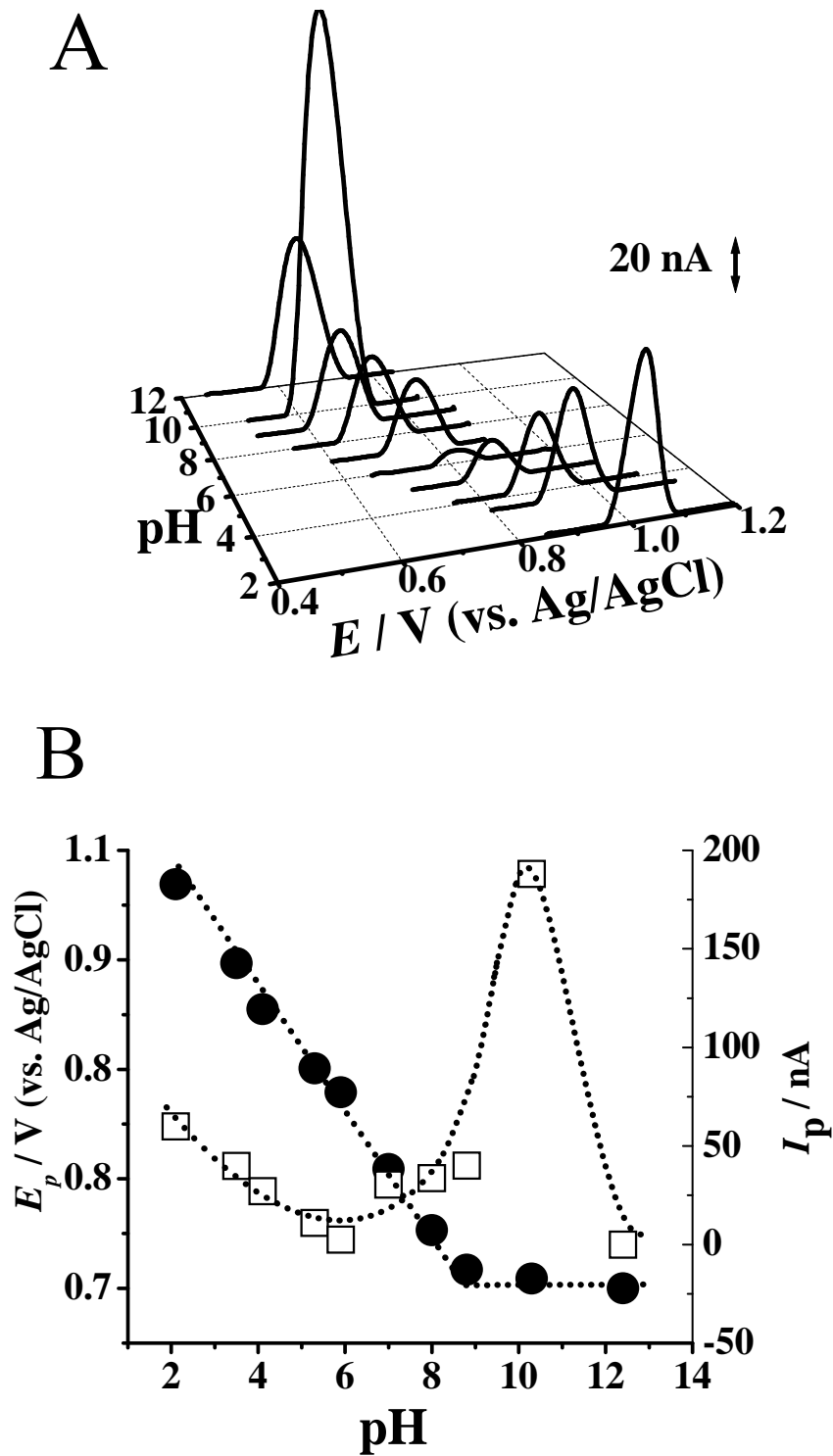


Figura 3.9 (A) Gráfico 3D dos voltamogramas de DP de linha de base corrigida obtidos para o UA mecanicamente imobilizado à superfície do GCE em diferentes valores de pH; (B) Gráfico da variação de: E_p (●) e I_p (□) com o pH para o pico 2_a.

O número de elétrons envolvidos, n , foi determinado utilizando a largura da meia altura, $W_{1/2} \sim 87$ mV, e quando comparado com o valor teórico, 90 mV, verificou-se que a reação eletroquímica envolve transferência de um elétron [210]. Conseqüentemente, pode concluir-se que o processo de oxidação para $\text{pH} < 9$ ocorre com transferência de um elétron e um próton. Para $\text{pH} > 8.8$, o processo de oxidação é independente do pH. O valor encontrado para $\text{pK}_a \sim 8.8$, está de acordo com a literatura [26].

Foi observada uma dependência linear do potencial do pico 1_a para valores de pH compreendidos entre 3,4 e 6,0. Para o pico 3_a , esta dependência do potencial foi linear no intervalo de $3.4 < \text{pH} < 12,0$. O declive da recta, 59 mV por unidade de pH, para ambos os picos, pico 1_a e 3_a , mostrou que o mecanismo de oxidação envolve o mesmo número de elétrons e de prótons. A largura a meia altura do pico, $W_{1/2}$, foi determinada uma vez que estes picos de oxidação apresentavam baixas intensidades de corrente.

Voltametria de onda quadrada

Os voltamogramas de SW obtidos no mesmo intervalo de pH mostraram resultados semelhantes aos voltamogramas obtidos por CV, ou seja, os picos de oxidação 1_a e 2_a e um grande aumento da adsorção no segundo varrimento de potencial.

A voltametria de SW permite uma maior velocidade na análise, um menor consumo de espécies eletroativas do que com a voltametria de DP e também reduziu problemas do bloqueio da superfície do eletrodo [210]. Na **Fig. 3.10** estão representadas as correntes total, direta e inversa do primeiro varrimento de potencial para o UA numa

solução de eletrólito de suporte pH = 3,4 (solução tampão acetato 0,1M), confirmando a irreversibilidade do pico de oxidação 2_a.

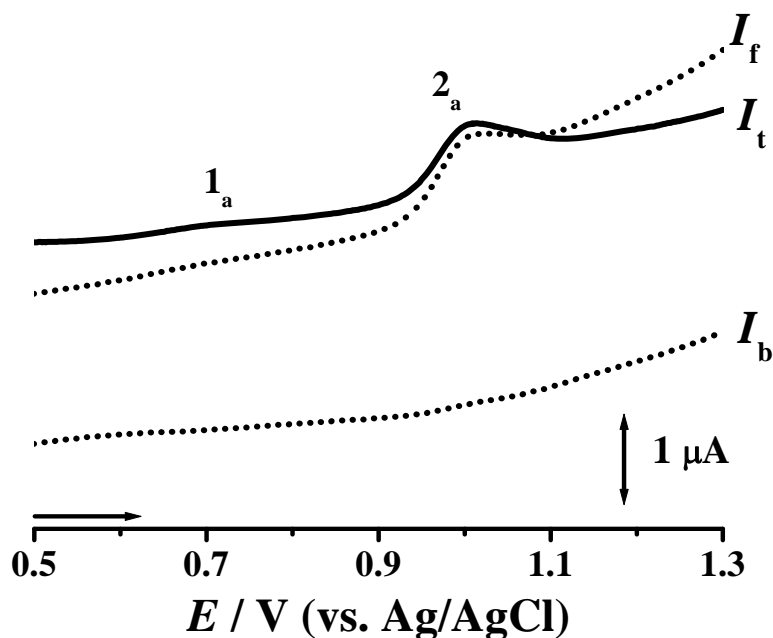


Figura 3.10 Voltamograma de SW obtidos em pH = 3,4 (tampão acetato 0,1 M) do UA mecanicamente imobilizado à superfície do GCE, I_t – corrente total, I_f – corrente direta, I_b – corrente reversa, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Com base nos resultados descritos foi proposto um mecanismo de oxidação para o UA, **Fig. 3.11** para o pico 2_a.

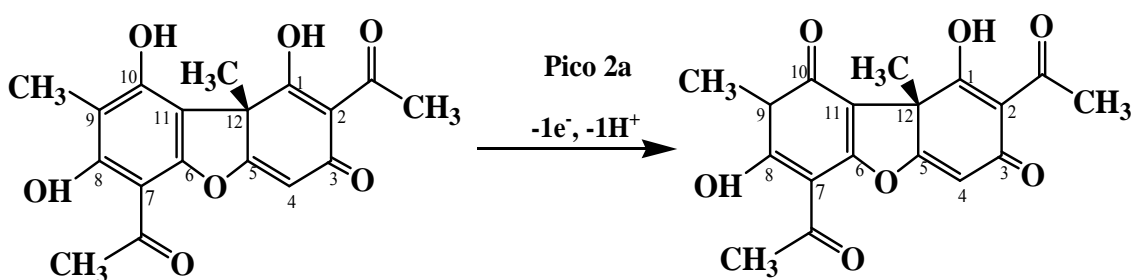


Figura 3.11. Mecanismo proposto para a oxidação do UA.

O pico de oxidação 2_a está relacionado com a oxidação no grupo hidroxilo na posição 10. Os picos de oxidação 1_a e 3_a correspondem à oxidação dos grupos hidroxilo nas posições 1 e 8. A oxidação do UA é um processo irreversível e dependente do pH.

2.2 Determinação analítica do AU

A oxidação do UA e dos seus produtos adsorvidos na superfície do eléctrodo são processos de eléctrodo quantificáveis e podem ser determinadas numa maneira simples e pouco laboriosa. A voltametria SW foi utilizada uma vez que é uma das técnicas de impulso mais rápida e sensível. Os limites de detecção obtidos com sua utilização podem ser comparados aos das técnicas cromatográficas e espectroscópicas.

Os voltamogramas SW obtidos foram efectuado em pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M), em concentrações compreendidas num intervalo $1,00 \times 10^{-6}$ M a $6,00 \times 10^{-6}$ M. Foi escolhido este eletrólito de suporte por se observar uma menor adsorção dos produtos de oxidação do UA na superfície do GCE. Devido à adsorção dos produtos da oxidação da UA e de modo a assegurar a linearidade da curva de calibração e a reprodutibilidade do procedimento, a superfície do GCE foi sempre limpa entre cada medida. Para cada concentração foram realizadas três medidas. A relação entre a intensidade de corrente do pico 2_a e a concentração foi descrita pela equação:

$$I_p \text{ (A)} = - 8.12 \times 10^{-7} + 2.92 \times 10^{-7} [\text{UA}] \text{ (M)}$$

em que $r = 0,996$, $n = 3$.

Os métodos analíticos permitam a quantificação do UA em fluidos biológicos, tais como a determinação eletroanalítica num GCE, é importante uma vez que a técnica permitirá obter informações úteis para ensaios clínicos, de um modo rápido e simples, sem recorrer a solventes orgânicos.

3. OMEPRAZOL

O omeprazol, **Fig. 3.1**, é um derivado do benzimidazol muito usado para o tratamento de úlceras gástricas.

Embora técnicas voltamétricas já tenham sido utilizadas para a determinação do OMZ, não foi realizada uma investigação sistemática do mecanismo redox deste fármaco.

Informações sobre o comportamento eletroquímico do OMZ, a partir dos resultados em diferentes pHs, desempenham um papel fundamental para a compreensão das suas propriedades e do seu metabolismo num sistema biológico.

3.1 Mecanismo redox

O comportamento eletroquímico do OMZ foi estudado por CV com uma velocidade de varrimento de 100 mVs^{-1} em soluções de eletrólitos com diferente pHs, saturadas com N_2 , usando um GCE.

Numa solução de $60 \mu\text{M}$ OMZ saturada com N_2 , o varrimento do potencial teve início a $0,00 \text{ V}$, evoluiu no sentido negativo atingindo o limite a $-1,3 \text{ V}$, onde foi invertido o sentido do varrimento, uma vez atingido o limite positivo de $+1,3 \text{ V}$, o sentido do varrimento foi novamente invertido até alcançar o potencial inicial e assim sucessivamente, **Fig. 3.12**.

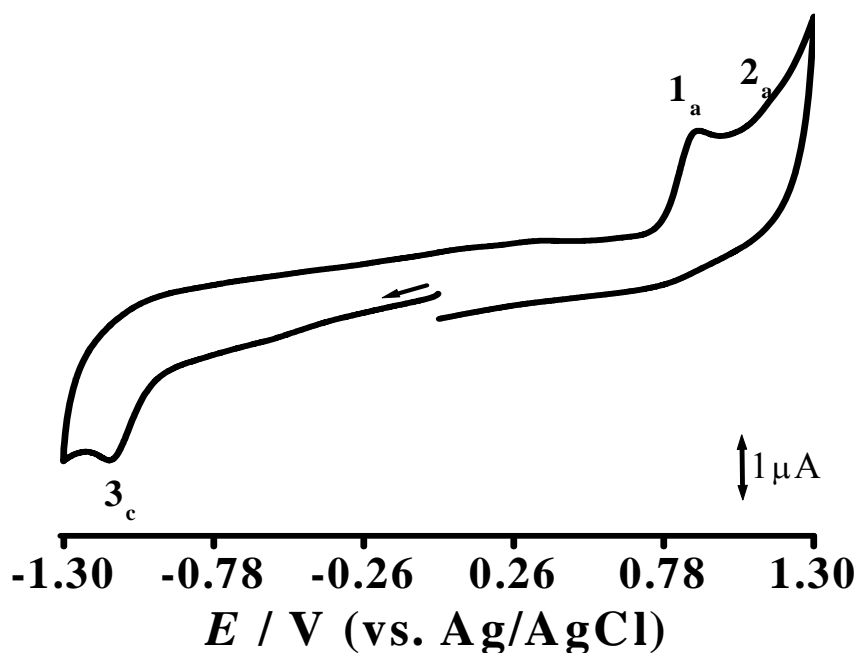


Figura 3.12 CV obtido numa solução 60 μM OMZ em $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0,1 M), N_2 saturado, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Os CVs mostraram que o OMZ sofre oxidação e redução. Os processos ocorrem de forma independente e foram investigados separadamente.

3.1.1 Oxidação

Voltametria cíclica

Inicialmente registaram-se CVs sucessivos numa solução 60 μM OMZ preparada em $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0,1 M). O primeiro varrimento mostrou a ocorrência de dois picos anódicos, pico 1_a, a $E_{p1a} = + 0,88 \text{ V}$, e pico 2_a, a $E_{p2a} = + 1,13 \text{ V}$. Após inversão do sentido do varrimento não se observou nenhum pico catódico, **Fig. 3.12**, de onde se conclui que a oxidação do OMZ à superfície do GCE é uma reação irreversível. Além disso em CVs sucessivos não se verificou a existência de

novos picos, o que evidenciou que a oxidação do OMZ não envolve a formação de quaisquer produtos eletroativos. Contudo, observou-se a diminuição da corrente dos dois picos. Esta última observação é consequência da absorção dos produtos de oxidação não eletroativos do OMZ à superfície do CGE.

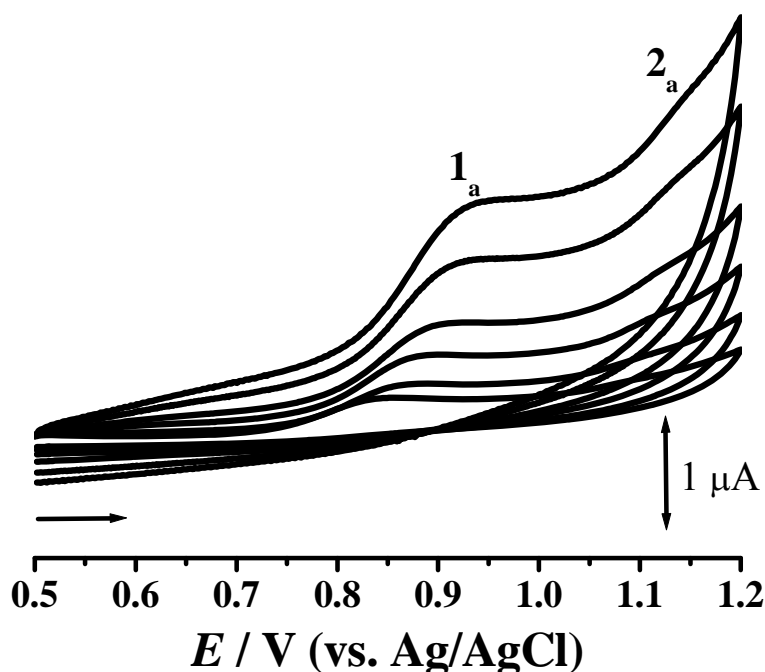


Figura 3.13 - CVs obtidos numa solução 60 μM OMZ em $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0,1 M) para diferentes velocidades de varrimentos, 10, 25, 50, 100, 200 e 300 mV s^{-1} .

A influência da velocidade de varrimento sobre a corrente do pico 1_a do OMZ foi investigada em soluções de OMZ preparadas diretamente em $\text{pH} = 7$ (tampão fosfato 0,1 M). Os CVs foram registados para diferentes velocidades de varrimento entre 10 e 300 mV s^{-1} , **Fig. 3.13**. Entre cada medida voltamétrica a superfície do eléctrodo foi sempre limpa. Verificou-se com o aumento da velocidade de varrimento uma variação do potencial do pico 1_a para valores mais positivos, confirmando assim mais uma vez a irreversibilidade deste processo.

Também foi observada uma dependência linear de I_{pa} com v ($R= 0,995$). Este tipo de comportamento é específico das substâncias que adsorvem na superfície do eletrodo. Como a quantidade da espécie adsorvida é constante, durante uma medida voltamétrica, a quantidade de material que difunde para a superfície do eletrodo varia com o tempo. Em consequência do aumento da velocidade de varrimento ocorre a diminuição dos compostos que difundem da solução e que podem ser oxidados.

Voltametria de impulso diferencial

A oxidação eletroquímica do OMZ foi estudada usando a voltametria de DP em diferentes eletrólitos de suporte numa faixa de pH entre 2 e 12. Preparou-se uma solução 3 μ M OMZ para cada valor de pH do eletrólito de suporte, apresentando mudanças significativas com as variações de pH, **Fig. 3.14**. O pico de oxidação I_a , aparece para todos os valores de pH. No primeiro voltamograma registou-se, para todos os eletrólitos de suporte com $2,0 < \text{pH} < 9,0$, que o potencial do pico I_a se desloca progressivamente para valores mais negativos com o aumento de pH, **Fig. 3.14A**.

Verificou-se que a relação entre o pH e o deslocamento de potencial seguia a equação $E_{pI_a} \text{ (V)} = 1,147 - 0,059 \text{ pH}$, **Fig. 3.14B**. O declive da reta de 59 mV por unidade de pH, no gráfico de E_{pI_a} vs pH, mostra que o número de elétrons é igual ao número de prótons. Tendo em conta o valor da largura a meia altura do pico I_a , $W_{1/2} \sim 83 \text{ mV}$, verifica-se que a reação de oxidação que origina o pico I_a envolve a transferência de um elétron [210] e um próton em soluções de eletrólito de suporte até $\text{pH} \sim 9$.

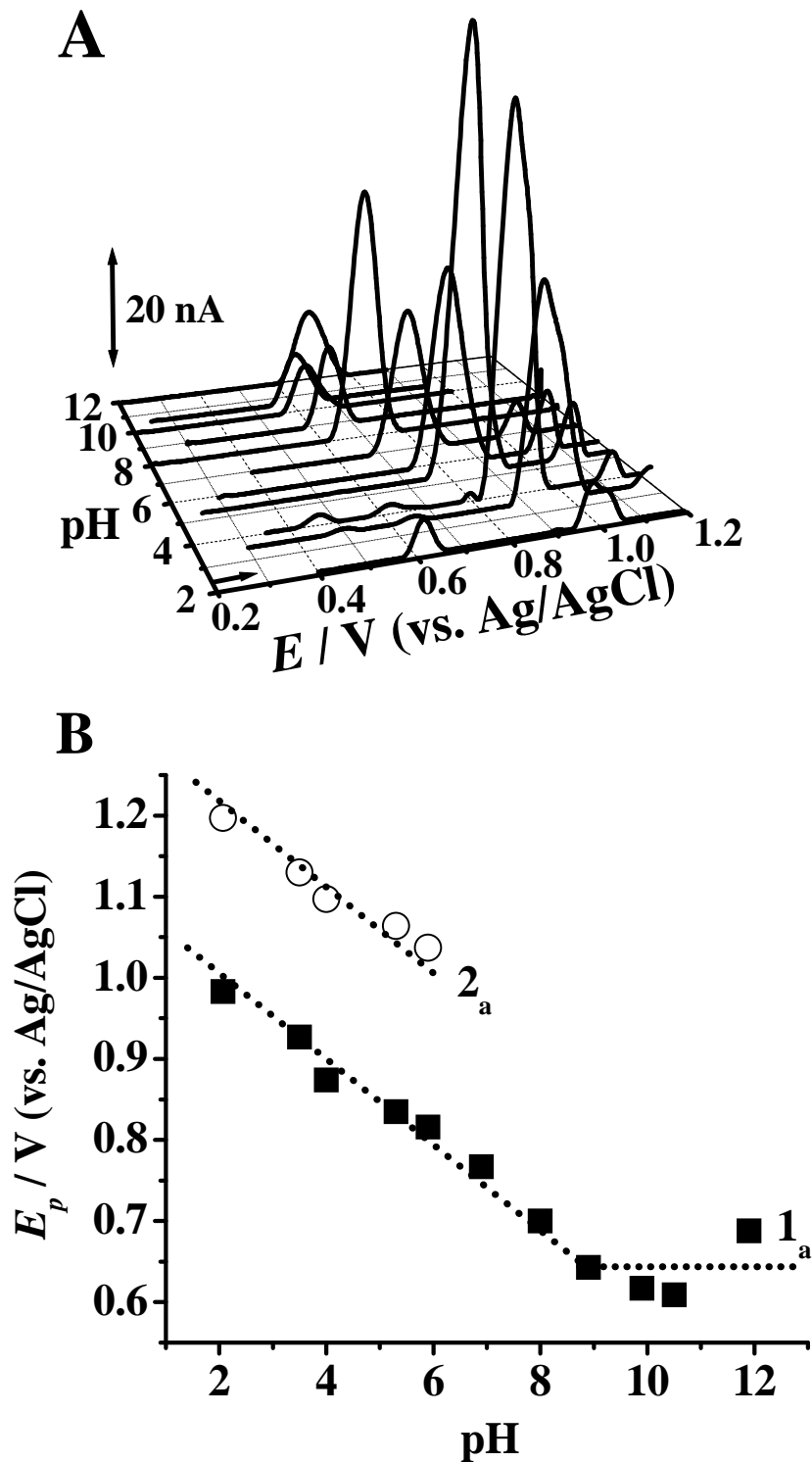


Figura 3.14 – (A) Gráfico 3D dos voltamogramas de DP de linha de base corrigida obtidos em soluções 3 μM OMZ em electrólitos de diferente pH. (B) Gráfico da variação do (■) E_{p1a} e do (○) E_{p2a} com o pH. A linha pontilhada corresponde a uma inclinação de 59 mV por unidade de pH.

Para $\text{pH} > 9$, a oxidação do pico 1_a do OMZ não depende do pH e o mecanismo apenas envolve a transferência de um elétron. Tendo em conta os resultados descritos, determinou-se o $\text{pK}_a \sim 9$, que está de acordo com a literatura [60].

Para eletrólitos de suporte com pH superior a 3 e inferior a 7, foi observado um segundo pico de oxidação, pico 2_a . Verificou-se que o potencial do pico 2_a se deslocou para valores menos positivos com o aumento do pH .

O declive da equação $E_{p2a} \text{ (V)} = 1,35 - 0,059 \text{ pH}$ mostrou a dependência linear do potencial com o pH , **Fig. 3.14B**. Portanto, pode concluir-se que neste processo estão envolvidos o mesmo número de prótons e elétrons.

Tendo em conta que o valor da largura a meia altura encontrado para o pico 2_a da oxidação do OMZ foi $W_{1/2} = 45 \text{ mV}$, esta etapa de oxidação envolve a transferência de dois elétrons e dois prótons.

Voltametria de onda quadrada

O voltamograma de SW obtido numa solução $3 \mu\text{M}$ OMZ preparada diretamente numa solução de eletrólito de suporte em $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato $0,1 \text{ M}$) mostrou o mesmo comportamento eletroquímico quando comparado com os resultados obtidos por CV e voltametria de DP.

Na **Fig. 3.15** estão representadas as correntes total, direta e inversa do primeiro varrimento de potencial a $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

A oxidação do OMZ é dependente do pH e ocorre em duas etapas irreversíveis, levando à formação de produtos não eletroativos que adsorvem na superfície do eletrodo. A primeira etapa de oxidação envolve a remoção de um elétron e de um próton para produzir um produto hidroxilado. O segundo processo de oxidação é atribuído à oxidação do grupo amino do grupo de benzimidazol e envolve a transferência de dois elétrons e dois prótons, **Fig. 3.16**.

3.1.2 Redução

Voltametria cíclica

CVs foram registados sucessivamente apenas na região catódica no intervalo de potencial de 0,0 V a - 1,35 V numa solução de 60 μM de OMZ em pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M), $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, tendo-se observado apenas um pico de redução, pico 3_c, a $E_{p3c} = - 1,04 \text{ V}$, **Fig. 3.17**. Com o objectivo de evitar a difusão do O₂ do ambiente para a solução do OMZ, ao longo de todas as experiências voltamétricas, foi mantido na superfície da solução um fluxo constante de N₂.

Invertendo o sentido do varrimento, não foi encontrado qualquer pico catódico ou anódico. Mostrando portanto que o OMZ sofre uma redução irreversível, sem formação de qualquer produto eletroativo. A diminuição da intensidade de corrente de redução com o número de varrimentos de potencial é atribuída à adsorção dos produtos não eletroativos do OMZ na superfície do GCE.

Foram obtidos voltamogramas cíclicos para diferentes velocidades de varrimento entre 10 mV s^{-1} e 300 mV s^{-1} numa solução 60 μM OMZ, em pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M), sempre com uma superfície do GCE limpa.

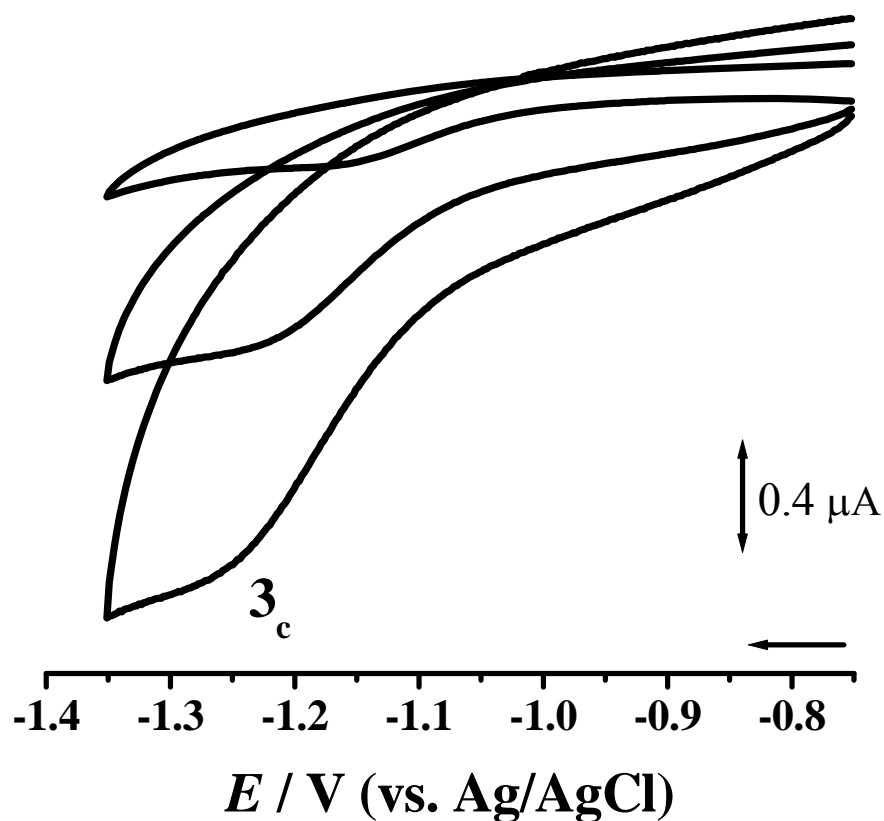


Figura 3.17 – CVs obtidos numa solução 60 μM OMZ em pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M) para diferentes velocidades de varrimentos, 10, 100 e 300 $mV s^{-1}$.

Foi observado que com o aumento da velocidade de varrimento o pico de redução 3_c foi deslocado para potenciais negativos, e ocorreu o aumento da corrente capacitiva, **Fig. 3.17**.

Voltametria de impulso diferencial

A influência do pH na redução do OMZ foi estudada em soluções 6 μM OMZ, preparadas em diferentes eletrólitos de suporte, saturadas com N_2 , numa ampla faixa de pH, $2,0 < pH < 12,0$, **Fig. 3.18**.

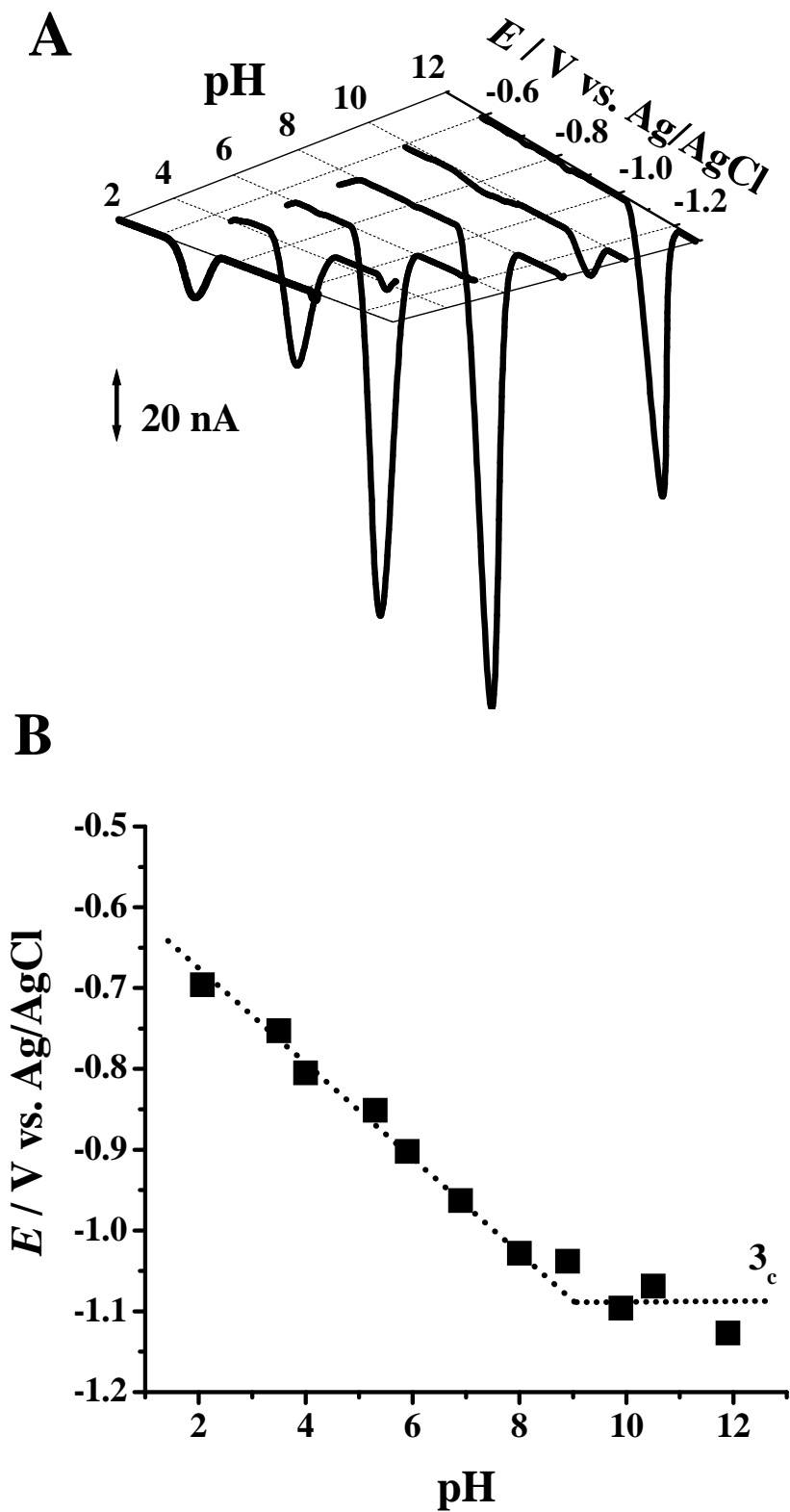


Figura 3.18 – (A) Gráfico 3D de voltamogramas de DP de linha de base corrigida obtidos em soluções 6 μM OMZ em electrólitos de diferentes pH; (B) Gráfico da variação do (■) E_{p3c} com o pH.

O pico 3_c aparece para todos os valores de pH e é deslocado linearmente para valores mais negativos à medida que o pH da solução aumenta até pH ≈ 9,2, **Fig. 3.18B**. Isso indica que protonação do centro eletroativo da molécula afeta o mecanismo de reação de elétron.

O declive de 59 mV por unidade de pH mostra que no mecanismo de redução do OMZ está envolvido o mesmo número de elétrons e prótons.

Sabendo que a largura a meia altura do pico 3_c foi $W_{1/2} \sim 72$ mV, verifica-se que a redução da OMZ ocorre com a transferência de um elétron.

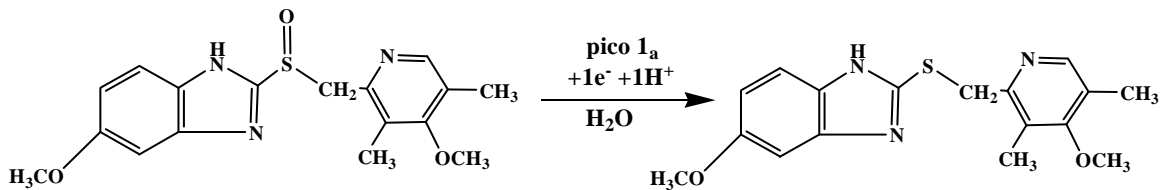


Fig. 3.19 – Mecanismo proposto para a redução do OMZ

Portanto, a redução ocorre no grupo sulfóxido [47] e com a transferência de um próton e um elétron, **Fig. 3.19**.

4.2 Espectrofotometria do OMZ

Para complementar os estudos voltamétricos, foram efetuadas medições espectrofotométricas. Assim, foram registados espectros de absorção UV-VIS em soluções 30 μ M OMZ em solução de eletrólito de suporte num intervalo de pH de 2,0 a 12,0. A **Fig. 3.20** mostra os espectros de absorção de soluções de OMZ no instante inicial, depois de 30 min de incubação e no final do quarto dia, para três pH diferentes.

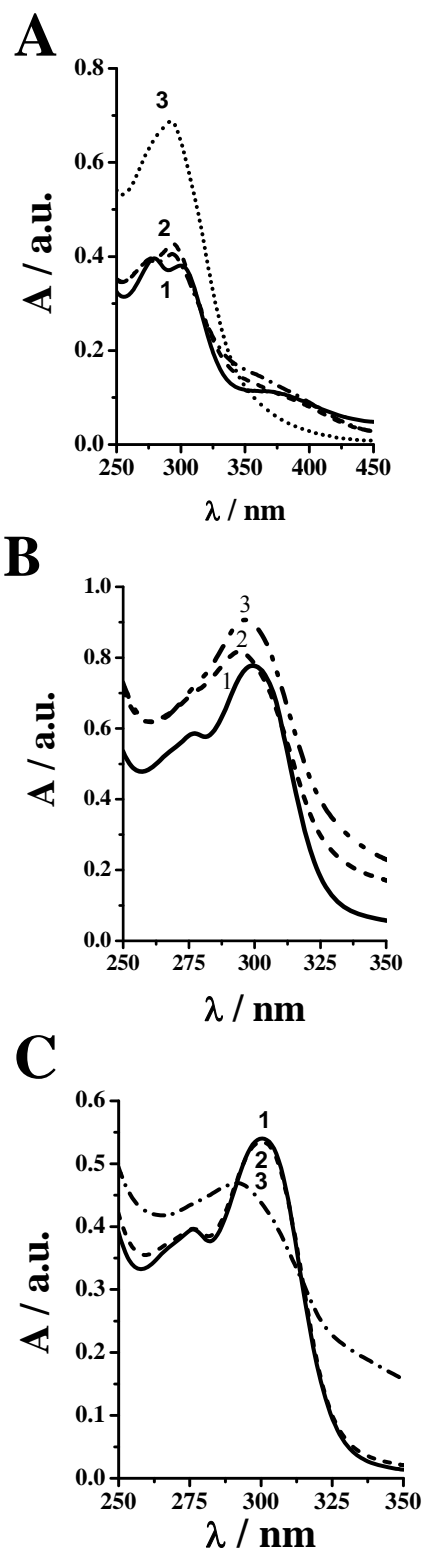


Figura 3.20 Espectro de absorção UV-Vis de uma solução 30 μM OMZ para soluções em: (A) pH = 2,0, (B) pH = 5,4, e (C) pH = 7,0, (—) instante inicial, e depois (---) 30 min e (•••) 4 dias.

Os resultados das experiências revelaram que as grandes mudanças no espectro de absorção ocorreram em meios ácidos fortes, isto porque para $2 < \text{pH} < 4$ a degradação da OMZ foi rápida.

As principais bandas de absorção características da molécula a 275 e 301 nm diminuíram e ocorreu o aparecimento de uma ampla banda de absorção 370 nm numa solução em $\text{pH} = 2$, **Fig. 3.20A** (curva 1).

O espectro mostrou que ao fim de 30 min, a banda a 370 nm desapareceu e ocorreu um novo pico a 293 nm (curva 2), que permaneceu durante os quatro dias seguintes (curva 3).

O OMZ é estável em soluções com pH elevado, no entanto, degrada-se em condições ácidas, produzindo o correspondente sulfonamida, sulfureto, dímeros e outros produtos, que se reduzem e foram estudados com o eletrodo de mercúrio gotejante (DME) [59, 61].

Por conseguinte, os produtos de degradação podem ser a sulfonamida do OMZ, que pode sofrer subsequente degradação, e em meio ácido pode originar um dímero [59] e o sulfureto do OMZ [61].

A degradação tornou-se mais lenta com o aumento do pH da solução e em $\text{pH} = 5,4$ apresentou algumas mudanças depois de 30 min, **Fig. 3.20B** (curva 2).

No entanto, ao mesmo tempo, as bandas de absorção da molécula permanecem inalteradas numa solução de $\text{pH} = 7$ (curva 2), a degradação para este valor de pH só se verifica 3 dias depois.

Para $\text{pH} > 7$, os espectros de absorção do OMZ não apresentaram alterações no intervalo de 4 dias. Estes resultados estão de acordo com a literatura [58, 59].

4. CONCLUSÃO

Devido à sua alta sensibilidade, os métodos voltamétricos foram utilizados com sucesso para a detecção e determinação de mecanismos de três compostos farmacêuticos, a MT, o UA e o OMZ, e do seu comportamento redox.

O diurético, MT, sofre oxidação no GCE, em duas etapas consecutivas num mecanismo controlado por adsorção. A oxidação da MT é dependente do pH e ocorre a formação de um radical catião, que reage com a água e produz um produto final hidroxilado.

O UA, conhecido principalmente pela sua atividade antibiótica, foi estudado por técnicas voltamétricas depois de mecanicamente imobilizado à superfície do GCE por se tratar de uma molécula muito pouco solúvel em água. Os resultados obtidos mostraram que se trata de um método viável e rápido para estudar o mecanismo redox do UA em meio aquoso. O UA não apresentou reação de redução nas condições utilizadas. A oxidação do UA é um processo irreversível, que ocorre em três etapas com dependência do pH.

O inibidor do suco gástrico, o OMZ, sofre oxidação e redução à superfície do GCE. A oxidação do OMZ é dependente do pH e ocorre em duas etapas irreversíveis, levando à formação de produtos não eletroativos que adsorvem na superfície do eletrodo. A redução envolve o grupo sulfóxido e é um processo irreversível com dependência do pH. As medidas espectrofotométricas mostraram que o OMZ é estável em soluções de pH elevado, no entanto, degrada-se em condições ácidas.

CAPÍTULO IV

ESTUDO ELETROQUÍMICO DO METOTREXATO E INTERAÇÃO COM O DNA

Neste capítulo é descrito o comportamento eletroquímico do metotrexato (MTX), assim como a interação deste fármaco com o DNA.

Os mecanismos de transferência de elétrons e as propriedades redox em vários meios foram estudados assim como a adsorção na superfície do GCE e o pK_a .

A interação do MTX, **Fig. 4.1**, com o DNA foi investigada por dois elétrodos diferentes: com elétrodo de carbono vítreo e voltametria de DP e o elétrodo sólido de grafite pirolítica altamente orientada (HOPG) com a microscopia de força atômica (AFM). Estudos extensivos usando a microscopia de força atômica (AFM) têm sido realizados para clarificar o comportamento da adsorção do DNA nas superfícies dos elétrodos de carbono [200, 203, 224, 225]. O elétrodo de grafite pirolítica altamente

orientada (HOPG) possui uma superfície atômica plana e por isso é o eletrodo de carbono utilizado nas experiências de AFM, permitindo visualizar diretamente as características dos filmes de DNA imobilizados.

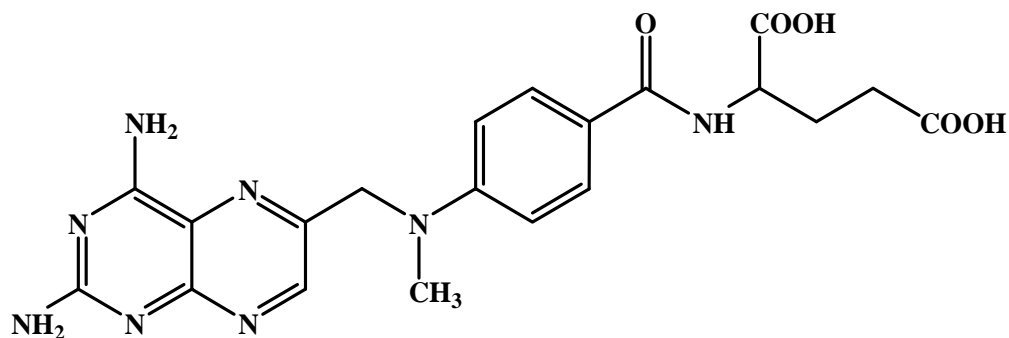


Figura 4.1 – Estrutura química do MTX.

A adsorção do dsDNA depende da estrutura da dupla hélice do dsDNA carregada negativamente. A imobilização do dsDNA por adsorção espontânea na superfície da HOPG envolve interações hidrofóbicas fracas. Embora as interações hidrofóbicas com a superfície hidrofóbica da HOPG representam o principal mecanismo de adsorção, outros efeitos, tais como eletrostáticos e interações de van der Waals, podem contribuir para o processo de adsorção [225].

1. ESTUDO ELETROQUÍMICO DO MTX

CVs foram efetuados numa solução 30 μM MTX preparada em solução de eletrólito de suporte em $\text{pH} = 3,4$ (tampão acetato 0,1 M), **Fig. 4.2**, com início a 0,00 V no sentido positivo ou no sentido negativo, num intervalo de potencial a variar entre $-0,6$ V e $+1,2$ V, com uma velocidade de varrimento $v = 100$ mV s^{-1} .

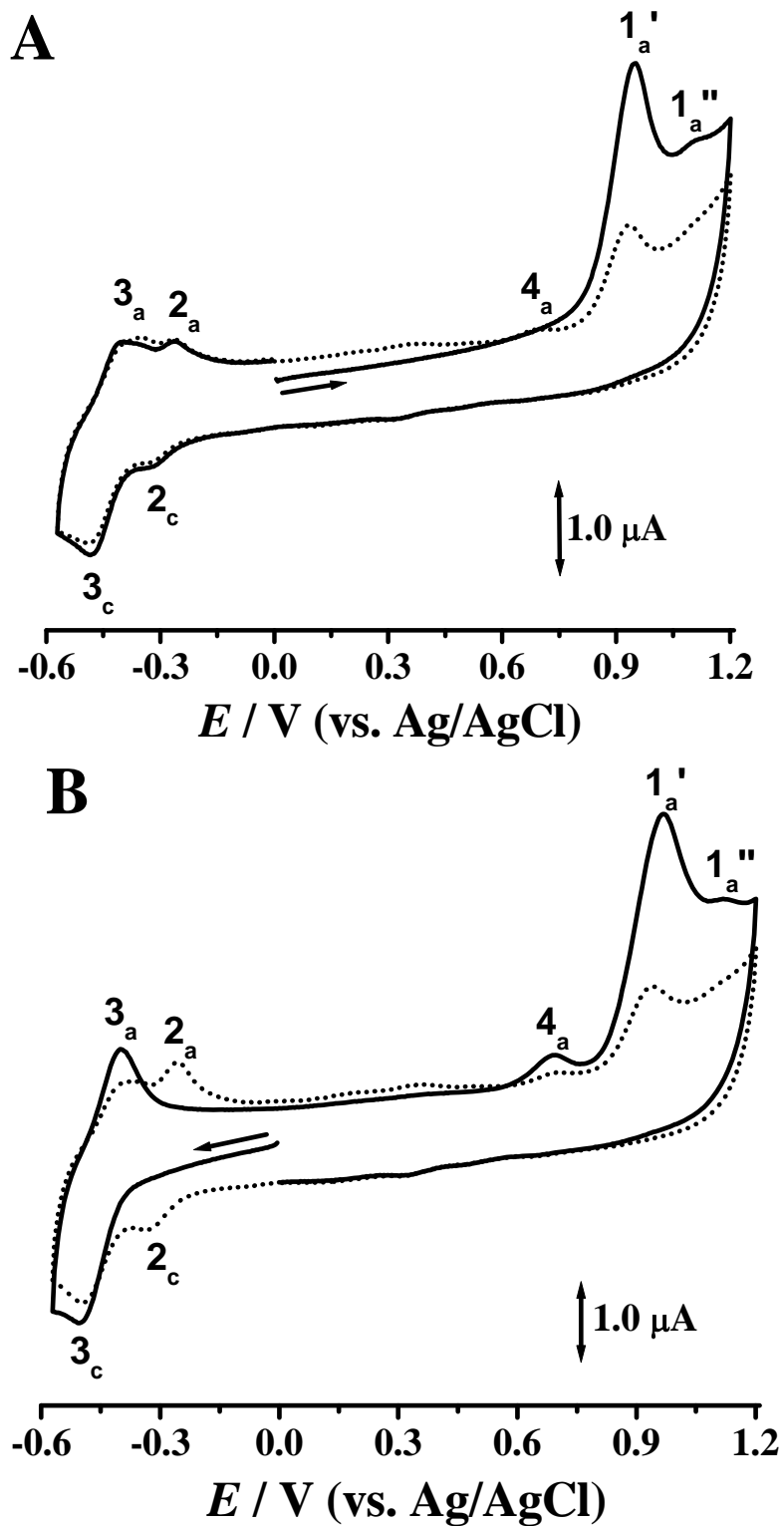


Figura 4.2 – CVs obtidos numa solução 30 μM MTX em $\text{pH} = 3.4$ (tampão acetato 0.1 M), saturada com N_2 numa faixa de potencial entre $-0,5$ V e $+1,2$ V, com início em $0,0$ V: (A) no sentido positivo (B) no sentido negativo: (—) primeiro e (•••) segundo varrimento com $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Todas as soluções foram saturadas com N_2 antes do início dos CVs e também no decorrer das experiências voltamétricas foi mantido um fluxo constante de N_2 à superfície da solução, de modo a evitar a difusão do oxigénio atmosférico para o interior da solução de MTX.

Os resultados mostraram que MTX sofre oxidação, pico 1_a , e redução, pico 3_c , num complexo processo redox. Também foi observado o aparecimento de um produto de oxidação do MTX, pico 2_a-2_c , e um produto de redução, pico 4_a .

A oxidação e redução ocorrem em dois processos independentes entre si e foram estudados separadamente.

1.1 Oxidação

Voltametria cíclica

A oxidação do MTX foi estudada por CV numa solução de MTX preparada diretamente em electrólito de suporte a $pH = 5,4$ (tampão acetato 0,1 M). Varrimentos sucessivos foram registados apenas no intervalo de potencial de $-0,5$ V a $+1,2$ V, **Fig. 4.3**, com uma velocidade de varrimento, $\nu = 100$ $mV s^{-1}$.

No primeiro CV, com o varrimento de $0,0$ V a $-0,5$ V, não foi observado nenhum pico catódico, mas depois de inverter a direção de varrimento a $-0,5$ V, foram observados dois picos anódicos, pico $1_a'$, a $E_{p1'a} = +0,77$ V e o pico $1_a''$, a $E_{p1''a} = +0,93$ V, **Fig. 4.3**.

No segundo varrimento de potencial, sem a limpeza da superfície GCE, ocorreu um novo pico de redução, pico 2_c , a $E_{p2c} = -0,43$ V. Após a inversão do sentido do varrimento, registou-se o aparecimento do pico anódico correspondente, pico 2_a , a

$E_{p2a} = -0,40$ V, confirmando assim a reversibilidade da reacção correspondente ao pico 2_c e foi observada uma diminuição significativa da intensidade de corrente dos picos $1_a'$ e $1_a''$ devido à adsorção do MTX e/ou dos respectivos produtos de oxidação na superfície do GCE.

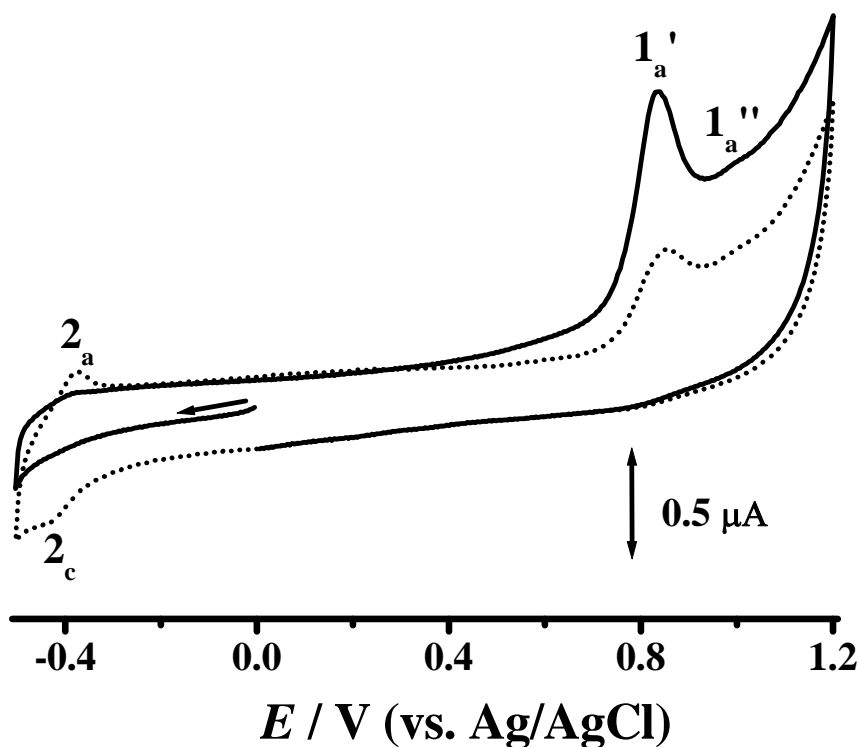


Figura 4.3 – CVs obtidos numa solução 30 μ M MTX em pH = 5.4 (tampão fosfato 0,1 M): (—) primeiro e (•••) segundo varrimento, $v = 100$ mV s⁻¹.

De modo a clarificar a formação de uma monocamada de MTX adsorvida à superfície do GCE, a concentração de MTX adsorvida foi calculada numa solução de eletrólito de suporte em pH = 5,4 (solução tampão acetato 0,1 M) a partir do CV, **Fig. 4.3**, utilizando a equação $\Gamma_{\text{MTX}} = Q (n F A)^{-1}$, onde a carga $Q = 8.09 \times 10^{-7}$ C, o número de eletrões transferidos $n = 2$ (ver na voltametria de DP), a constante de Faraday, $F = 96485$ C mol⁻¹ e a área do eléctrodo $A = 0.011$ cm². A concentração total do MTX na superfície do GCE foi $\Gamma_{\text{MTX}} = 7.62 \times 10^{-10}$ mol cm⁻².

Experiências feitas em eletrólitos de suporte com diferentes valores de pH confirmam a irreversibilidade dos picos $1_{a'}$ e $1_{a''}$ e a reversibilidade do pico 2_c , que foram deslocados para valores mais negativos com o aumento do pH.

Voltametria de impulso diferencial

A influência do pH na oxidação do MTX foi estudada em diferentes eletrólitos de suporte numa faixa de pH entre 2,0 e 12,0 usando a voltametria de DP, **Fig. 4.4**.

Duas reações consecutivas de transferência de carga foram observadas para $3,4 < \text{pH} < 10,5$, **Fig. 4.4A**. No primeiro voltamograma de DP a $\text{pH} = 6,0$ (tampão fosfato 0,1 M) ocorre o pico $1_{a'}$, a $E_{p1'a} = +0,75 \text{ V}$, e do pico $1_{a''}$, a $E_{p1''a} = +0,90 \text{ V}$, **Fig. 4.4B**.

A ocorrência destes dois picos de oxidação é explicada considerando que as moléculas de MTX adsorvem na superfície do eletrodo numa posição planar ou perpendicular, todavia, o centro eletroativo do MTX é o mesmo. Na posição planar, a transferência de elétrons é facilitada uma vez que o anel aromático fica paralelo à superfície do eletrodo, sendo menor o potencial de oxidação no pico $1_{a'}$. Na orientação perpendicular à superfície do eletrodo, o processo de oxidação é mais difícil e o potencial do pico $1_{a''}$ é mais elevado. Após o primeiro varrimento de potencial, as moléculas de MTX são rearranjadas na superfície do eletrodo.

Nos varrimentos sucessivos, obtidos nas mesmas condições, sem a limpeza da superfície do eletrodo, apenas apareceu um pico de oxidação, pico 1_a , **Fig. 4.4B**. semelhante para diferentes concentrações de 5 a 100 μM , usando sempre uma superfície limpa do GCE.

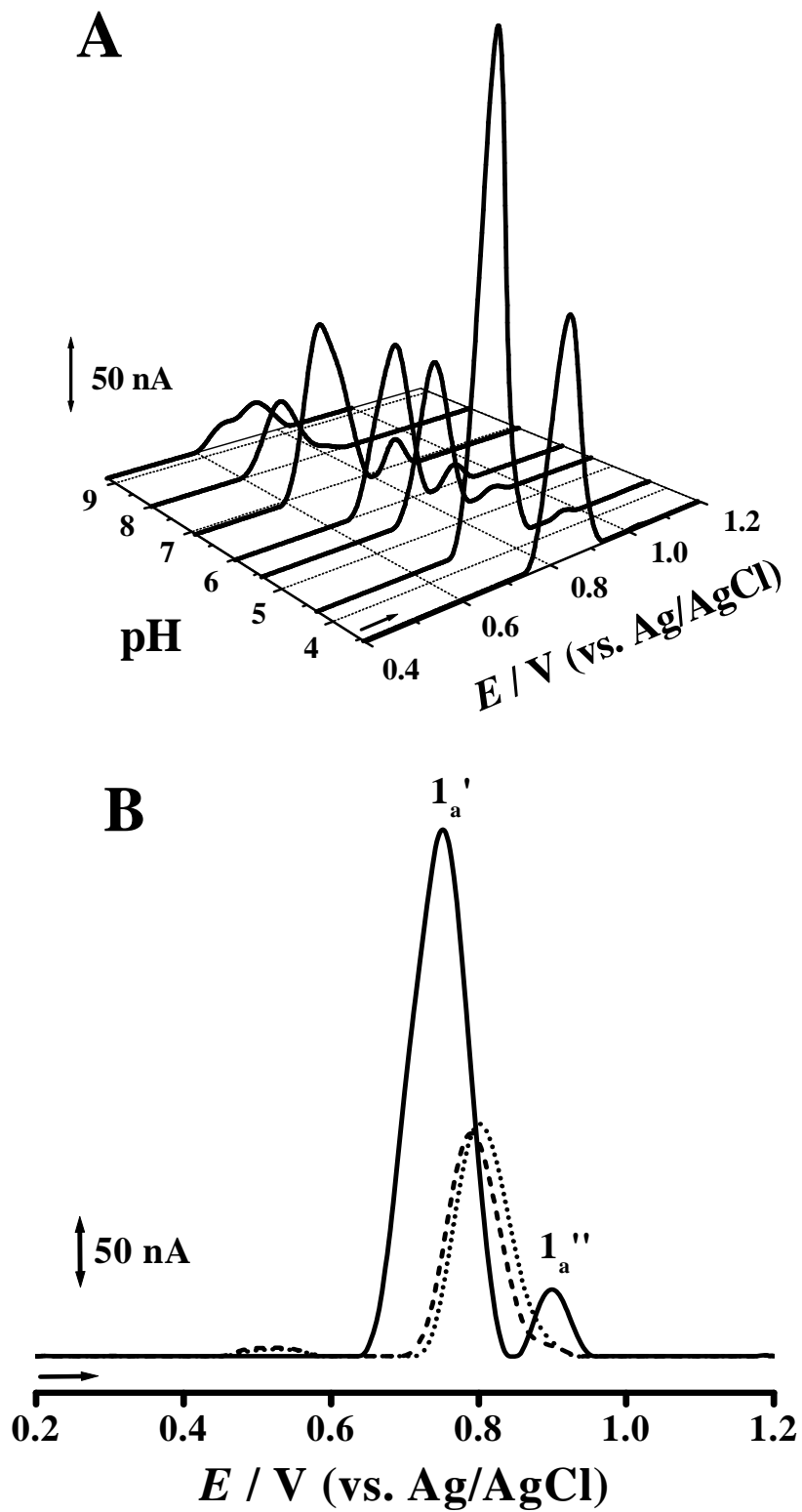


Figura. 4.4 – Voltamogramas de DP obtidos numa solução 30 μ M MTX: (A) Gráfico 3D do primeiro varrimento do potencial em função do pH do eletrólito de suporte e (B) em pH = 6,0 (tampão fosfato 0,1 M); primeiro (—), segundo (•••) e terceiro (---) varrimentos.

Este comportamento foi igualmente observado em eletrólitos de diferentes pH, e a orientação das moléculas adsorvidas de MTX não dependem da concentração da solução, uma vez que as reações correspondentes aos pico $1_a'$ e $1_a''$ apresentam um comportamento Sendo assim, o segundo voltamograma de DP do pico de 1_a foi selecionado para estudar a dependência com o pH da oxidação do MTX , **Fig. 4.5**.

Para as soluções com $2,0 < \text{pH} < 5,4$ o potencial do pico 1_a foi deslocado linearmente para valores menos positivos com o aumento do pH, seguindo a relação $E_{p1a} \text{ (V)} = 1,206 - 0,060 \text{ pH}$, **Fig. 4.5B**.

O declive da recta 60 mV por unidade de pH, mostra que o mecanismo de oxidação do MTX envolve o mesmo número de eletrões e de protões [210]. Tendo em consideração que em todos os electrólitos a largura a meia altura do pico foi de $W_{1/2} \sim 60 \text{ mV}$, pode concluir-se que o mecanismo de oxidação do MTX ocorre com a transferência de dois eletrões e dois protões.

O gráfico da variação da intensidade de corrente para o pico 1_a versus o pH, **Fig. 4.5B**, mostra que a intensidade de corrente apresenta um máximo a $\text{pH} \approx 4,3$.

Para $\text{pH} > 5,4$, o processo de oxidação do MTX não depende do pH do eletrólito de suporte, isto é, apenas ocorre a transferência de dois eletrões.

Assim, pelos dados obtidos, o valor do pK_a do MTX foi determinado $\text{pK}_a \sim 5,4$. Na literatura estão descritos três valores de pK_a associados aos diferentes grupos da molécula [87].

O valor de $\text{pK}_a \sim 5,4$ determinado está relacionado apenas com o comportamento redox do produto de oxidação do MTX.

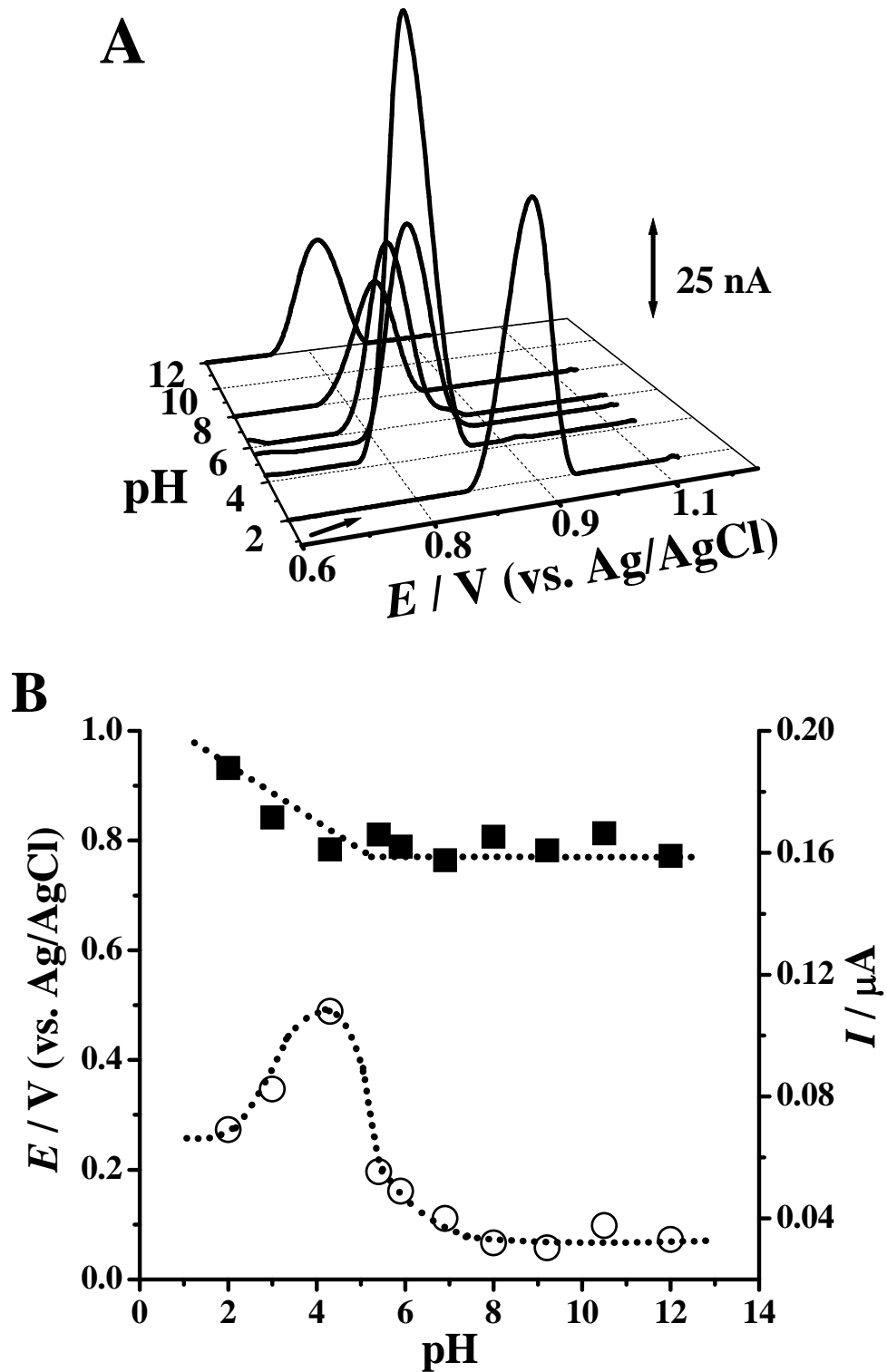


Figure 4.5 – (A) Gráfico 3D com linha de base corrigida dos voltamogramas de DP do segundo varrimento de uma solução 30 μM MTX em função do pH do eletrólito de suporte; (B) Voltamograma E_{p1a} (■) e I_{p1a} (○) do segundo varrimento do pico 1_a em função do pH.

A determinação do pK_a é importante, uma vez que está relacionada com os seus efeitos sobre a lipossolubilidade e solubilidade do MTX.

1.2 Redução

Voltametria cíclica

A redução do MTX foi investigada por CV numa solução 30 μ M MTX preparada diretamente num eletrólito de suporte em pH = 5,4 (tampão de acetato 0,1 M), saturada com N_2 . Varrimentos sucessivos foram registados no intervalo de potencial de - 1,3 V a + 0,80 V, **Fig. 4.6**.

No primeiro varrimento de potencial, foi observado o aparecimento de um pico de redução, pico 3_c , a $E_{p3c} = - 0,57$ V, ao inverter direção do varrimento o pico anódico 3_a , a $E_{p3c} = - 0,52$ V, ocorreu confirmando a reversibilidade da reacção correspondente ao pico de redução do MTX.

No segundo varrimento apareceu um novo pico anódico, pico 4_a , a $E_{p4c} = + 0,57$ V, correspondente à oxidação do produto de redução do MTX, **Fig. 4.6A**, e foram realizados voltamogramas em soluções com diferentes pH.

Os resultados obtidos para soluções 30 μ M MTX saturadas com N_2 , com uma velocidade varrimento de $v = 100$ mV s^{-1} , mostraram que o pico de oxidação 4_a apenas aparece para pH < 7,0, sendo o potencial deslocado para valores mais negativos com o aumento de pH, numa relação linear com a inclinação de 59 mV por unidade de pH. Concluindo-se que mecanismo envolve o mesmo número de eletrões e protões.

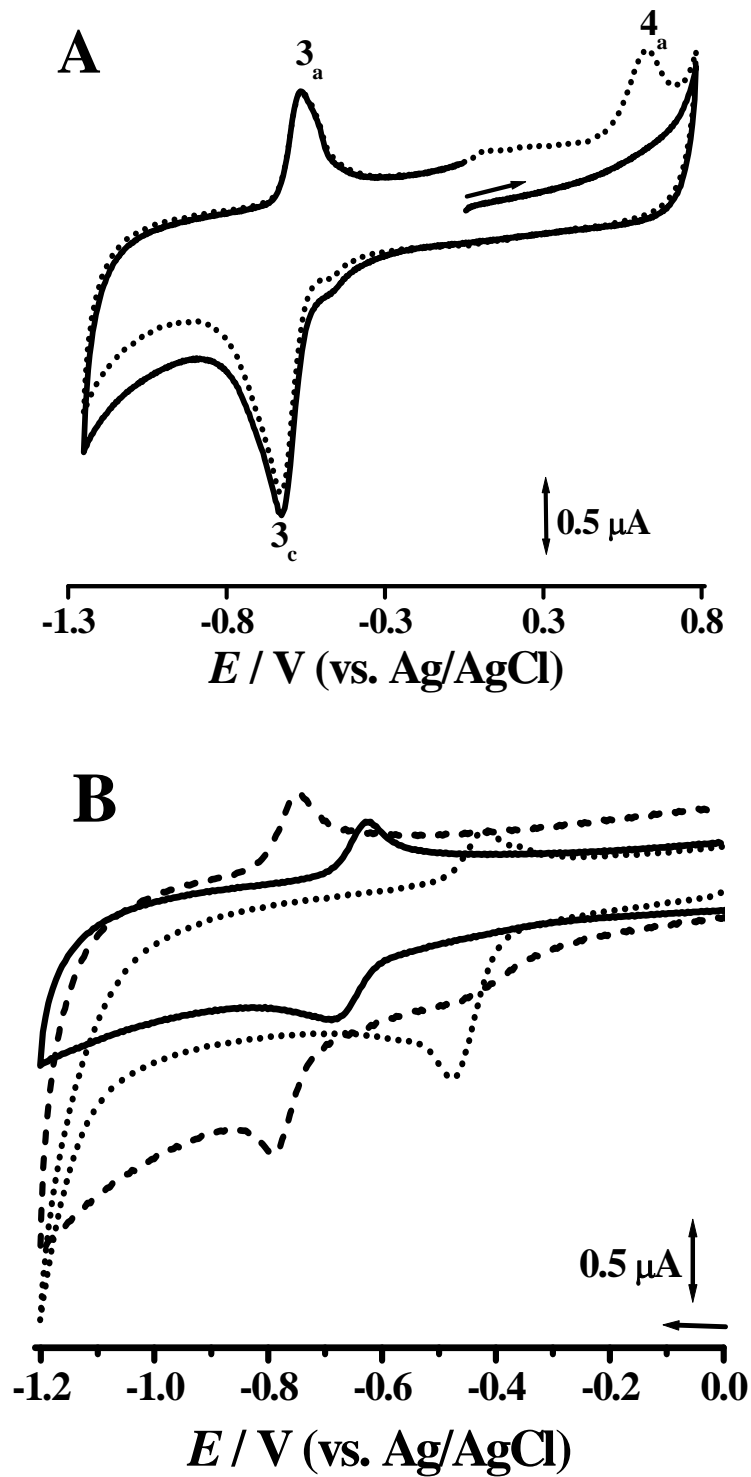


Figura 4.6 – CVs obtidos numa solução 30 μM MTX em: (A) pH = 5,4 (tampão acetato 0,1 M) saturada com N₂ para: (—) primeiro e (•••) segundo varrimento; (B) (•••) pH = 3,4; (—) pH = 7,0 e (---) pH = 10,5, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

A diferença entre o potencial de pico e o potencial a meia altura, $|E_{pc} - E_{p/2c}| \sim 37$ mV correspondendo à transferência de dois elétrons. Para eletrólitos de suporte fortemente ácidos e básicos, observou-se que o processo de redução é *quasi-reversível*, enquanto que para eletrólitos neutros, a reação é reversível, **Fig. 4.6B**.

Influência do pH no mecanismo – Voltametria de impulso diferencial

A redução do MTX foi estudada para uma grande gama de pH, com valores entre 2,0 e 12,0, por voltametria de DP numa solução 30 μ M MTX saturada em N₂, **Fig. 4.7**.

Os voltamogramas de DP mostraram que o pico de redução, pico 3_c, ocorre em todos os eletrólitos de suporte.

Com o aumento do pH da solução, o potencial do pico catódico 3_c foi deslocado para valores mais negativos. A dependência do E_{p3c} com o pH é linear e seguindo a relação E_{p3c} (V) = - 0,23-0,060 pH, **Fig. 4.7B**. O declive da reta de 60 mV por unidade de pH mostra que o processo de redução do MTX envolve o mesmo número de elétrons e de prótons.

A largura a meia altura do pico 3_c, $W_{1/2} \sim 58$ mV, significa que o processo de redução do MTX ocorre com a transferência de dois elétrons e dois prótons.

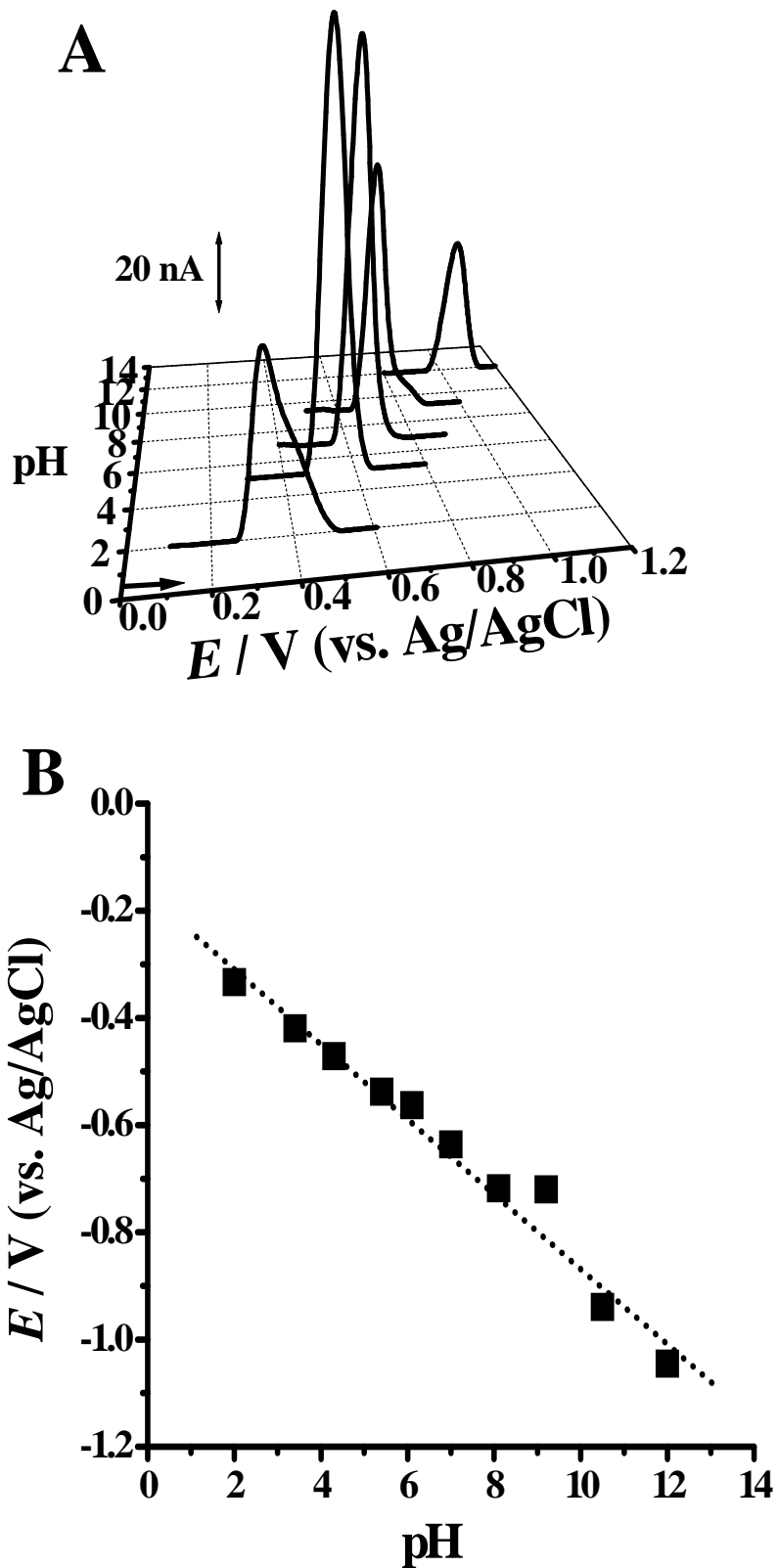


Figura 4.7 – (A) Gráfico 3D de voltamogramas de DP obtidos em soluções 30 μ M MTX em electrólitos de diferentes valores de pH. (B) Gráfico da variação do (■) E_{p3c} vs. pH. A linha pontilhada corresponde a uma inclinação de 59 mV por unidade de pH.

Voltametria de onda quadrada

O voltamograma de SW obtido numa solução 30 μM MTX preparada diretamente em eletrólito de suporte com $\text{pH} = 5.4$ (tampão acetato 0.1 M) mostrou o mesmo comportamento electroquímico quando comparado com os resultados obtidos por CV e voltametria de DP. O primeiro voltamograma de SW de uma solução saturada com N_2 , mostrou a redução do MTX, pico 3_c , a $E_{p3_c} = -0,65 \text{ V}$, **Fig. 4.8**. Na **Fig. 4.8** estão representadas as correntes total, directa e inversa do primeiro varrimento de potencial a $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

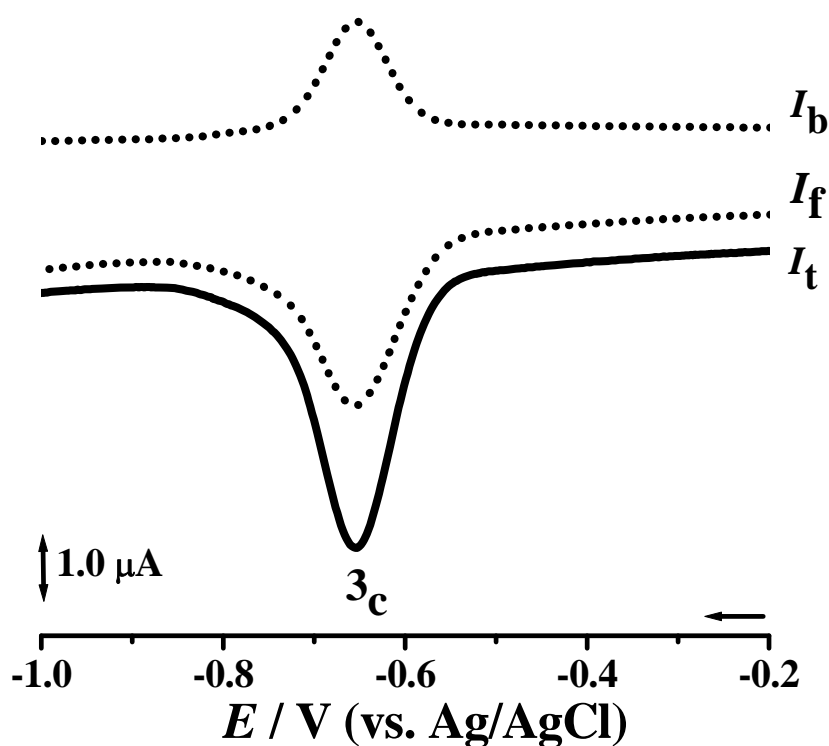


Figura 4.8 – Voltamograma de SW obtido numa solução 30 μM MTX numa solução de eletrólito de suporte em $\text{pH} = 5,4$ (tampão acetato 0,1 M): I_t – corrente total, I_f – corrente directa e I_b – corrente inversa, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

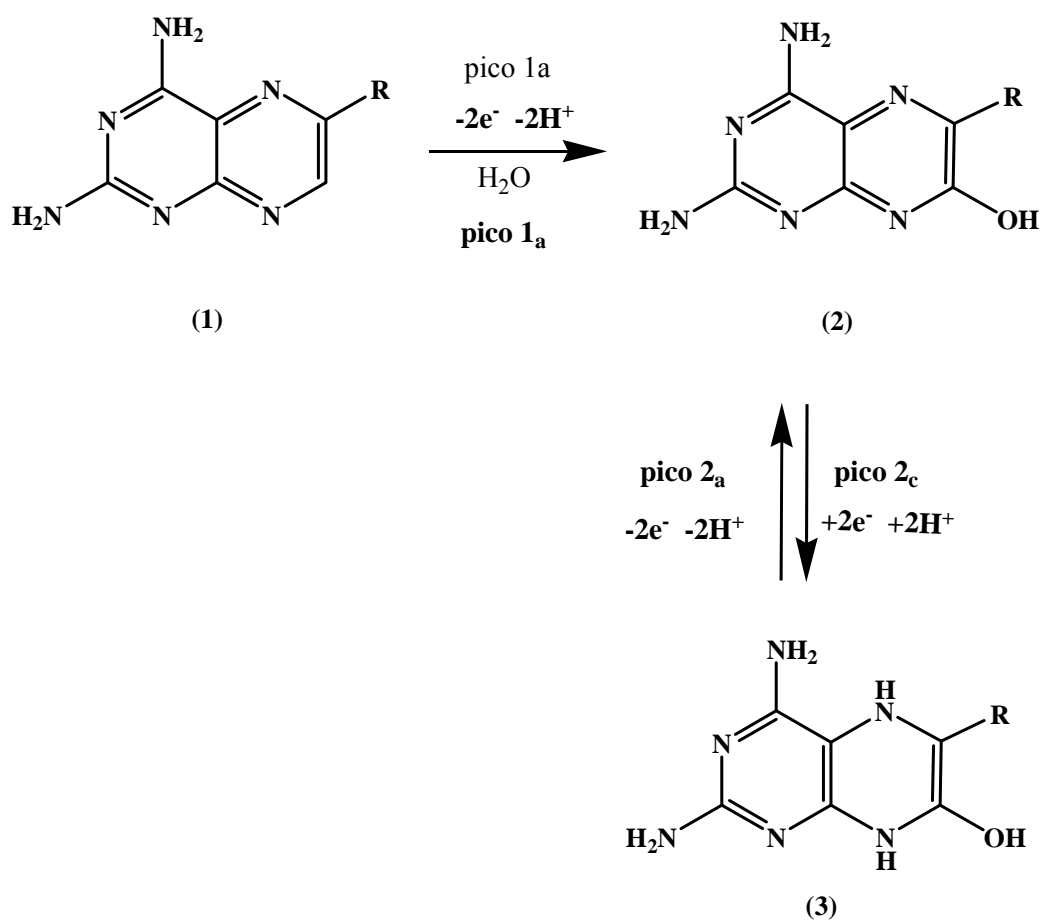
A reversibilidade do pico 3_c foi confirmada através da representação gráfica das componentes directa e inversa da corrente total.

1.3 Mecanismo redox do MTX

Os resultados obtidos indicaram que o MTX sofre oxidação e redução em processos distintos entre eles, envolvendo a formação de produtos eletroativos.

O processo de oxidação do MTX, pico 1_a, é um processo complexo e irreversível e corresponde à oxidação do grupo da pirazina, envolvendo a transferência de dois elétrons e dois prótons, **Fig. 4.9A**. O produto de oxidação obtido, o 7-hidroxi metotrexato (7-OH-MTX) [92] é o principal metabolito do MTX *in vivo*.

A



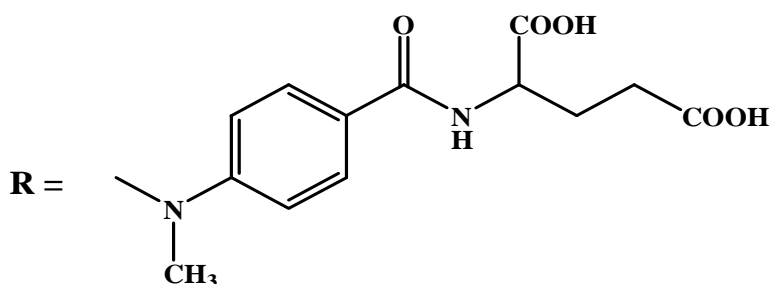
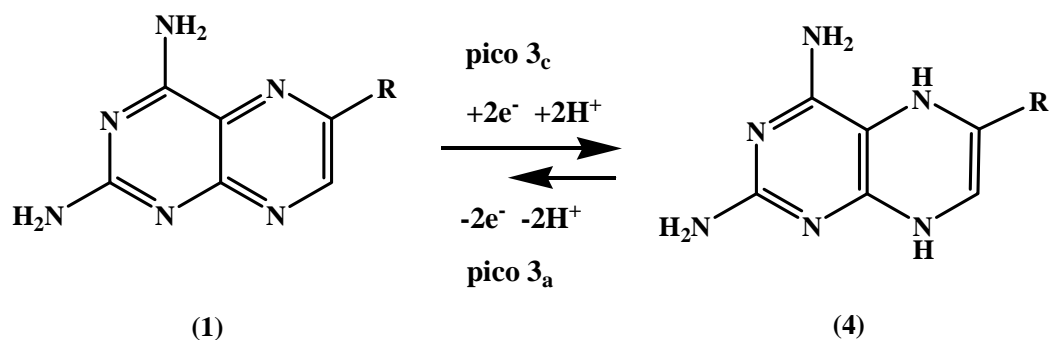
B

Figura 4.9 – Mecanismo redox proposto para o MTX : (A) oxidação e (B) redução.

Os resultados obtidos mostraram que o 7-OH-MTX sofre redução, picos 2_c-2_a, tal como acontece com os outros compostos de pteridina [226] num mecanismo envolvendo a transferência de dois prótons e dois eletrões. A redução do MTX leva ao aparecimento do pico catódico, pico 3_c. O mecanismo de redução deste composto envolve a transferência de dois eletrões e dois prótons e corresponde à redução do grupo diamino-pteridinil da molécula, **Fig. 4.9B**.

Esta reação origina o derivado de 5,8-dihidro, como acontece com outros compostos de pteridina. A formação do derivado 5,8-di-hidro também já foi referida na literatura [226].

2. DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DA INTERAÇÃO MTX-DNA

O MTX pode causar uma série de lesões no DNA [227, 228]. Aparentemente o mecanismo da interação do DNA com o MTX envolve um conjunto de reações bioquímicas secundárias que indicam que o MTX é genotóxico [229] provocando quebras cromossómicas, resultado direto da interação do DNA com o MTX [230, 231].

A interação do MTX com o DNA de dupla hélice foi caracterizada por voltametria de DP a fim de investigar a ação deste fármaco antineoplásico na clivagem das pontes de hidrogénio e desnaturação do DNA e na indução de danos oxidativos às bases do DNA.

Todas as alterações observadas nas correntes dos picos de oxidação do dsDNA, dos resíduos de dGua e de dAdo, foram comparadas com os resultados obtidos para uma solução de dsDNA de controlo. Foi também monitorizada a possível ocorrência dos picos indicativos de dano oxidativo, 8-oxoGua e 2,8-DHA, associados aos produtos de oxidação da guanina e/ou da adenina.

Neste trabalho foram utilizados dois tipos diferentes de elétrodos: o GCE em voltametria de DP e o elétrodo sólido de grafite pirolítica altamente orientada (HOPG) em microscopia de força atómica (AFM).

2.1 Soluções incubadas de MTX-dsDNA

De modo a obter informação sobre a interação MTX-dsDNA foram realizados estudos em soluções incubadas, como referido na *secção 4.2 do Capítulo II*. Os voltamogramas de DP foram registados para diferentes períodos de incubação, 0 h, 24 h

e 72 h. Entre as medidas, o eletrodo foi limpo de modo a evitar o bloqueio da superfície do GCE pela adsorção de MTX e/ou DNA.

O voltamograma de DP obtido na solução dsDNA de controle mostrou dois picos anódicos correspondentes à oxidação das bases purínicas de DNA, o pico da desoxiguanosina (dGuo), a $E_p = + 1,00$ V, e o pico da desoxiadenosina (dAdo), a $E_{pa} = + 1,26$ V, **Fig. 4.10**. Imediatamente após a adição de MTX à solução dsDNA o voltamograma mostrou o aparecimento de três picos, o pico de oxidação do MTX a $E_{pa} = + 0,77$ V, seguido dos dois picos anódicos correspondentes à oxidação de dGuo e dAdo, **Fig. 4.10**.

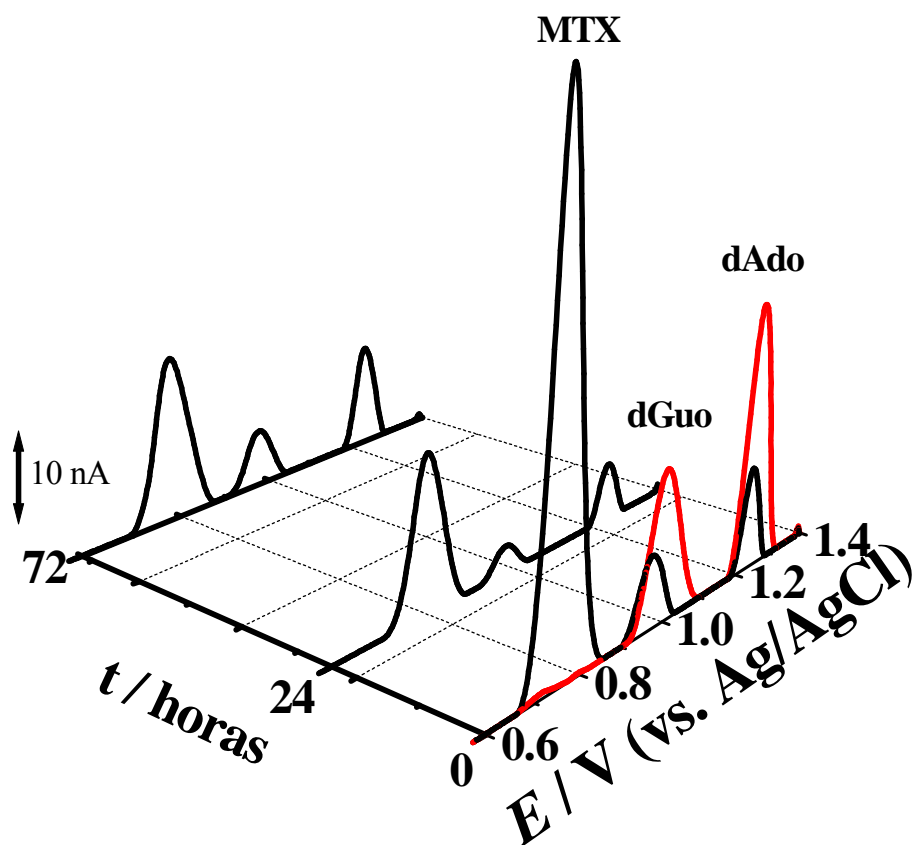


Figura 4.10 - Voltamogramas de DP obtidos numa solução de eletrólito de suporte em pH = 4,5 (tampão acetato 0,1 M) : (—) solução controle $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA e (—) solução $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA incubada com $5 \mu\text{M}$ MTX durante 0 h, 24 h e 72 h.

A diminuição da intensidade dos picos de oxidação das bases, dGuo e dAdo, observada no voltamograma registado imediatamente após a adição de MTX (0 h de incubação), **Fig. 4.10**, mostrou que a interação entre o MTX e o DNA ocorreu de uma forma muito rápida e que o MTX intercala na forma rígida da dupla cadeia de DNA, induzindo a condensação do DNA, o que foi confirmado por AFM.

Para um tempos de incubação mais longos, de 24 e de 72 h, a intensidade dos picos de oxidação das bases diminuiu progressivamente enquanto que a corrente do pico de oxidação do MTX permaneceu constante. Estes resultados mostraram que ocorreram mudanças estruturais na dupla hélice do DNA, sendo estas mudanças dependentes do tempo de incubação com o MTX. O MTX interage especificamente com o dsDNA por intercalação, induzindo alterações estruturais no DNA, de uma maneira dependente do tempo.

De modo a obter mais informações sobre a interacção MTX-dsDNA foram realizadas experiências complementares por AFM, utilizando a HOPG.

A HOPG possui uma superfície atómicamente plana e por essa razão é o eléctrodo de carbono utilizado nas experiências de AFM, permitindo visualizar diretamente as características de uma superfície de carbono coberta por filmes de DNA.

Numa primeira fase, foram realizadas imagens de AFM para investigar a adsorção espontânea de uma solução 0,5 μM MTX numa solução de eletrólito de suporte a $\text{pH} = 4,5$ (tampão acetato 0,1 M) sobre a superfície de HOPG, **Fig. 4.11**.

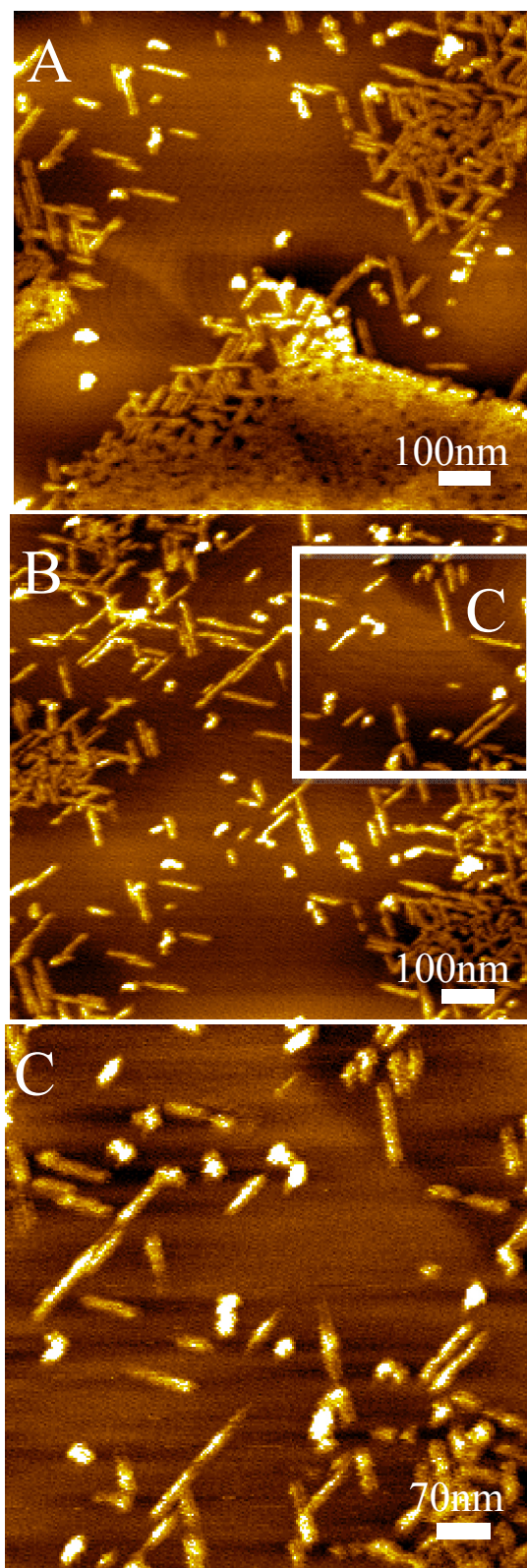


Figura 4.11 –Imagens de AFM do MTX obtidas por adsorção espontânea na superfície de HOPG, a partir duma solução 0,5 μM MTX em $\text{pH} = 4.5$ (tampão acetato 0,1 M).

As imagens mostraram a tendência das moléculas do MTX para adsorver próximas umas das outras, formando cadeias empilhadas com aparência de nanofios e agregados tubulares e esféricos, **Figs. 4.11A e 4.11B**. O padrão de adsorção é observado melhor na imagem da **Fig. 4.11C**, onde a maioria dos nanofios observados nas imagens apresentam aproximadamente 96 nm de comprimento, mas esporadicamente foram visualizados nanofios com comprimentos até 300 nm. A altura e o desvio padrão do nanofios de MTX era de $0,7 \pm 0.1$ nm, o que corresponde à altura duma monocamada de moléculas, enquanto as alturas dos agregados eram ligeiramente mais elevadas, ~ 1.2 nm.

A superfície hidrofóbica de HOPG tem um forte impacto sobre as propriedades de auto-montagem do MTX. A HOPG é um material policristalino, que consiste em domínios cristalinos individuais.

O processo de limpeza do elétrodo de HOPG com fita-cola leva à formação de diferentes terraços atômicamente planos no plano basal da grafite. Nos terraços planos da HOPG, as estruturas finas do MTX apresentavam-se orientadas principalmente ao longo de três direções, ditadas pela simetria do substrato de grafite e pelas interações do MTX com o substrato. A formação deste tipo de agregados de forma alongada orientados na mesma direção que a superfície de grafite subjacente foi observada em várias experiências independentes, efetuadas nas mesmas condições experimentais. Para determinar a adsorção do dsDNA de controle, foram realizadas imagens de AFM de uma solução $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ DNA, **Fig. 4.12A**. As imagens mostraram a formação de uma rede fina e incompleta de DNA, formada pelas moléculas de DNA agregadas.

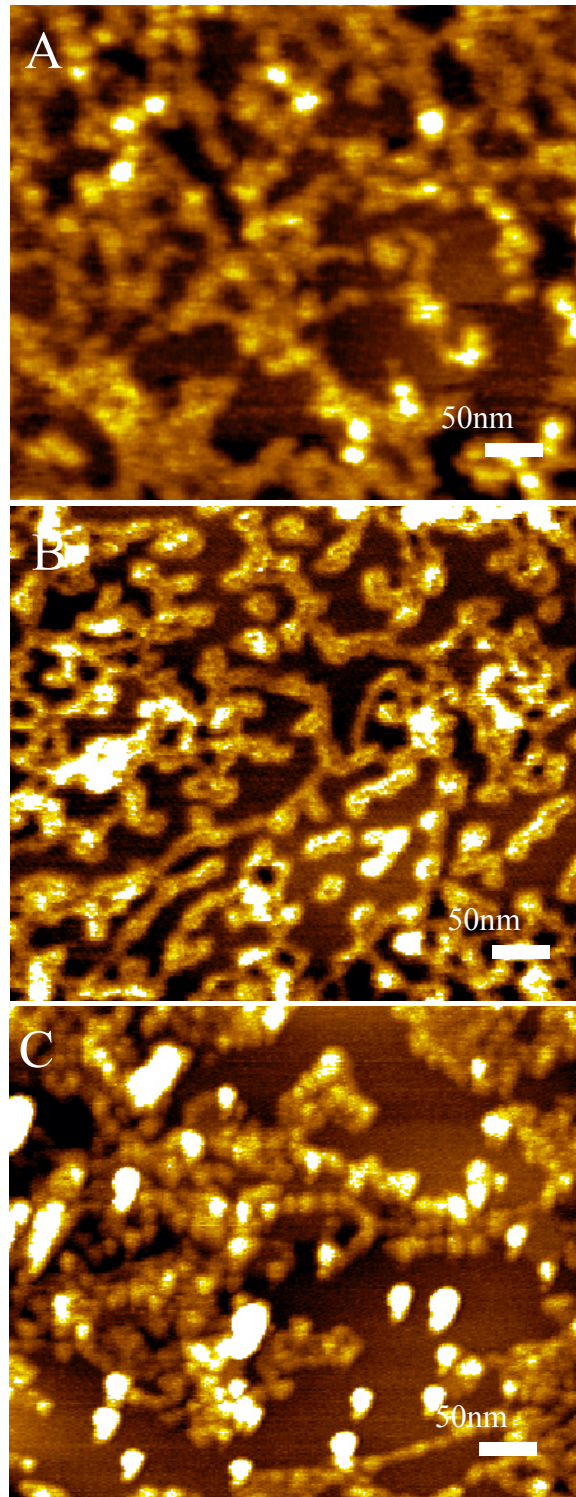


Figura 4.12 – (A–C) Imagens de AFM de (A) dsDNA de controle e (B, C) MTX-dsDNA, obtidas na superfície de HOPG a partir de soluções a pH = 4.5 (tampão de acetato 0,1 M) de: (A) $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA de control e (B, C) $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA incubada com $0.5 \mu\text{M}$ MTX, durante (B) 0 h e (C) 24 h.

Como se pode observar nas imagens, **Fig. 4.12**, as sequências do MTX não estão orientadas com um ângulo fixo relativamente à direção ao substrato da HOPG, indicando que a orientação dos nanofios do MTX não foi induzida por irregularidade na superfície das extremidades das camadas do substrato da HOPG, mas induzida pelo crescimento epitaxial nos terraços planos da HOPG, **Fig. 4.12C**. As incubações $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA com $0,5 \mu\text{M}$ MTX, foram realizadas para diferentes tempos 0 h e 24 h, **Fig. 4.12B e C**. As imagens de AFM mostraram que a camada de MTX-dsDNA adsorvida na HOPG, após 0 h, apresentou um padrão de adsorção semelhante ao obtido com o dsDNA de controle, **Fig. 4.12A**. O filme de MTX-dsDNA com aspecto de rede mostrou uma altura média e desvio padrão de $0,7 \pm 0,2$ nm, também de acordo com a altura da camada de dsDNA de controle e com a altura de uma monocamada de MTX. No entanto, o crescimento epitaxial característico ao MTX adsorvido na superfície de HOPG não foi observado nas imagens de AFM do MTX-dsDNA, sugerindo que as moléculas de MTX foram intercaladas no dsDNA.

Após 24 h de incubação, **Fig. 4.12C**, foi observada uma reorganização das camadas auto-montadas de DNA na superfície do HOPG e a formação de uma malha mais densa e ligeiramente mais espessa de MTX-dsDNA. Todavia, um grande número de agregados de maior tamanho foi incorporado no filme. Foi ainda observada uma diminuição da cobertura da superfície HOPG por MTX-dsDNA, quando comparado com o dsDNA de controle, **Fig. 4.12A**, e com a camada de MTX-dsDNA adsorvida após 0 h de incubação nas mesmas condições experimentais, **Fig. 4.12B**.

O número de agregados MTX-dsDNA diminuiu com o tempo de incubação, mas ficam maiores, sugerindo que o MTX provoca alterações morfológicas na estrutura do dsDNA e a condensação das cadeias do dsDNA.

2.2 Interação de MTX com biossensor eletroquímico com DNA

A interacção MTX-dsDNA foi estudada com um biossensor eletroquímico com dsDNA multicamada, descrito no *Capítulo II, secção 4.2*. O biossensor foi preparado pela cobertura da superfície do GCE camada por camada a partir de três gotas sucessivas de 5 μL de uma solução 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA. Entre cada gota adicionada a superfície do eléctrodo era sempre seca com um fluxo constante de azoto. Depois de completamente seco o biossensor foi incubado numa solução 100 μM MTX durante diferentes períodos de tempo.

Os biossensores de controle foram também preparados e posteriormente avaliados eletroquimicamente numa solução de eletrólito de suporte a $\text{pH} = 4,5$ (tampão acetato 0,1 M).

O voltamograma obtido para o biossensor de controle de dsDNA mostrou os dois picos anódicos, correspondentes à oxidação das bases de DNA purínicas, o pico de desoxiguanosina (dGuo), a $E_p = + 1,00 \text{ V}$, e o pico de desoxiadenosina (dAdo), a $E_p = + 1,26 \text{ V}$, **Fig. 4.13**.

O biossensor com dsDNA foi incubado durante 5 minutos numa solução 100 μM MTX e de seguida transferido para o eletrólito de suporte a $\text{pH} = 4,5$ (tampão acetato 0,1 M) onde o voltamograma DP foi registado, **Fig. 4.13**. O voltamograma obtido mostra o pico de oxidação do MTX, pico 1_a, $E_{pa} = + 0,77 \text{ V}$, e os picos de oxidação das bases do DNA, cujas correntes são inferiores às obtidas para o biossensor de DNA (linha vermelha).

Foram repetidas as experiências, sempre com um novo biossensor, variando o tempo de incubação, 10 e 20 minutos (linha tracejada e pontilhada, respetivamente).

Verifica-se que com o aumento do tempo de incubação do biossensor na solução do MTX, a intensidade da corrente do pico de oxidação do MTX se reduz. A partir de 10 minutos a intensidade da corrente permanece constante. Este efeito é atribuído à intercalação dos centros eletroativos do MTX nas cadeias de dsDNA, ficando indisponíveis para oxidação eletroquímica.

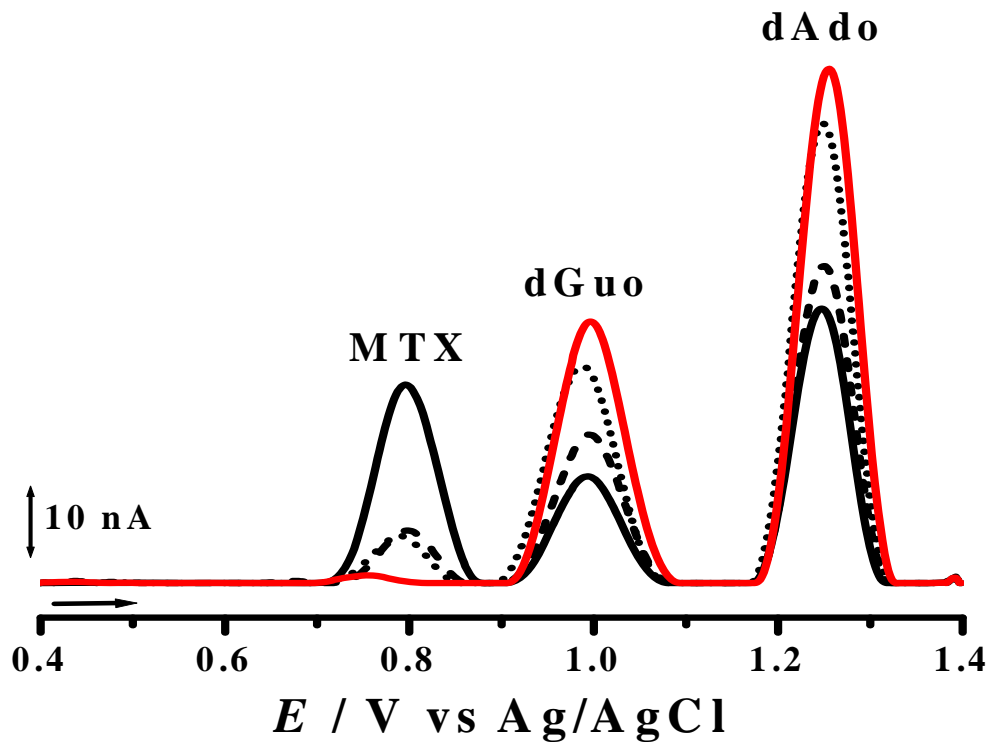


Figura 4.13 – Voltamograma de DP obtido em solução de eletrólito de suporte a $\text{pH} = 4,5$ (tampão acetato 0,1 M) com um biossensor eletroquímico dsDNA (—) antes e depois a incubação com uma solução 100 μM MTX durante:(—) 5, (---) 10 e (•••) 20 min.

Ao mesmo tempo, após 10 min de incubação, a diminuição da intensidade dos picos de oxidação de dGuo e dAdo é atribuída à agregação / condensação do DNA imobilizado na superfície do eletrodo.

Devido à agregação, a oxidação das purinas torna-se mais difícil uma vez que as bases empilhadas no interior de uma estrutura mais rígida são impedidas de interagir com a superfície do eléctrodo o que leva à diminuição do sinal eletroquímico numa fase inicial. Esta explicação está de acordo com os resultados de AFM obtidos, onde foi demonstrado que a incubação com MTX leva à formação de uma camada mais densa.

Para períodos maiores de incubação, *i.e.* 20 min, foi observado o aumento dos picos de oxidação das bases DNA. Este efeito é atribuído a mudanças conformacionais na estrutura do DNA. O MTX intercala no DNA e deixa bases expostas à superfície do eléctrodo, facilitando a sua oxidação.

A inexistência dos picos de 8-oxoGua ou 2,8-oxoAde, nos voltamogramas DP, é indicativo da não ocorrência de danos oxidativos para as condições experimentais utilizadas.

De modo a obter mais informação sobre a especificidade de MTX-dsDNA, isto é, a ligação preferencial da interação do MTX com as bases do DNA, foram realizadas experiências utilizando-se biossensores eletroquímicos de sequências purínicas homopoliribonucleotídicas de guanosina, poly [G], ou adenosina, poly [A].

O voltamograma de DP de um biossensor eletroquímico de poly [G] de controle em pH = 4,5 (tampão de acetato 0,1 M) mostrou apenas um pico de oxidação a + 0,98 V, o que corresponde à oxidação de resíduos de dGuo, **Fig. 4.14A**.

Novos biossensores eletroquímicos foram incubados em soluções 100 µM MTX em diferentes períodos de tempo, 5 min, 10 min e 20 min, respetivamente.

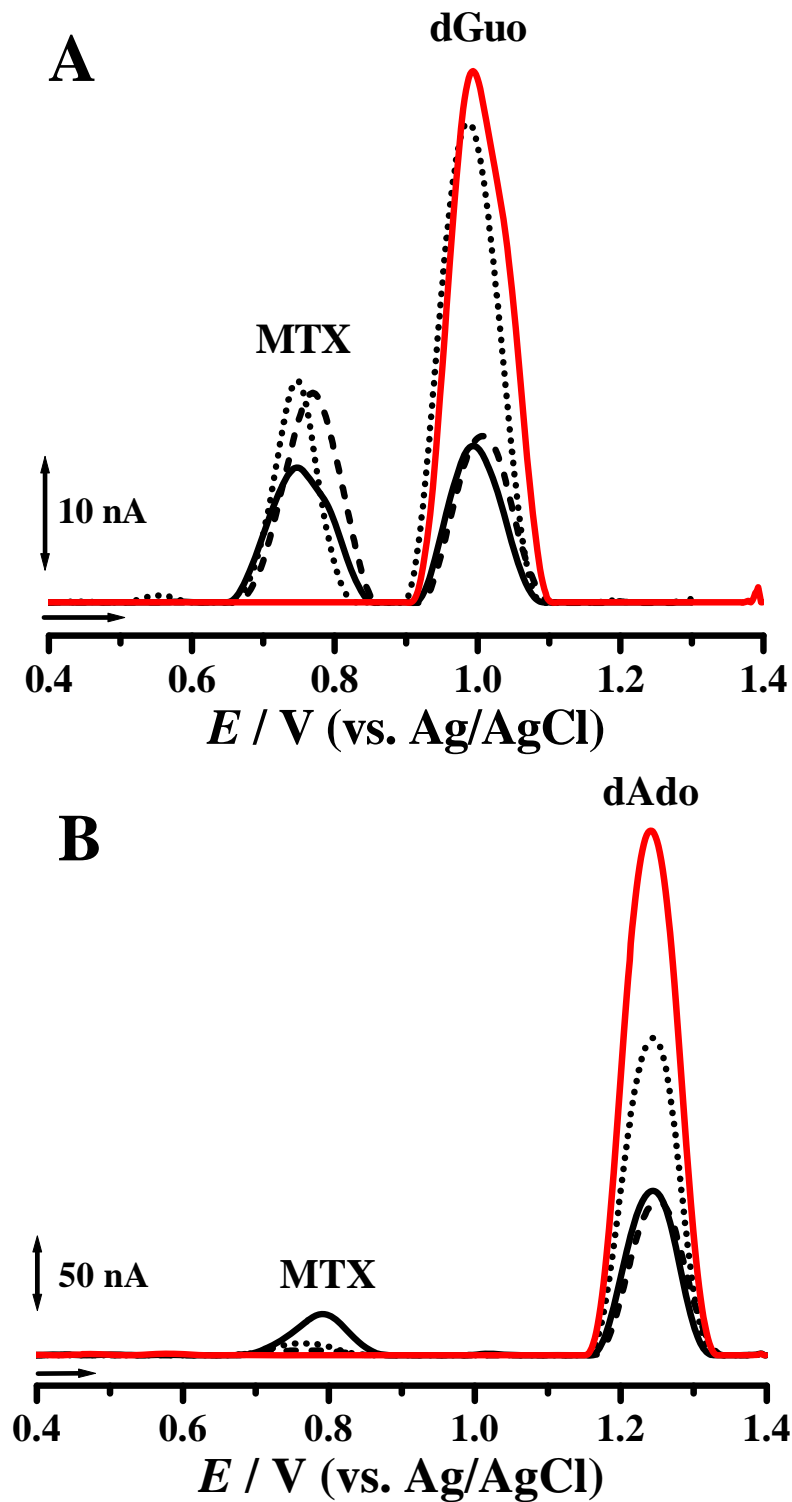


Figura 4.14 – Voltamogramas de DP obtidos numa solução de eletrólito de suporte em pH = 4.5 (tampão acetado 0.1 M) para biossensores eletroquímicos com: (A) poly [G] e (B) poly [A] (—) antes e depois da incubação numa solução 100 μ M MTX durante (—) 5, (---) 10 e (•••) 20 min.

Os voltamogramas de DP obtidos numa solução de eletrólito de suporte a pH = 4,5 com o biossensor eletroquímico de poly [G] após 5 minutos de incubação mostraram a ocorrência de dois picos correspondentes à oxidação do MTX e da dGuo. Com o aumento do tempo de incubação a intensidade da corrente do pico de oxidação dGuo aumentou enquanto que a corrente do pico de oxidação do MTX se manteve constante, **Fig. 4.14A**.

Numa nova experiência, o voltamograma de DP de um biossensor eletroquímico de controlo de poly [A] numa solução de eletrólito de suporte a pH = 4,5 (tampão acetato 0,1 M) também mostrou o aparecimento de apenas um pico de oxidação, correspondente à oxidação dos resíduos de dAdo, **Fig. 4.14B**. Após 5 minutos de incubação do biossensor eletroquímico de poly [A] na solução, os voltamogramas de DP mostraram uma diminuição da corrente de ambos os picos, MTX e Ado. Para tempos de incubação mais longos, de 10 e 20 min, o pico de oxidação da Ado aumentou.

Por outro lado, foi observado uma diminuição do pico de oxidação MTX com o aumento do tempo de incubação, **Fig. 4.14B**. A diminuição da intensidade de corrente do pico de oxidação do MTX com o tempo de incubação observada no caso do biossensor poly [A] é uma indicação de uma afinidade preferencial do MTX a segmentos de DNA ricos em resíduos de adenina.

A intercalação da MTX entre pares de bases dsDNA foi claramente demonstrada pela diminuição do pico de oxidação MTX quando o tempo de incubação aumentou.

3. CONCLUSÃO

A investigação eletroquímica do comportamento redox do MTX foi realizada numa ampla gama de pH e demonstrou que o MTX sofre oxidação e redução na superfície do GCE. A oxidação do MTX é um processo irreversível, dependente do pH, e conduz à formação de um produto eletroativo na superfície do eletrodo, o 7-hidroxi metotrexato. O produto de oxidação adsorve sobre a superfície do eletrodo e sofre redução num processo reversível. A redução de MTX é uma reação reversível, dependente do pH com a formação de um produto eletroativo, que sofre uma oxidação irreversível.

O mecanismo de interação do MTX com dsDNA em soluções incubadas foi esclarecido, tendo em consideração a correlação entre o comportamento redox e as características morfológicas observadas. As imagens de AFM mostraram uma reorganização da rede de DNA auto-montada sobre a superfície do eletrodo de HOPG após a incubação com MTX, assim como a formação de uma camada mais densa e ligeiramente mais espessa de dsDNA-MTX. Em concordância com os resultados de AFM, os dados voltamétricos mostraram que ocorreram modificações estruturais no dsDNA de uma forma dependente do tempo. Os resultados voltamétricos mostraram que o MTX intercala na cadeia do dsDNA, causando a quebra das ligações de hidrogénio e a abertura da estrutura do dsDNA e expondo as bases purínicas à superfície do GCE. A afinidade preferencial do MTX para os segmentos ricos em adenina é explicado pelas fracas ligações de H que se estabelecem entre a adenina e a timina.

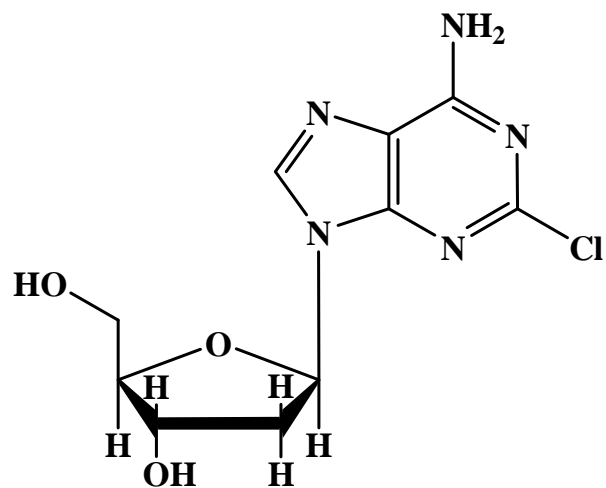
CAPÍTULO V

ESTUDO ELETROQUÍMICO DE ANÁLOGOS DE PURINA E INTERAÇÃO COM DNA

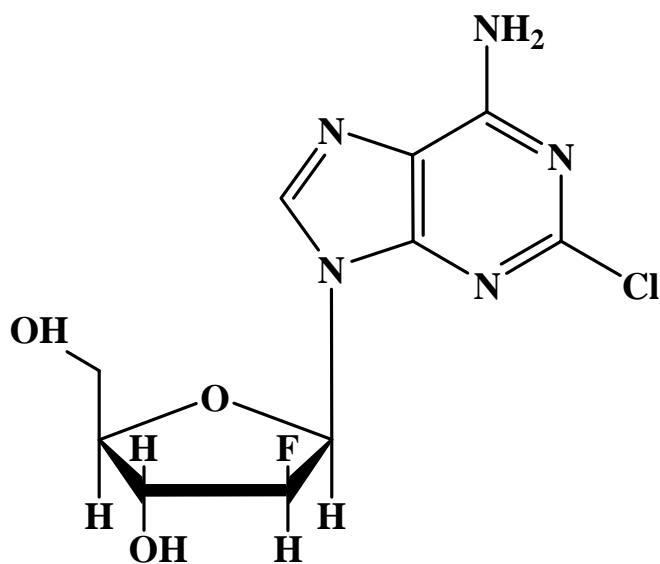
Neste capítulo é descrito o estudo eletroquímico da interação de dois análogos de purina, a cladribina (CLD) e a clofarabina (CLF), **Fig. 5.1**, com o DNA.

O comportamento eletroquímico da CLD e CLF foi investigado na superfície do GCE numa ampla faixa de pH. A compreensão dos processos envolvidos nas reações redox permitiu o esclarecimento dos mecanismos de transferência de elétrons destes análogos de purina.

Informações sobre o comportamento eletroquímico da CLD e da CLF, a partir dos resultados em diferentes pHs desempenham um papel fundamental para a compreensão de suas propriedades, e do seu metabolismo num sistema biológico.



Cladribina



Clofarabina

Figura 5.1 – Estrutura química da: CLD e da CLF.

Os resultados apresentados levam à proposta de um mecanismo através do qual estas duas moléculas causam danos no DNA *in vivo*, de grande interesse na área da saúde.

1. ESTUDO ELETROQUÍMICO

O estudo do comportamento voltamétrico da CLD e da CLF foi realizado numa faixa de pH entre 2,0 e 12,0, utilizando um GCE.

CVs sucessivos numa solução 100 μM CLD a partir de 0,00V num intervalo de potencial entre $- 1,0 \text{ V}$ e $+ 1,3 \text{ V}$, com uma velocidade de varrimento $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. mostraram apenas um pico na região anódica, **Fig. 5.2A**. O mesmo estudo foi efetuado para uma solução 300 μM CLF, tendo-se observado o mesmo comportamento eletroquímico da CLD, isto é, um pico de oxidação, **Fig. 5.2B**. Deste modo, procedeu-se ao estudo do comportamento anódico destes análogos de purina.

1.1 Oxidação

Voltametria cíclica

Nos CVs numa solução 100 μM CLD, preparada em pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M) foi apenas observado o pico de oxidação, pico 1_a , a $E_{p1a} = + 1,30 \text{ V}$, **Fig. 5.2A**. No varrimento reverso na direção negativa, não foi observado nenhum pico de redução, indicando que o processo de oxidação é irreversível [128]. Para eletrólitos com pH < 3,4 e pH > 10,0 não ocorreu nenhum pico de oxidação para a CLD. Para soluções de $3,4 < \text{pH} < 10,0$, os CVs mostraram sempre um pico irreversível. O potencial de pico 1_a foi deslocado para valores menos positivos com o aumento do pH.

Por outro lado a intensidade da corrente de pico 1_a diminuiu com o aumento do número de varrimentos devido à adsorção dos produtos de oxidação da CLD na superfície do GCE.

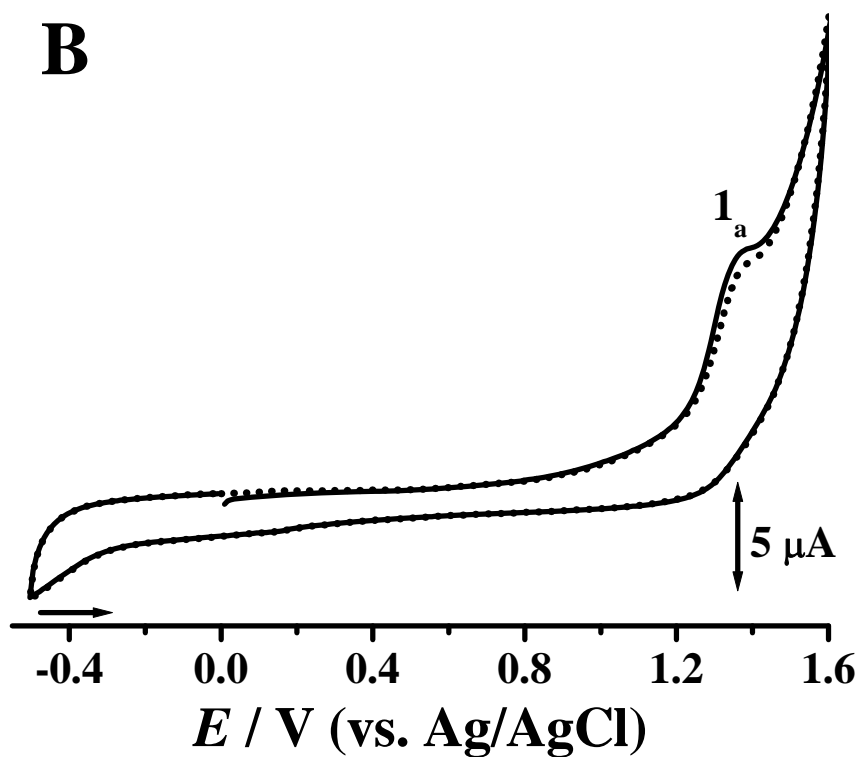
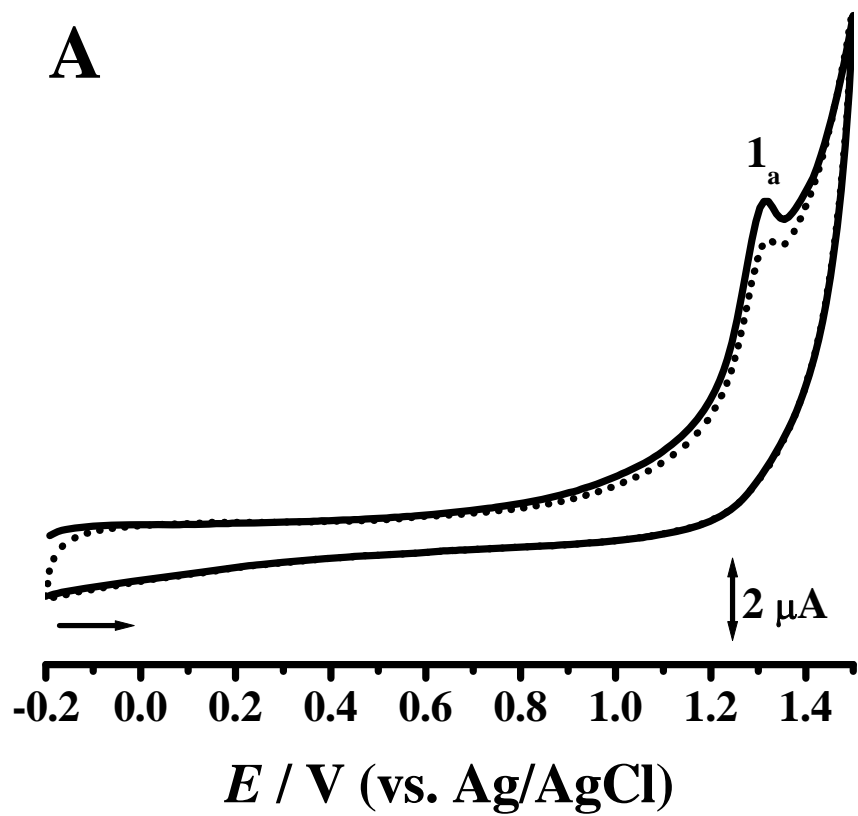


Figura 5.2. CVs obtidos numa solução preparada em pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M): (A) 100 μM CLD; (B) 100 μM CLF, (—) primeiro e (•••) segundo varrimento, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Os CVs registados numa solução 300 μM CLF em eletrólito de suporte pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M) mostraram o aparecimento de um único pico de oxidação irreversível, o pico 1_a a $E_{p1a} = +1,35$ V, **Fig. 5.2B**, tal como para a CLD.

Foi estudado o efeito do pH no potencial e na intensidade da corrente do pico, sendo que, para $2,0 < \text{pH} < 8,0$ o potencial do pico 1_a é dependente do pH. Os voltamogramas cíclicos mostraram que, em meio ácido forte ($\text{pH} < 2,0$) não ocorreu o aparecimento de qualquer pico de oxidação para a CLF, e em meio básico forte ($\text{pH} > 8$), o pico 1_a fica alargado e acaba por se dividir em dois picos.

O efeito da velocidade foi também estudado por CV para velocidades de varrimento entre 5 e 500 mV s^{-1} numa solução 60 μM CLD em pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M), **Fig. 5.3**.

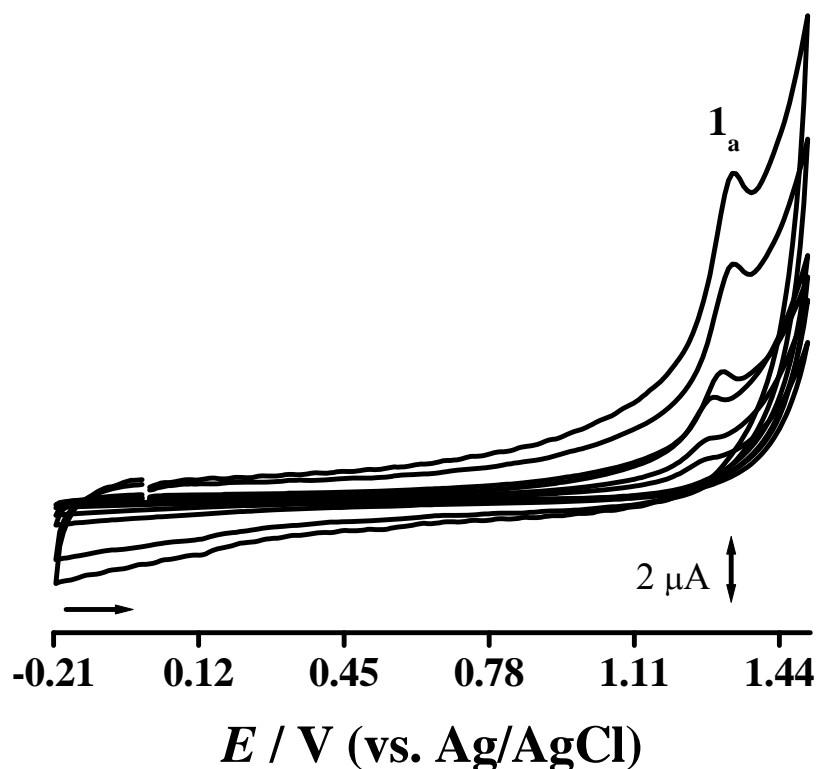


Figura 5.3. CVs obtidos numa solução 60 μM CLD em pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M) com velocidades de varrimento: 5, 10, 25, 100, 400 e 500 mV s^{-1} .

A superfície do eletrodo foi sempre polida entre as medidas, de modo a garantir uma superfície limpa para evitar possíveis problemas de adsorção.

A intensidade de corrente do pico 1_a aumenta com o aumento da velocidade de varrimento, seguindo uma dependência linear com a raiz quadrada da velocidade, de acordo com um processo controlado por difusão [210].

Resultados semelhantes foram obtidos numa solução de CLF.

Voltametria de impulso diferencial

Para o estudo e caracterização da oxidação eletroquímica da CLD utilizou-se ainda a voltametria de DP. O estudo contemplou uma vasta gama de pH, $2,0 < \text{pH} < 9,2$, em soluções $100 \mu\text{M}$ CLD, **Fig. 5.4A**.

A CLD ocorre na forma ionizada em toda a faixa de valores de pH estudada uma vez que o valor pK_a é de 1,3 [232]. Para eletrólitos de suporte em meio ácido forte, a CLD é muito instável. Numa solução em $\text{pH} = 2,0$ a CLD sofre hidrólise, levando à formação da 2-cloroadenina [233]. Todavia, nenhum pico de oxidação da CLD foi observado nas condições experimentais efetuadas.

Para $\text{pH} > 3,0$ observou-se a ocorrência do pico 1_a , sendo que o potencial do pico foi deslocado para valores menos positivos com o aumento do pH. A relação foi linear seguindo-se a equação $E_{\text{pa}} (\text{V}) = 1,540 - 0,059 \text{ pH}$, **Fig. 5.4B**. O declive da reta, 59 mV por unidade de pH, mostra que o mecanismo de oxidação envolve o mesmo número de elétrons e prótons. O número de elétrons transferidos, n , foi determinado pela largura do pico a meia altura, $W_{1/2} \sim 60 \text{ mV}$, ou seja, a oxidação da CLD é uma reação eletroquímica que envolve a transferência de dois elétrons e dois prótons.

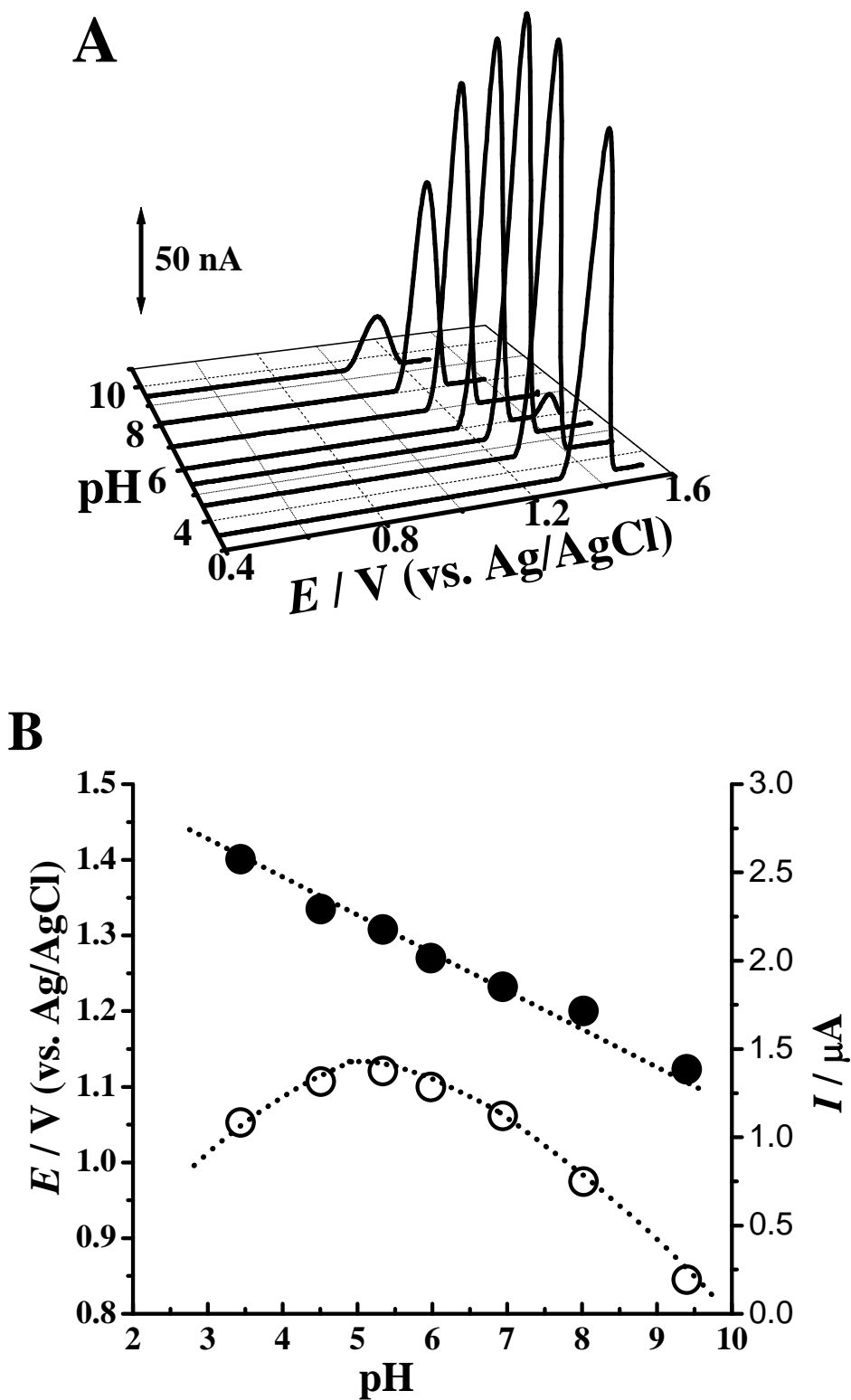


Figura 5.4. (A) Gráfico 3D de voltamogramas de DP obtidos numa solução 100 μM CLD preparada em diferentes eletrólitos de suporte; (B) Gráfico da variação de (●) E_{p1a} e (○) I_{p1a} em função do pH.

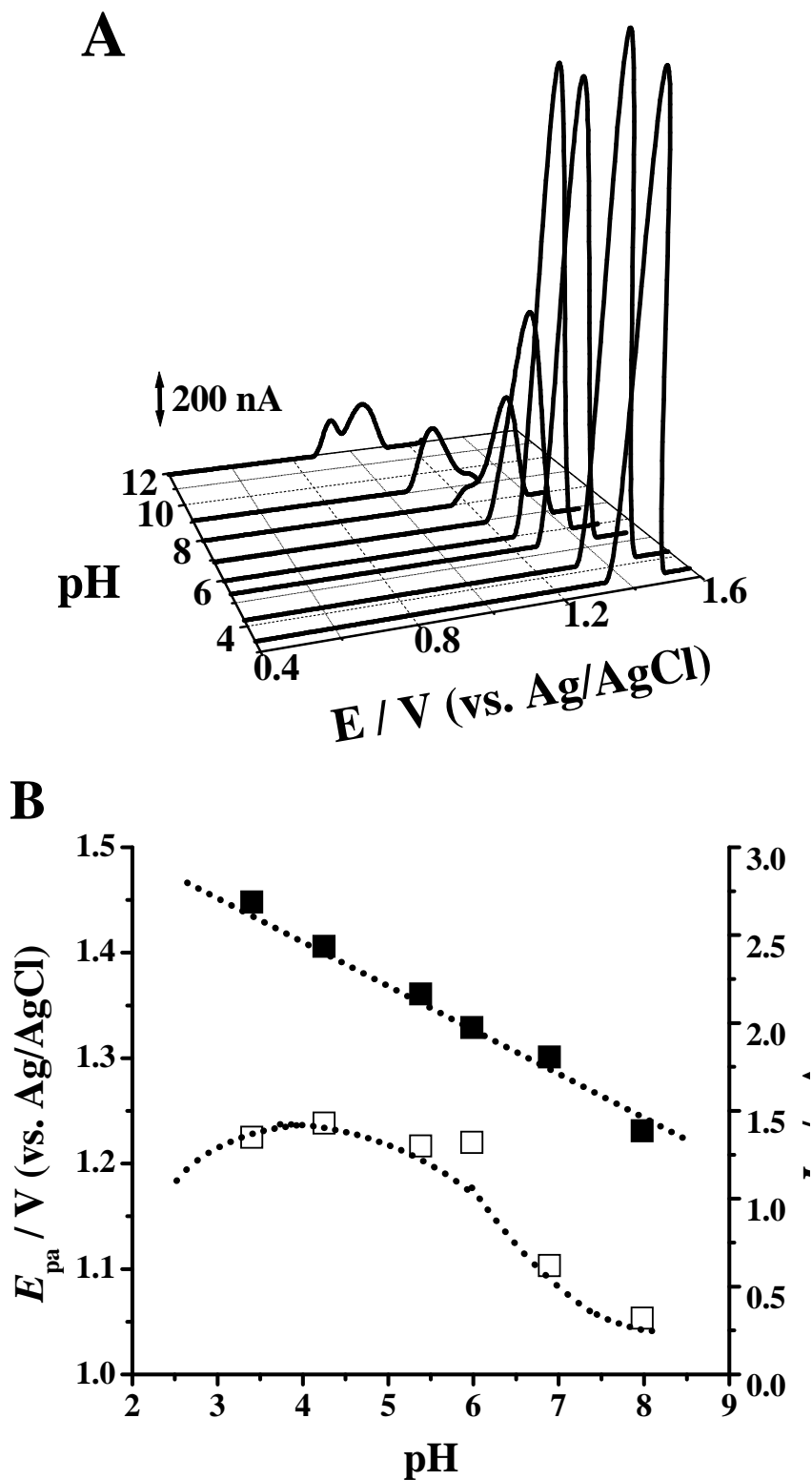


Figura 5.5 (A) Gráfico 3D dos voltamogramas de DP de linha de base corrigida obtidos para uma solução 300 μM CLF em diversos eletrólitos de suporte; (B) Gráfico da variação de: (■) E_{pa} e (□) I_{pa} em função do pH.

O comportamento eletroquímico da oxidação da CLF também foi estudado usando a voltametria de DP em eletrólitos de suporte com $2,0 < \text{pH} < 12,0$. Os voltamogramas DP foram registados em soluções $300 \mu\text{M}$ CLF, **Fig. 5.5A**.

Para $2,0 < \text{pH} < 8,0$, a oxidação da CLF é dependente do pH e a variação do potencial do pico 1_a é linear, a $E_{p1a} (\text{V}) = 1,640 - 0,059 \text{ pH}$, **Fig. 5.5B**. O declive da reta, 59 mV por unidade de pH, indica que estão envolvidos na oxidação da CLF o mesmo número de prótons e de elétrons. A largura a meia altura do pico 1_a foi $W_{1/2} \sim 46 \text{ mV}$, ou seja, ocorre a transferência de dois elétrons. Sendo assim, a oxidação de CLF ocorre com uma transferência de dois elétrons e dois prótons. Através do voltamograma verifica-se ainda que a corrente do pico apresenta valores elevados de intensidade e diminui drasticamente para $\text{pH} > 6,0$, **Fig. 5.5A**.

A corrente do pico 1_a da CLF diminuiu para pH menos ácidos. A oxidação do pico 1_a desapareceu no segundo varrimento para meios ácidos fortes, $\text{pH} < 2,0$. Para $\text{pH} > 8,0$, pico 1_a dividiu-se em dois picos, devido à degradação de CLF em meio alcalino, **Fig. 5.5A**.

Voltamogramas sucessivos de DP na mesma solução e sem a limpeza da superfície do GCE, mostraram o aparecimento de um novo e pequeno pico, não visível por CV, pico 2_a , correspondente à oxidação do produto da oxidação da CLD, **Fig. 5.6**.

Foi ainda investigada a variação do potencial de pico 2_a com o pH. Para cada solução de eletrólito suporte foi registado dois voltamogramas consecutivos.

Aumentando o valor do pH, o potencial de pico 2_a diminui linearmente, sendo o declive da reta igual 59 mV por unidade de pH, portanto, este processo envolve o mesmo número de elétrons e prótons em meio aquoso. Como a $W_{1/2} \sim 90 \text{ mV}$ concluiu-se que a reação de oxidação ocorre com a transferência de um elétron e um próton.

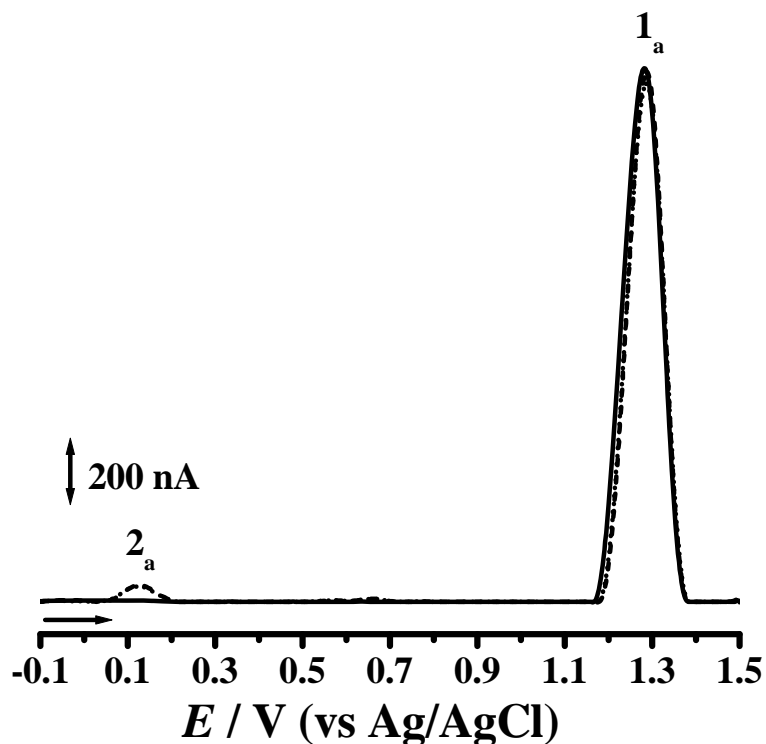


Figura 5.6. Voltamogramas de DP obtidos numa solução 100 μM CLD preparada a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0,1 M): (—) primeiro, (•••) segundo e (---) terceiro varrimento.

Resultados semelhantes foram obtidos para o segundo varrimento da oxidação da CLF. O mecanismo de oxidação do pico 2_a para a CLF envolve também a transferência de um elétron e um próton.

Voltametria de onda quadrada

A voltametria de SW foi realizada na mesma faixa de pH que as técnicas anteriores. A ocorrência de pico anódico, pico 1_a , foi observada em todos os eletrólitos de suporte utilizados. A irreversibilidade do pico 1_a foi confirmada pela representação das componentes direta e inversa da corrente total no voltamograma obtido numa solução 500 μM CLD em $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0,1 M), **Fig. 5.7A**.

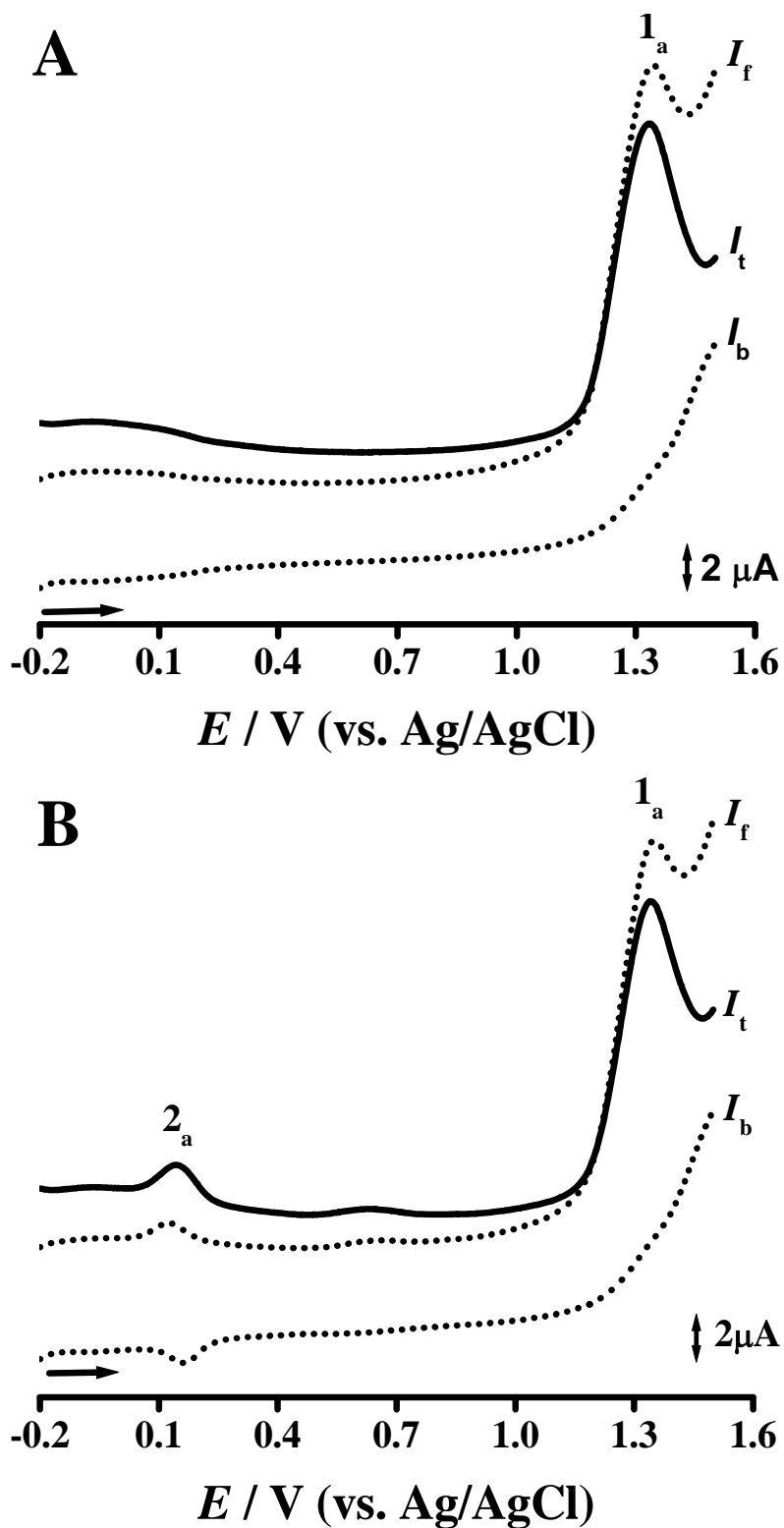


Figura 5.7 Voltamogramas de SW obtidos numa solução $500 \mu\text{M}$ CLD em $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato $0,1 \text{ M}$): (A) primeiro e (B) segundo varrimento; I_t – corrente total, I_f – corrente direta e I_b – corrente inversa; $v_{\text{ef}} = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

A oxidação do produto da CLD, pico anódico 2_a mostrou ser um processo reversível. A reversibilidade deste pico é confirmada pela separação da corrente total nas suas componentes – direta e inversa – obtida na mesma solução, sem a limpeza da superfície GCE, **Fig. 5.7B**. Neste caso, as componentes de oxidação e de redução do pico 2_a são iguais.

Resultados semelhantes foram obtidos numa solução de CLF.

1.2 Mecanismo de oxidação

A oxidação de CLD é um processo irreversível, envolvendo a transferência de dois elétrons e dois prótons, produzindo um produto final hidroxilado, **Fig. 5.8**.

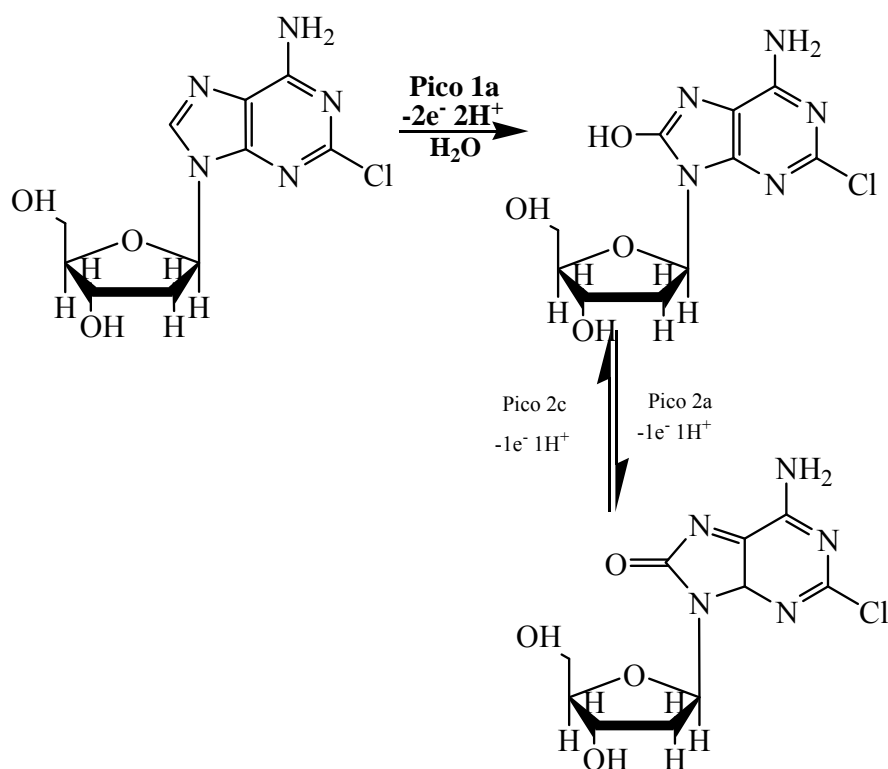


Figura 5.8. Mecanismo de oxidação proposto para a CLD

O centro eletroativo é o núcleo da adenina. O produto hidroxilado também sofre oxidação num processo reversível, pico 2_a, envolvendo a transferência de um elétron e um próton.

Tal como a CLD, A CLF apresenta uma oxidação irreversível, envolvendo a transferência de dois elétrons e dois prótons para produzir um catião radical, que sofre hidrólise e produz um produto final hidroxilado, **Fig. 5.9**.

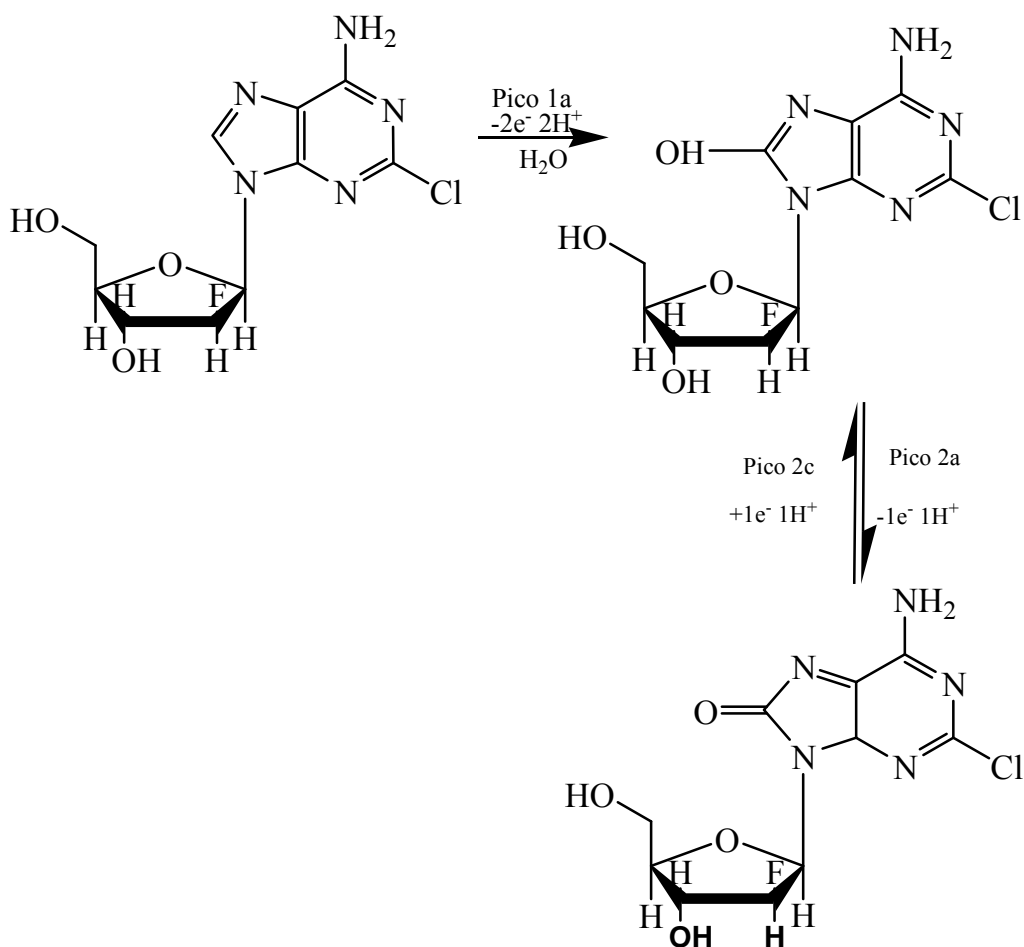


Figura 5.9. Mecanismo de oxidação proposto para a CLF

Portanto, conclui-se que os análogos de purina apresentam um mecanismo de oxidação semelhante entre si.

2. INTERAÇÃO DA CLD E CLF COM O DNA

A CLD como a CLF apresentam comportamento eletroquímico semelhante, mas a CLF o análogo da adenina com maior estabilidade, e é mais difícil de oxidar, apresentando um potencial de oxidação mais elevado. A caracterização do mecanismo de interação destes dois análogos de adenina com DNA virá a clarificar os mecanismos de atuação em aplicações antineoplásicas.

As interações da CLD e da CLF com o DNA foram estudadas por voltametria de DP usando o GCE, não só em soluções incubadas, como através do uso de biossensores eletroquímicos de dsDNA, de poly [G] e de poly [A].

2.1 Soluções incubadas de CLD-dsDNA e CLF-dsDNA

Em todas as experiências, diferentes concentrações de CLD e CLF foram incubadas com $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA em $\text{pH} = 4,5$ (tampão acetato $0,1 \text{ M}$) durante diferentes períodos de tempo. Após o fim de cada incubação as amostras CLD-dsDNA e CLF-dsDNA foram avaliadas eletroquimicamente. Depois de cada medida voltamétrica, a superfície do GCE foi limpa para evitar a diminuição das correntes de oxidação devida à forte adsorção na superfície do eletrodo de cada um dos compostos.

Soluções de control de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, $2 \mu\text{M}$ CLD e $2 \mu\text{M}$ CLF também foram preparadas em tampão e analisadas após os mesmos períodos de tempo que as soluções CLD-dsDNA e CLF-dsDNA incubadas.

Os efeitos da interação destas moléculas com o DNA foram seguidos eletroquimicamente comparando as mudanças do pico de oxidação da CLD e da CLF na presença e na ausência do DNA. Também foram monitorizadas as mudanças dos picos característicos de oxidação do DNA, desoxiguanosina (dGuo), a $+ 1,03 \text{ V}$, e desoxiadenosina (dAdo), a $+ 1,28 \text{ V}$, na presença e na ausência dos análogos de

adenina, assim como a ocorrência do produto de oxidação da guanina, a 8-oxoGua, a um potencial igual + 0,45 V vs Ag/AgCl a pH = 4,5, ou o produto de oxidação da adenina, a 2,8-DHA.

Após a adição de CLD à solução dsDNA, o voltamograma DP imediatamente registado mostrou três picos, um que corresponde à oxidação de CLD, a $E_{pa} = + 1,34$ V e os outros dois picos de oxidação correspondentes às bases purínicas dsDNA, desoxiguanosina, dGuo, a $E_{pa} = + 0,98$ V, e desoxiadenosina, dAdo, a $E_{pa} = + 1,24$ V,

Fig. 5.10A.

O mesmo se verificou para incubações de CLF em dsDNA, o aparecimento dos picos da CLF, a $E_{pa} = + 1,36$ V e dois picos de oxidação das bases, desoxiguanosina, dGuo a $E_{pa} = + 0,98$ V e desoxiadenosina, dAdo, a $E_{pa} = + 1,24$ V, **Fig. 5.10B.** Com o aumento do tempo de incubação, as correntes de picos da dGuo e da dAdo diminuiram,

Fig. 5.10.

Esta diminuição indica que a estrutura morfológica do dsDNA foi alterado devido à condensação e/ou agregação, **Fig. 5.10A.**

Formou-se uma estrutura de DNA condensada mais rígida, com uma maior dificuldade para a passagem de elétrons a partir de resíduos de purinas, levando a menores correntes de pico.

Todavia, nenhum pico adicional correspondente aos produtos de oxidação da guanosina, 8-oxoGua, ou da adenosina, 2,8-oxoAde, foi observado, ou seja, esta molécula não causou danos oxidativos no DNA. O mesmo comportamento foi observado para a CLF, **Fig. 5.10B.**

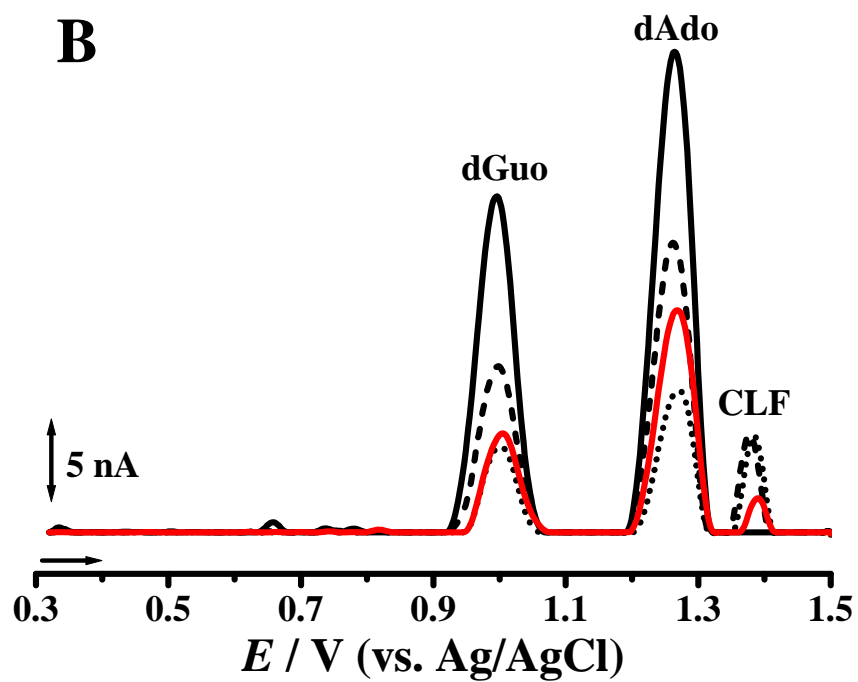
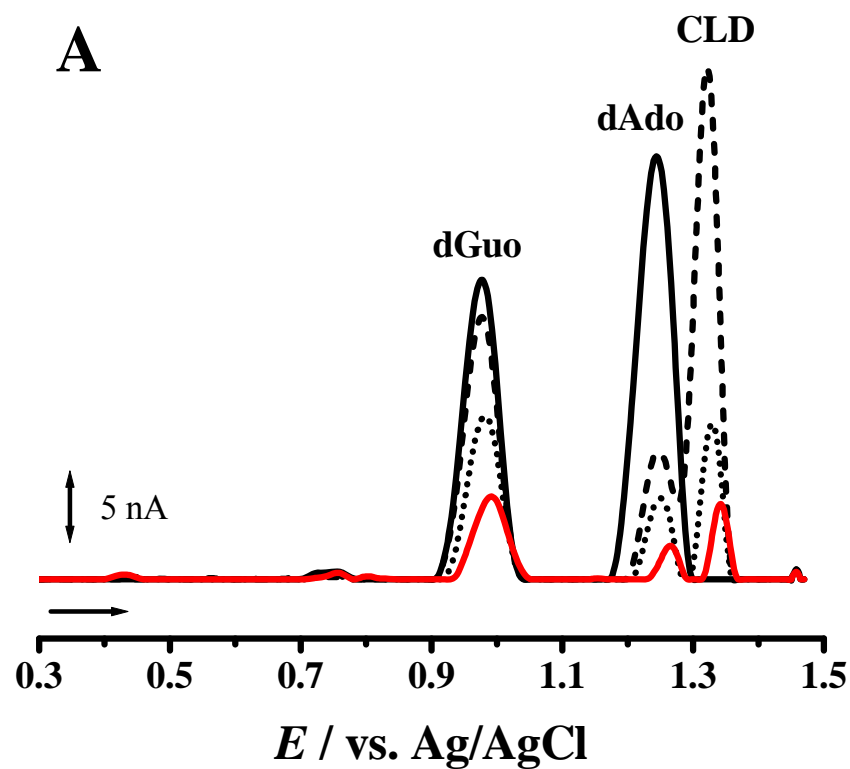


Figura 5.10 Voltamogramas de DP com correção de linha de base obtidos numa solução $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA a $\text{pH} = 4,5$ (tampão acetato $0,1 \text{ M}$) (—) controle e depois da incubação com: (A) $2 \mu\text{M}$ CLD; (B) $2 \mu\text{M}$ CLF durante: (---) 0 h, (···) 2 h e (—) 4 h.

2.2 Interação CLD e CLF com biossensores eletroquímicos com DNA

Para uma clarificação da interação entre a CLD e a CLF com o dsDNA, foi efetuado um biossensor eletroquímico de dsDNA multicamada. O biossensor dsDNA consiste num eletrodo com o DNA imobilizado sobre a sua superfície e permite a análise da interação *in situ*.

Sendo assim, o biossensor eletroquímico multicamada dsDNA foi preparado, como descrito na *secção 4.2 do capítulo 2*, e incubado em soluções de 250 μM CLD ou 100 μM de CLF durante diferentes períodos de tempo, e, de seguida foi transferido para o eletrólito de suporte em $\text{pH} = 4,5$ (tampão acetato 0,1 M), onde os voltamogramas DP foram registrados, **Fig. 5.11A**.

Antes de transferir para eletrólito suporte, o biossensor foi lavado cuidadosamente com água desionizada para remover CLD ou CLF livre. Desta forma, os picos observados nos voltamogramas DP são só devidos à interação entre a CLD ou a CLF e o dsDNA, **Fig. 5.11A**.

Os efeitos da interação CLD-dsDNA e CLF-dsDNA foram seguidos eletroquimicamente comparando as variações dos picos de oxidação das desoxiguanosina (dGuo) e desoxiadenosina (dAdo) e pelo monitoramento dos picos dos respectivos da CLD e da CLF.

Os voltamogramas de DP mostram que aumentando o tempo de incubação nas soluções CLD e CLF, ocorre uma diminuição dos picos de oxidação do dsDNA. Isto deve-se às alterações provocadas na estrutura do DNA, isto é, à sua condensação devido à interação com a CLD e a CLF. Para as condições experimentais utilizadas não ocorreu o aparecimento dos picos correspondentes à 8-oxoGua ou à 2,8-oxoAdo, ou seja, não ocorreu dano oxidativo na molécula do DNA.

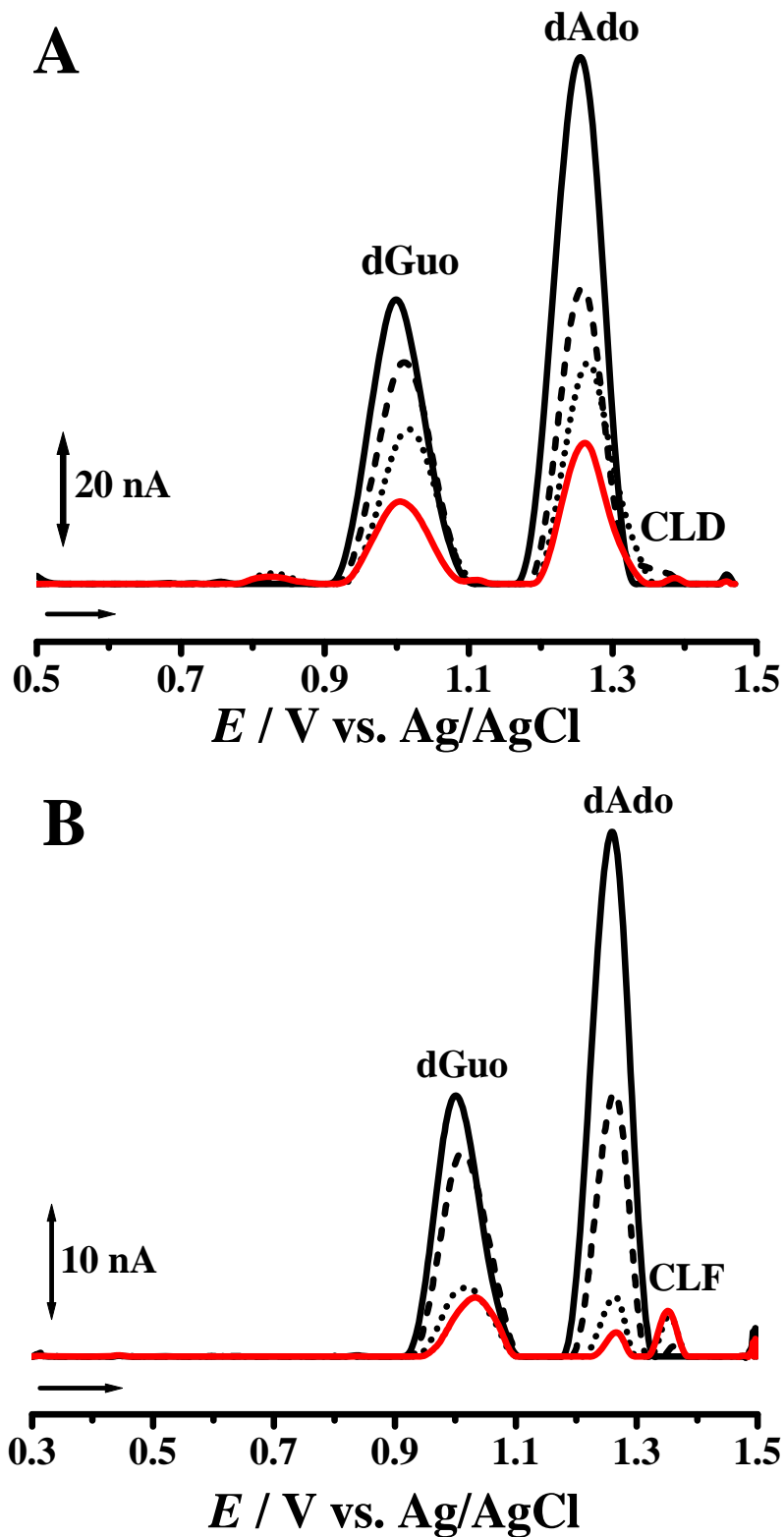


Figura 5.11. Voltamogramas de DP obtidos com linha de base corrigida a pH = 4,5 (tampão acetato 0,1 M) com um biossensor dsDNA (—) antes e após incubação durante (---) 5, (•••) 10 e (—) 15 min numa solução de: (A) 250 μ M CLD; (B) 100 μ M CLF.

De modo a obter-se mais informações sobre a interação entre CLD e CFL e dsDNA, a superfície do GCE foi modificada, conforme descrito na *Seção 4.2 do capítulo II*, com polirribonucleotídeos de sequências conhecidas, ou seja, com polihomorribonucleotídeos que contem apenas resíduos de guanina, poly [G] ou apenas resíduos de adenina, poly [A].

A superfície do GCE foi modificada com poly [G]. O voltamograma de DP obtido em pH = 4,5 (tampão acetato 0,1 M) mostra apenas um pico a $E_{pa} = + 0,98$ V, que corresponde à oxidação da dGuo, **Fig. 5.12A**.

Após a preparação de um novo biossensor poly [G], este foi incubado durante diversos períodos de tempo numa solução 250 μ M CLD e os voltamogramas de DP foram registados, **Fig. 5.12A**.

Estes resultados mostraram uma diminuição da corrente dos picos de oxidação correspondente ao poly [G] e à CLD, com o aumento do tempo de incubação.

Foram realizadas experiências com o biossensor poly [A] e o voltamograma de DP obtido mostrou um pico de oxidação a $E_{pa} = + 1.25$ V, correspondente à oxidação da dAdo, **Fig. 5.12B**.

Depois de diferentes tempos de incubação com diferentes biossensores de poly [A] numa solução 250 μ M CLD, os voltamogramas de DP mostraram uma diminuição da corrente dos picos de oxidação da poly [A] e da CLD com o aumento do tempo de incubação.

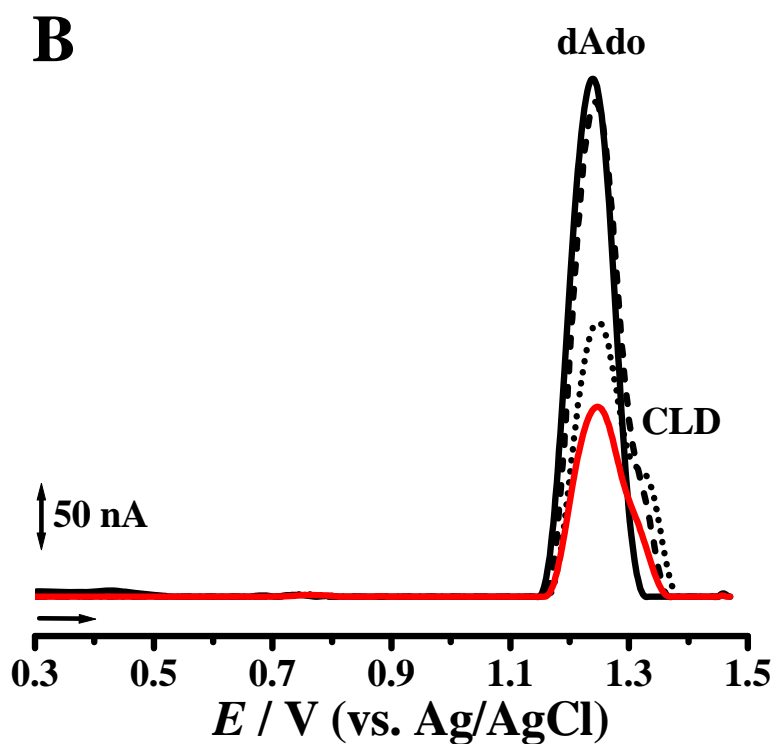
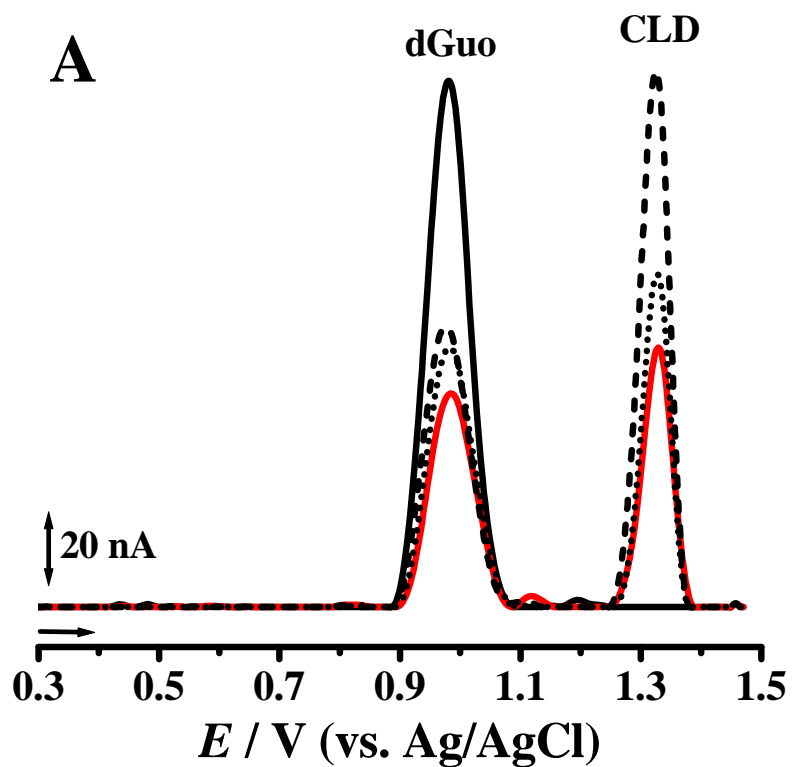


Figura 5.12. Voltamogramas de DP obtido numa solução de eletrólito de suporte em pH = 4,5 (tampão acetato 0,1 M) com os biossensores (A) poly [G] e (B) poly [A]: (—) antes e após incubação com 250 μ M CLD durante (---) 5, (•••) 10 e (—) 15 min.

Biossensores foram incubados em diversos períodos de tempo com uma solução 100 μM CLF. Em cada incubação foi efetuado um novo biossensor de multicamada,

Fig. 5.13.

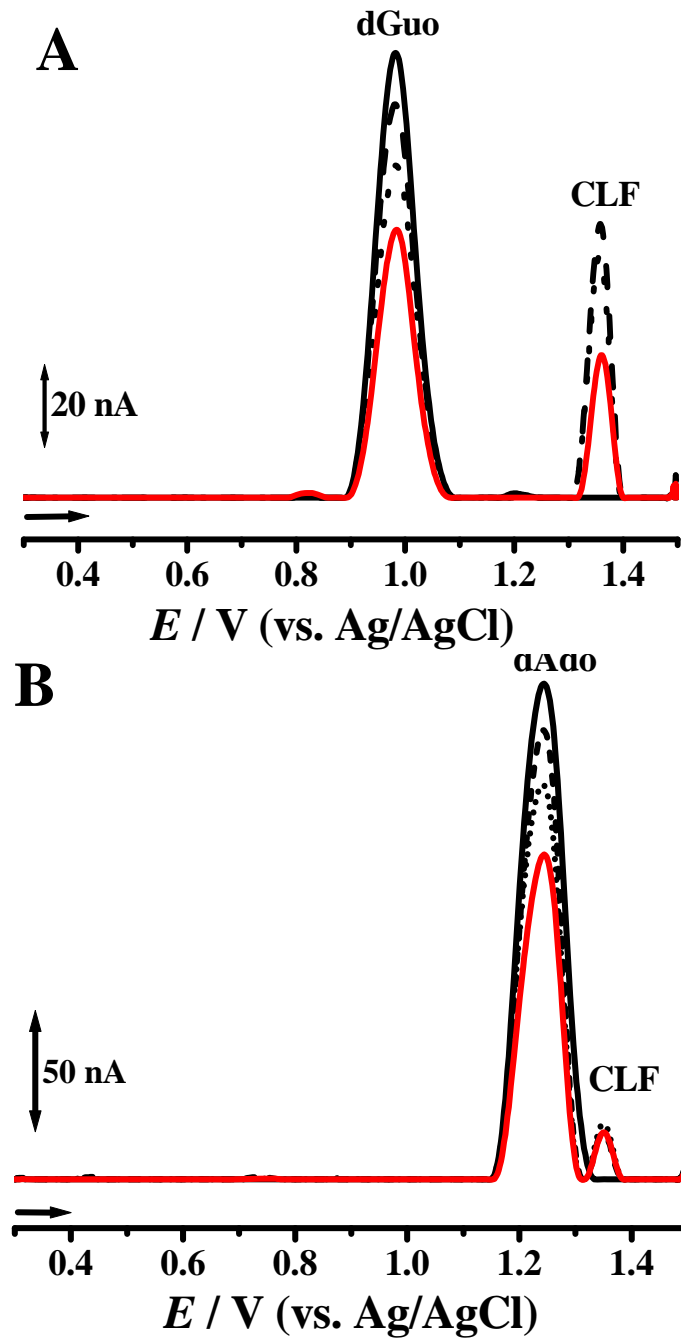


Figura 5.13 Voltamogramas DP obtido numa solução de eletrólito de suporte em $\text{pH} = 4,5$ (tampão acetato 0,1 M) com os biossensores (A) poly [G] e (B) poly [A]: (—) antes e após incubação numa solução 100 μM CLF durante: (---) 5, (---) 10 e (—) 15 min.

Os voltamogramas de DP obtidos, **Fig 5.13**, mostraram resultados semelhantes à interação CLF-dsDNA. Com os períodos de incubação crescentes, os picos de oxidação do poly [G], do poly [A] e da CLF diminuíram, **Fig. 5.13**.

Os resultados para a CLD e a CLF com os polihomorrribonucleotídeos mostraram que a interação CLD-dsDNA e a interação CLF-dsDNA não são seletivas e podem ocorrer em qualquer base purínica. Também não foram registados quaisquer picos adicionais correspondentes a possíveis danos oxidativo no DNA.

3. CONCLUSÃO

Ao longo deste trabalho investigaram-se os mecanismos redox de dois análogos de adenina, a CLD e a CLF, por intermédio de técnicas voltamétricas.

Ambos os fármacos, CLD e CLF, substâncias antineoplásicas são irreversivelmente oxidadas num GCE. A oxidação destes fármacos é dependente do pH e leva à formação de um produto hidroxilado que adsorve na superfície do eletrodo. A CLF foi concebida como um análogo de adenina com uma maior estabilidade, apresentando também um potencial de oxidação mais elevado que a CLD.

As interações CLD-dsDNA e CLF-dsDNA foram investigadas utilizando biossensores eletroquímicos de dsDNA, poly [A] e poly [G] e soluções incubadas com dsDNA, poly [A] e poly [G]. A diminuição dos picos das bases purínicas dGuo e dAdo com o aumento do tempo de incubação permite concluir que a CLD e a CLF interagem com o dsDNA. Todavia, não foi encontrada evidência de dano oxidativo no dsDNA. As interações CLF-dsDNA e CLD-dsDNA provocam a condensação da estrutura morfológica do dsDNA, não sendo específicas para um determinado tipo de base.

CAPÍTULO VI

ESTUDO ELETROQUÍMICO DE DERIVADOS DE ACRIDINA-TRIAZOL E INTERAÇÃO COM O DNA

Ao longo deste capítulo é investigado o comportamento eletroquímico de dois derivados de acridinas, o GL15 e o GL7, **Fig. 6.1**, em vários meios, a adsorção na superfície do eletródo e o mecanismo de transferência de electrões.

Dois derivados de acridina-triazol, designados como GL15 e GL7 **Fig. 6.1**, ligam-se com alta seletividade ao DNA telomérico [152], sendo de grande importância o estudo eletroquímico da interação destes dois derivados com o DNA.

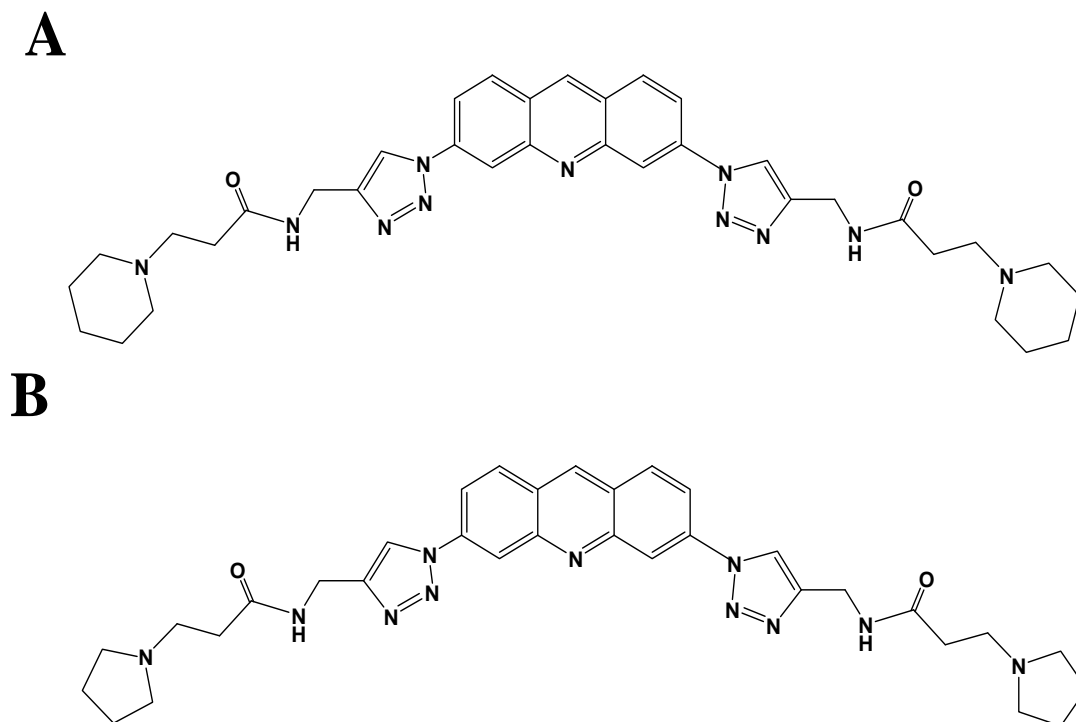


Figura 6.1 – Estrutura química de: **(A)** GL15 e **(B)** GL7

1. ESTUDO ELETROQUÍMICO

O comportamento eletroquímico dos derivados de acridina, GL15 e GL7, foi investigado numa ampla gama pH de eletrólitos de suporte diferentes, utilizando a CV, a voltametria de SW e a voltametria de DP na superfície do GCE.

CVs de uma solução 50 μM GL15 em $\text{pH} = 7,0$ (tampão de fosfato 0,1 M) foram registados num intervalo de potencial entre $-1,0$ V e $+1,1$ V, sempre a partir de $0,0$ V, **Fig. 6.2**, com direção inicial positiva. Durante os varrimentos do potencial, foi mantido um fluxo constante de N_2 sobre a solução, de modo a evitar a difusão do oxigénio existente atmosférico para o interior da solução. O mesmo procedimento foi efetuado para o composto GL7. Os resultados demonstraram que tanto o GL15, como o GL7 sofrem oxidação e redução à superfície do GCE.

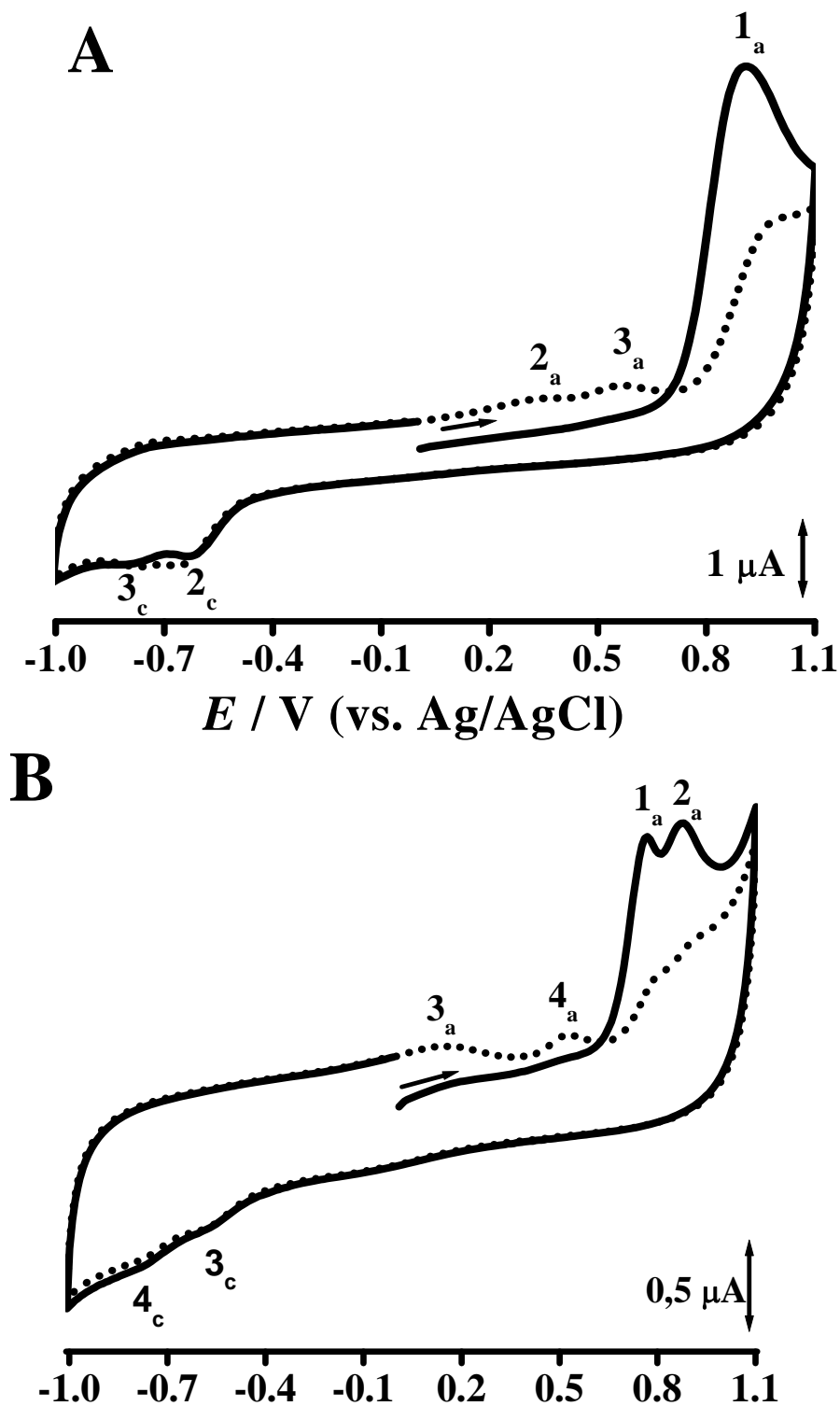


Figura 6.2 CVs obtidos na superfície do GCE em solução de eletrólito de suporte em pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M), saturada com N₂ de uma solução: (A) 50 μM GL15 e (B) 50 μM GL7, (—) primeiro e (•••) segundo varrimento a $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

No entanto, os processos redox ocorrem de forma independente, e, para uma melhor compreensão dos dois processos, a oxidação e a redução, foram investigados separadamente para cada molécula, GL15 e GL7.

1.1 Oxidação

Voltametria cíclica

A oxidação do GL15 foi estudada por CV para uma velocidade de varrimento de $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ numa solução $50 \text{ }\mu\text{M}$ GL15 preparada em $\text{pH} = 7,0$ (tampão de fosfato $0,1 \text{ M}$).

O primeiro CV obtido na solução de GL15, iniciado a $E_i = + 0,40 \text{ V}$ na direção anódica mostrou o aparecimento de um pico, pico 1_a , a $E_{p1a} = + 0,89 \text{ V}$, **Fig. 6.3**. Após a inversão do sentido do varrimento, a $E_{pa} = + 1,1 \text{ V}$, nenhum pico de redução foi observado, indicando que a oxidação de GL15 é um processo irreversível.

Foram registados varrimentos sucessivos, não se verificando a existência de novos picos, o que evidenciou que a oxidação do GL15 não envolve a formação de quaisquer produtos eletroativos. Contudo, os voltamogramas obtidos mostraram uma grande diminuição da corrente do pico 1_a com o aumento do número de varrimentos. Isto deve-se à adsorção dos produtos de oxidação do GL15 não eletroativos à superfície do GCE.

Do mesmo modo também foi estudada a oxidação de $50 \text{ }\mu\text{M}$ GL7 nas mesmas condições. O primeiro voltamograma mostrou dois picos irreversíveis, pico 1_a , a $E_{p1a} = + 0,76 \text{ V}$ e o pico 2_a , a $E_{p2a} = + 0,88 \text{ V}$.

Foi analisada a influência da velocidade de varrimento na corrente do pico de oxidação, pico 1_a , em soluções de GL15, preparadas diretamente em eletrólito de suporte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato $0,1 \text{ M}$). Os CVs foram registrados para diferentes velocidades de varrimento, entre 5 e 500 mV s^{-1} , **Fig. 6.3**.

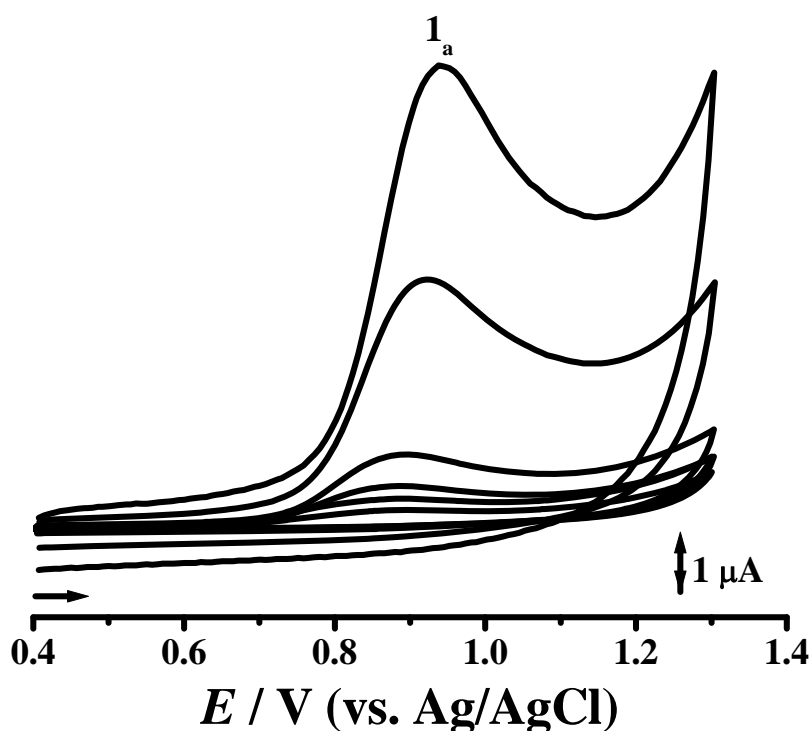


Figura 6.3 CVs obtidos numa solução $50 \mu\text{M}$ GL15 em $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato $0,1 \text{ M}$) para diferentes velocidades de varrimentos, $5, 10, 25, 50, 200$ e 500 mV s^{-1}

Entre cada medida voltamétrica a superfície do eletrodo foi sempre limpa de modo a evitar possíveis problemas devido à adsorção. Verificou-se que com o aumento da velocidade de varrimento ocorre uma variação do potencial do pico 1_a para valores mais positivos, confirmando assim mais uma vez a irreversibilidade deste processo e a corrente do pico 1_a aumentou linearmente, um comportamento específico das substâncias que adsorvem na superfície do eletrodo.

Isto poderá ser explicado, tendo em consideração que durante uma medida voltamétrica, a quantidade da espécie adsorvida é constante enquanto que a quantidade de material que difunde para a superfície do eléctrodo varia com o tempo. Em consequência do aumento da velocidade de varrimento ocorre a diminuição dos compostos que difundem da solução e que podem ser oxidados.

A influência do pH na oxidação de GL15 e GL7

A influência do pH na oxidação de GL15 e GL7 foi estudada em diferentes eletrólitos de suporte numa faixa de pH entre 2 e 12 usando a voltametria de DP, **Fig. 6.4 e Fig. 6.5**. Os voltamogramas foram obtidos em soluções 4 μM GL15 e 10 μM GL7 preparadas em diferentes eletrólitos com força iónica de 0,1 M.

Foi verificado para GL15 apenas um pico anódico, pico 1_a, que ocorre em todos os eletrólitos de suporte, **Fig. 6.4A**. O potencial do pico 1_a foi deslocado para valores mais negativos com o aumento de pH. O declive da reta do gráfico do E_{p1a} em função do pH foi de 59 mV por unidade de pH, **Fig. 6.4B**, mostrando que o mecanismo desta oxidação é um processo que envolve o mesmo número de eletrões e protões.

A largura a meia altura do pico 1_a, $W_{1/2} \sim 90$ mV, próximo do teórico, corresponde a uma reação eletroquímica, envolvendo a transferência de um eletrão [208]. A oxidação de GL15 ocorre com a transferência de um eletrão e de um protão.

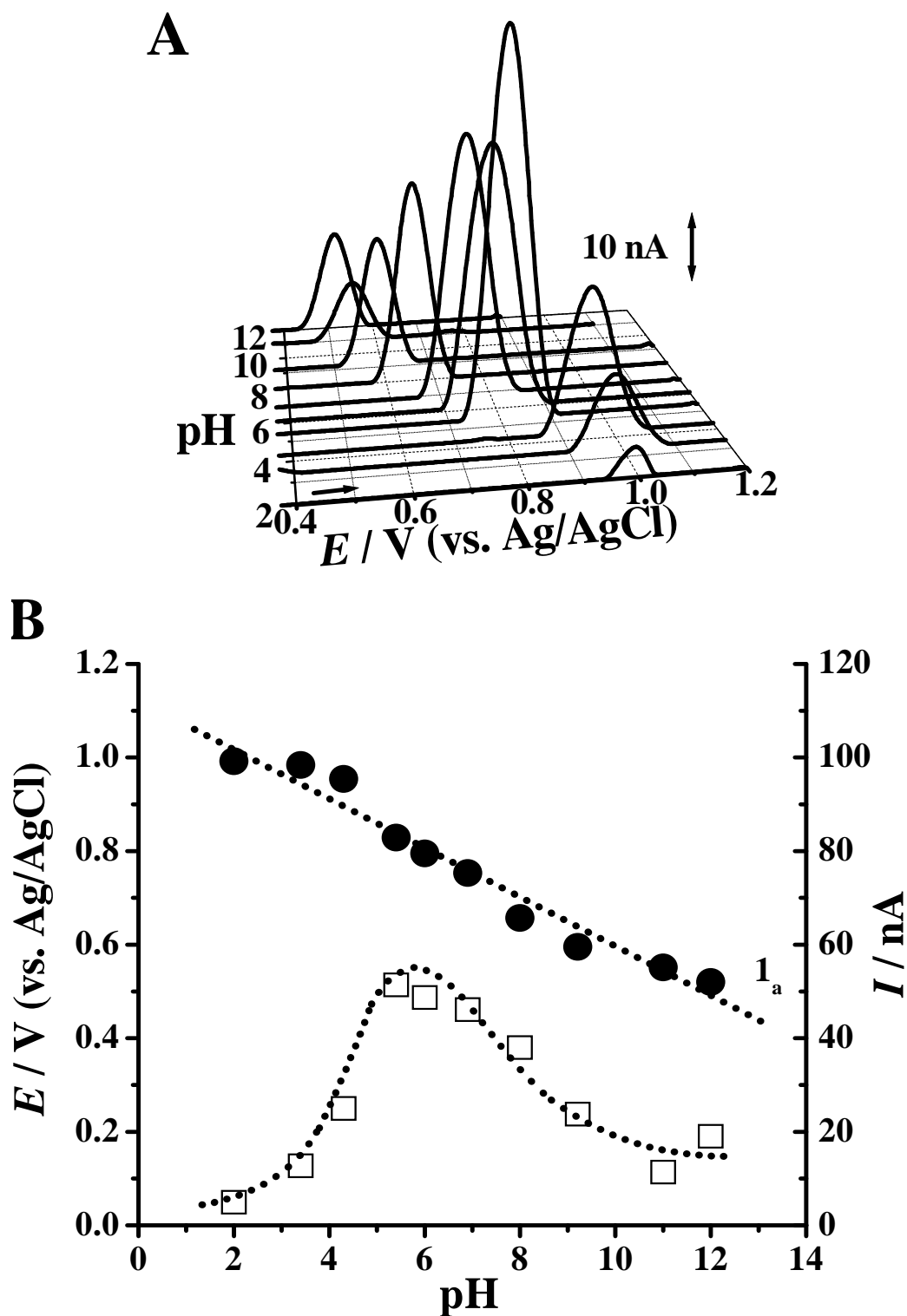


Figura 6.4 – (A) Gráfico 3D de voltamogramas de DP obtidos em eletrólitos de diferentes valores de pH numa solução 4 μ M GL15; (B) Gráfico da variação de E_{p1a} (●) e I_{p1a} (□) em função do pH.

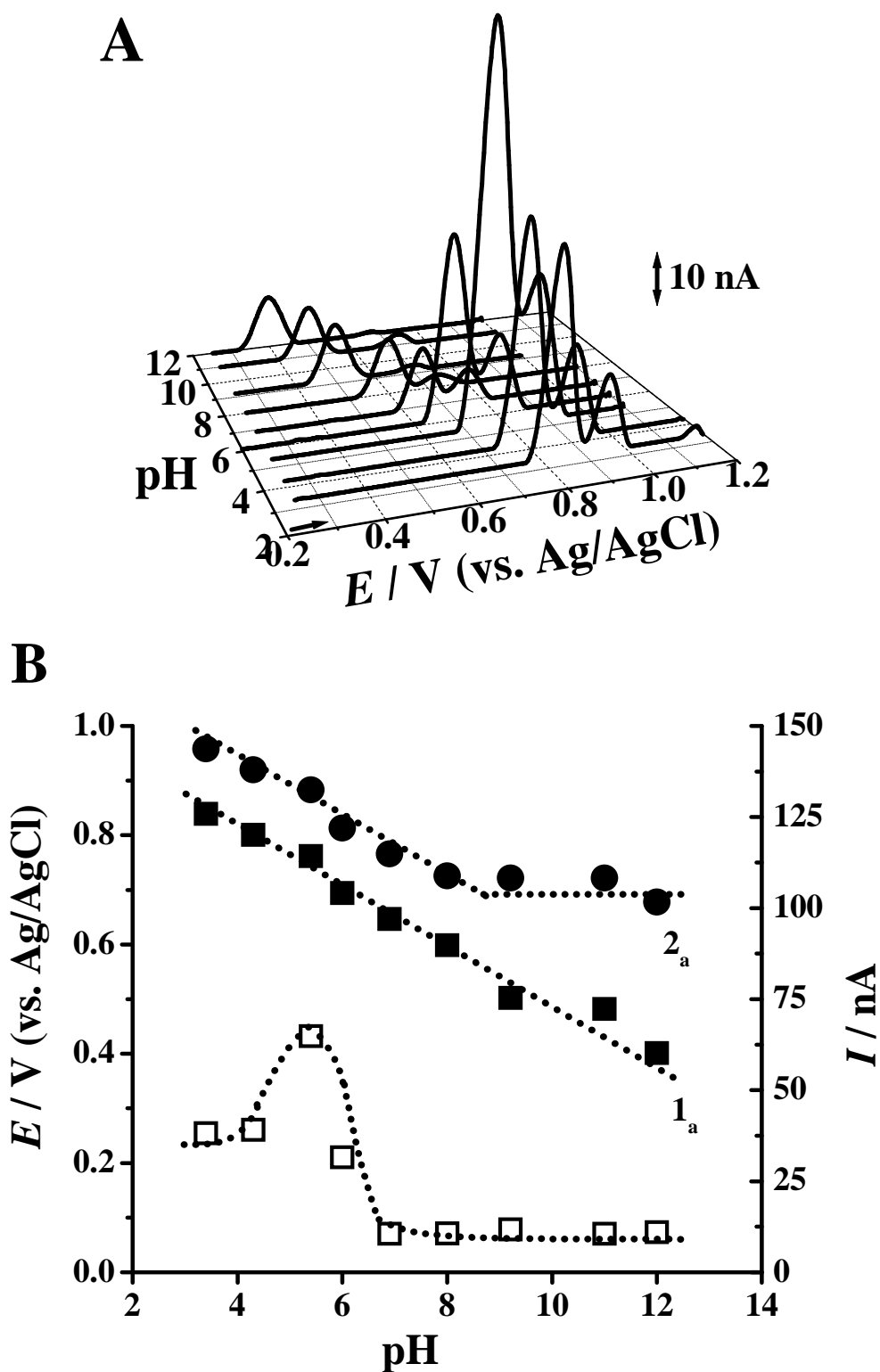


Figura 6.5 – (A) Gráfico 3D de voltamogramas de DP obtidos em eletrólitos de diferentes valores de pH numa solução 10 μ M GL7; (B) Gráfico da variação do E_{pa} do: (■) pico 1_a e (●) pico 2_a e I_{pa} (□) do pico 1_a em função do pH.

Tal como foi observado para a molécula de GL15, também os picos de oxidação do GL7, pico 1_a e pico 2_a, ocorreram em todos os eletrólitos de suporte na faixa de pH utilizada, e o potencial dos picos diminui com o aumento de pH, **Fig. 6.5A**.

A inclinação da reta da linha pontilhada do gráfico E_{p1a} em função do pH, 59 mV por unidade de pH, **Fig. 6.5B**, mostra que estão envolvidos no mecanismo de oxidação o mesmo número de elétrões e protões. Sendo a largura a meia altura $W_{1/2} = 60$ mV, a oxidação do pico 1_a do GL7 ocorre com transferência de 2 elétrões e 2 protões.

1.2 Redução

Voltametria Cíclica

A redução foi investigada por CV no intervalo de potencial de $-1,00$ V a $+0,75$ V, a iniciar em $0,0$ V na direção negativa, sendo a velocidade varrimento $v = 100$ mV s⁻¹, numa solução 30 μM GL15 e noutra 30 μM GL7 num eletrólito de suporte de pH = $6,0$ (tampão de fosfato $0,1$ M).

Todas as soluções foram sempre saturadas com N₂ antes do início dos CVs e também no decorrer das experiências voltamétricas foi mantido um fluxo constante de N₂ à superfície da solução, de modo a evitar a difusão do oxigénio atmosférico para o interior das soluções de GL15 ou GL7.

Os voltamogramas obtidos na solução de GL15 mostraram dois picos catódicos, pico 2_c, a $E_{p2c} = -0,47$ V e pico 3_c, a $E_{p3c} = -0,76$ V, **Fig. 6.6**, ao inverter a direção do varrimento, ocorre o aparecimento dos correspondentes picos anódicos, pico 2_a, a $E_{p2a} = +0,23$ V e pico 3_a, a $E_{p3a} = +0,52$ V. A diferença $|E_{p2c} - E_{p2a}| = \sim 0,7$ V e

$|E_{p3c} - E_{p3a}| = \sim 1,28 \text{ V}$, indica a quasi-reversibilidade da redução do GL15 para estes processos.

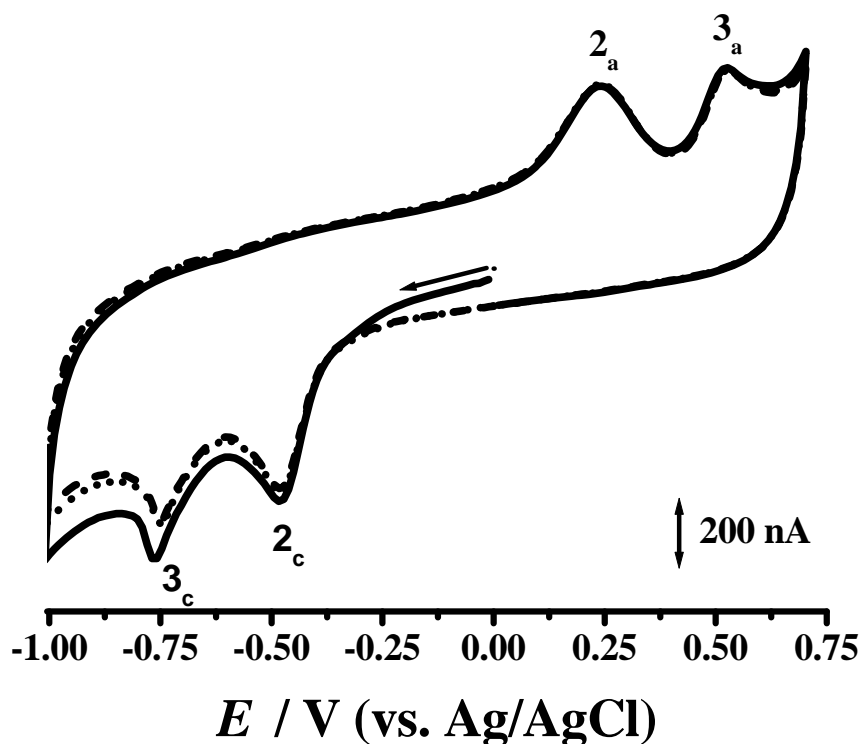


Figura 6.6 – CVs obtidos numa solução 30 μM GL15 em $\text{pH} = 6,0$ (tampão acetato 0,1 M), saturada com N_2 : (—) primeiro, (•••) segundo e (---) terceiro varrimento, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

A redução do GL7 foi muito semelhante à do GL15. No voltamograma obtido, na parte negativa de potencial, observaram-se dois picos catódicos, pico 3_c, a $E_{p3c} = -0,53 \text{ V}$ e pico 4_c, a $E_{p4c} = -0,77 \text{ V}$. Mais uma vez, invertendo-se a direção de varrimento, os correspondentes picos anódicos apareceram, pico 3_a, a $E_{p3a} = +0,18 \text{ V}$ e pico 4_a, a $E_{p4a} = +0,47 \text{ V}$.

Foram efectuados varrimentos sucessivos, sem limpeza da superfície do GCE, tendo-se verificado que ocorre uma pequena diminuição da intensidade de corrente dos picos de redução, pico 2_c e pico 3_c, sendo a diminuição atribuída à adsorção de GL15 ou GL7 e dos seus produtos não eletroativos na superfície do GCE.

Voltametria de impulso diferencial e o efeito do pH

A redução dos derivados de acridina-triazol, GL15 e GL7, foi investigada por voltametria de DP em soluções de eletrólito de suporte entre $2 < \text{pH} < 12$, em soluções saturadas com N_2 , Fig. 6.7.

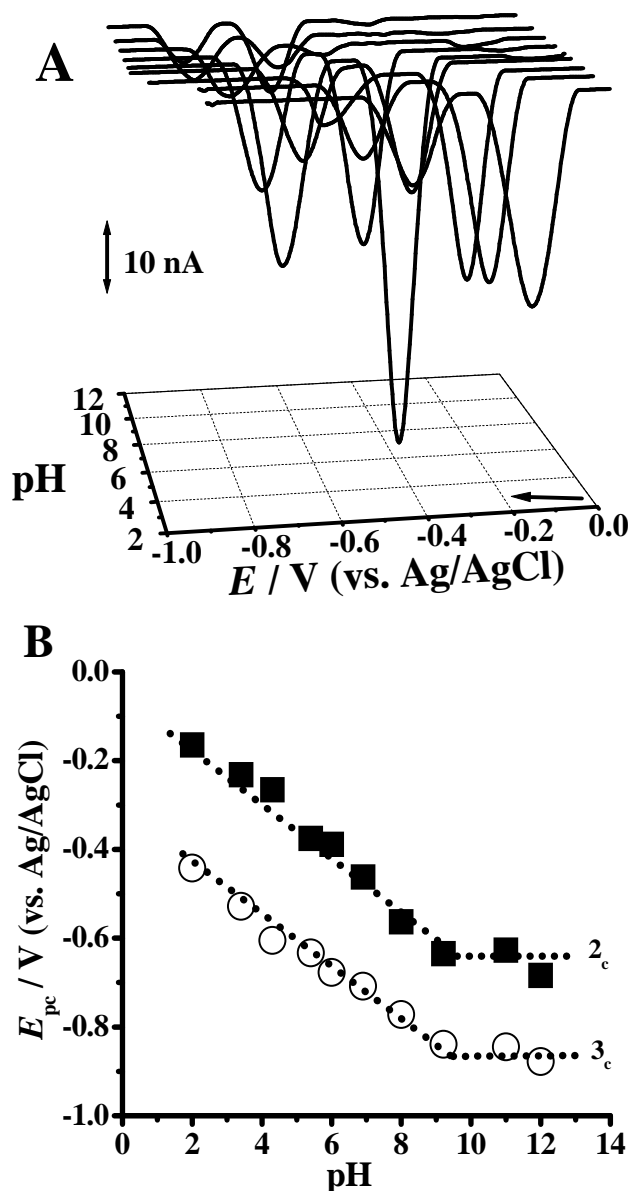


Figura 6.7 – (A) Gráfico 3D de voltamogramas de DP obtidos em eletrólitos de diferentes valores de pH numa solução $10 \mu\text{M}$ GL15, saturada com N_2 ; (B) Gráfico da variação do: E_{p2c} (■) e E_{p3c} (○) em função do pH.

Os voltamogramas de DP de 10 μM GL15 mostraram dois picos de redução, pico 2_c e pico 3_c em todos os eletrólitos de suporte. Para $\text{pH} < 9$, ambos os potenciais dos picos foram deslocados para valores mais negativos com o aumento de pH , **Fig. 6.7A**.

A dependência segue a relação $E_{p2c} (\text{V}) = -0.042 - 0.060 \text{ pH}$, para o pico 2_c, e $E_{p3c} (\text{V}) = -0.021 - 0.060 \text{ pH}$ para o pico 3_c, **Fig. 6.7B**, indicando que o mecanismo de redução para os dois picos ocorre com a transferência do mesmo número de elétrons e prótons. Para o pico 2_c, a largura a meia altura é $W_{1/2} \sim 90 \text{ mV}$ e para o pico 3_c, $W_{1/2} \sim 103 \text{ mV}$, corresponde à transferência de um elétron e um próton. Nas soluções com pH superior a 9,2, não se verificou qualquer dependência do potencial dos picos 2_c e 3_c em relação ao pH . Para eletrólitos muito alcalinos o mecanismo de reação envolve apenas a transferência de um elétron. O produto de redução do GL15 pode sofrer desprotonação em eletrólitos alcalinos [219], tendo sido determinado o valor de $\text{pK}_a \approx 9$ para GL15.

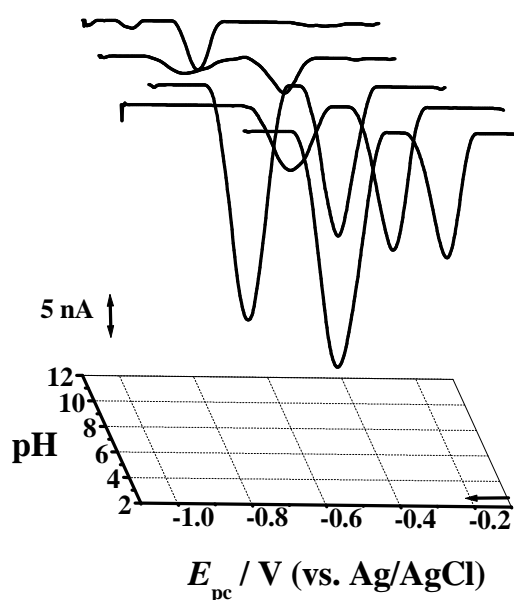


Figura 6.8 – Gráfico 3D de voltamogramas de DP com linha de base corrigida em função do pH do eletrólito de suporte, de uma solução de 10 μM GL7 saturada com N_2 .

Os resultados obtidos por voltametria de DP para uma solução 10 μM GL7 mostraram dois picos de redução, pico 3_c e pico 4_c, **Fig. 6.8**. Estes dois picos de redução apresentam uma dependência linear do potencial dos picos com o pH, o E_{p3c} (V) = - 0.072 - 0.060 pH para o pico 3_c ($W_{1/2} \sim 82$ mV), e E_{p4c} (V) = - 0.32 - 0.060 pH para o pico 4_c ($W_{1/2} \sim 116$ mV), indicando que o mecanismo de redução nos dois picos ocorre com a transferência de um elétron e um próton.

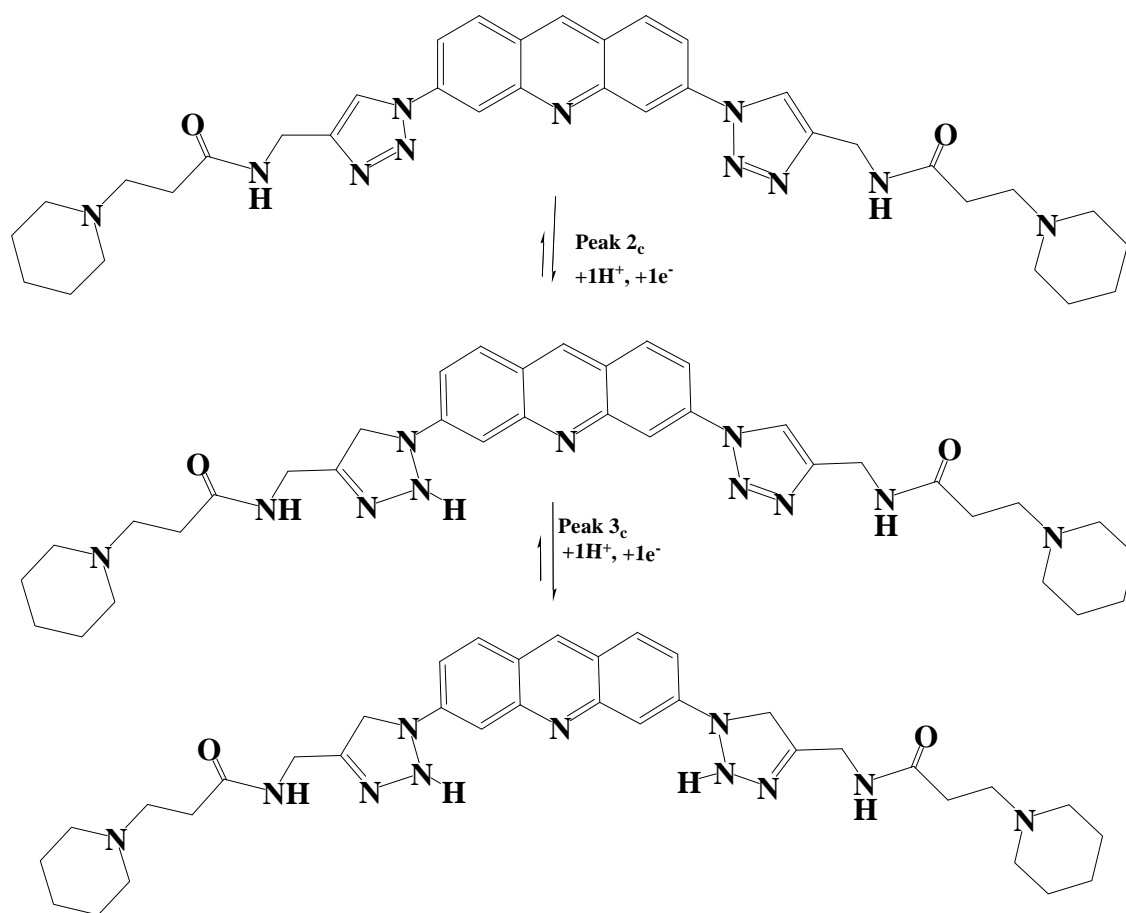


Figura 6.9 – Mecanismo proposto para a redução do GL15.

A redução do GL15 dos grupos amino ocorre em duas etapas, com a transferência de um elétron e um próton, **Fig. 6.9**.

2. INTERAÇÃO DOS COMPOSTOS GL15 E CL7 COM O DNA

Estes novos compostos de acridina-triazol são pequenas moléculas capazes levar à morte celular as células cancerígenas [234-237], e é portanto fundamental um estudo da interação destas moléculas com o DNA.

A interação do dsDNA com os derivados de acridina-triazol, GL15 e GL7, foi investigada não só em soluções incubadas, como através do uso de biossensores eletroquímicos de dsDNA, de poly [G] e de poly [A]. Os efeitos da interação GL15-dsDNA e GL7-dsDNA foram seguidos eletroquimicamente comparando as variações dos picos de oxidação nos biossensores de dsDNA, de desoxiguanosina (dGuo), a + 0,92 V, e da desoxiadenosina (dAdo), a + 1,17 V, e pelo monitoramento do aparecimento do produto de oxidação da guanina e/ou adenina a + 0,37 V vs Ag/AgCl a pH fisiológico, pH = 7,0.

2.1 Soluções incubadas de GL15-dsDNA e GL7-dsDNA

De modo a investigar a possível: quebra nas pontes de hidrogénio, mudanças conformacionais na estrutura da dupla hélice do DNA e em indução de danos oxidativos no DNA, foi utilizada voltametria de DP em pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M).

A fácil protonação de derivados de acridina a pH fisiológico é conhecida por ter uma influência na sua atividade antimicrobiana [146] e na interação com o DNA [167].

O voltamograma de DP da solução de controlo do dsDNA mostrou dois picos, que correspondem à oxidação de desoxiguanosina (dGuo), a $E_{pa} = + 0,92$ V, e desoxiadenosina (dAdo), a $E_{pa} = + 1,17$ V, **Fig. 6.10**.

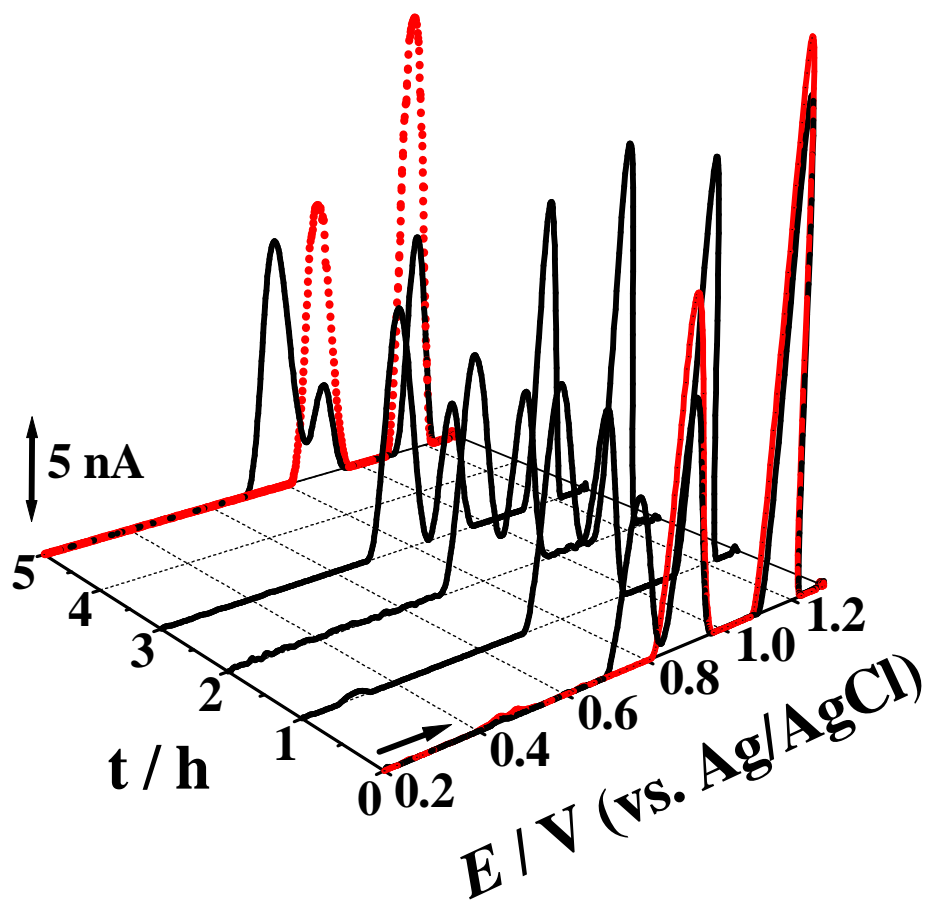


Figura 6.10 – Voltamogramas de DP obtidos em pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M) para: uma solução control 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA (—) 0 h e (···) depois de 5 h; uma solução 4 μM GL15 incubada com 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA durante (—) 0, 1, 2, 3 e 5 h.

Os voltamogramas de DP obtidos em soluções incubadas, conforme descrito na Seção 4.2 do Capítulo II, foram registados após diferentes períodos de incubação, 0 h, 2 h, 3 h e 5 h. A superfície GCE foi sempre limpa entre cada medição para evitar o bloqueio da superfície por adsorção de espécies eletroativas ou dos seus produtos de oxidação.

O voltamograma de DP obtido imediatamente após a adição 4 μM GL15 a uma solução 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA mostrou três picos anódicos, dois picos correspondentes à oxidação das bases purínicas do dsDNA, dGuo, a $E_{\text{pa}} = + 0,91$ V, e dAdo, a

$E_{pa} = + 1,17 \text{ V}$, e um terceiro pico de oxidação relativo à oxidação do GL15, a $E_{pa} = + 0,77 \text{ V}$, **Fig. 6.10**.

Ao aumentar o tempo de incubação, verificou-se que as correntes dos picos correspondentes à oxidação da dGuo e da dAdo diminuíram em comparação com os resultados obtidos na solução de controlo do dsDNA. Isso indica que o dsDNA se condensa após a interação GL15-DNA e consequentemente a transferência do eletrão para a superfície do elétrodo torna-se mais difícil, explicando a diminuição dos picos de oxidação do dGuo e do dAdo.

Não foram observados quaisquer picos adicionais, tais como os biomarcadores 8-oxoGua ou 2,8-oxoAde, produtos de oxidação da dGuo ou dAdo, podendo concluir-se que nas condições experimentais utilizadas, o GL15 interage com o dsDNA mas não causa danos oxidativos no DNA.

2.2 Interação GL15 e GL7 com biossensores eletroquímicos com DNA

A interação entre derivados de acridina-triazol, GL15 e GL7, e o dsDNA foi investigada usando biossensores eletroquímicos com dsDNA multicamada, de poly [G] e de poly [A].

O biossensor eletroquímico de dsDNA consiste num elétrodo imobilizado com DNA na sua superfície. Com os biossensores de dsDNA multicamada a superfície do GCE está completamente coberta com o filme de dsDNA imobilizado e não permite nenhuma interação não específica, apenas a deteção da interação entre GL15 e GL7 com o filme de dsDNA.

As alterações causadas *in situ* no dsDNA imobilizado na superfície do elétrodo durante a interação com GL15 foram seguidas em tempo real por voltametria de DP

usando um biossensor eletroquímico de multicamada dsDNA, preparado como descrito na Secção 4.2 do Capítulo II.

O biossensor dsDNA foi incubado durante 3 min numa solução 50 μ M GL15, de seguida, lavou-se cuidadosamente com água desionizada, e o biossensor foi transferido para o eletrólito de suporte, em pH = 7,0, onde o voltamograma de DP foi registado, **Fig. 6.11**. O voltamograma de DP mostrou o pico de oxidação do GL15 seguido pelos picos de oxidação das bases da guanina e adenina do dsDNA.

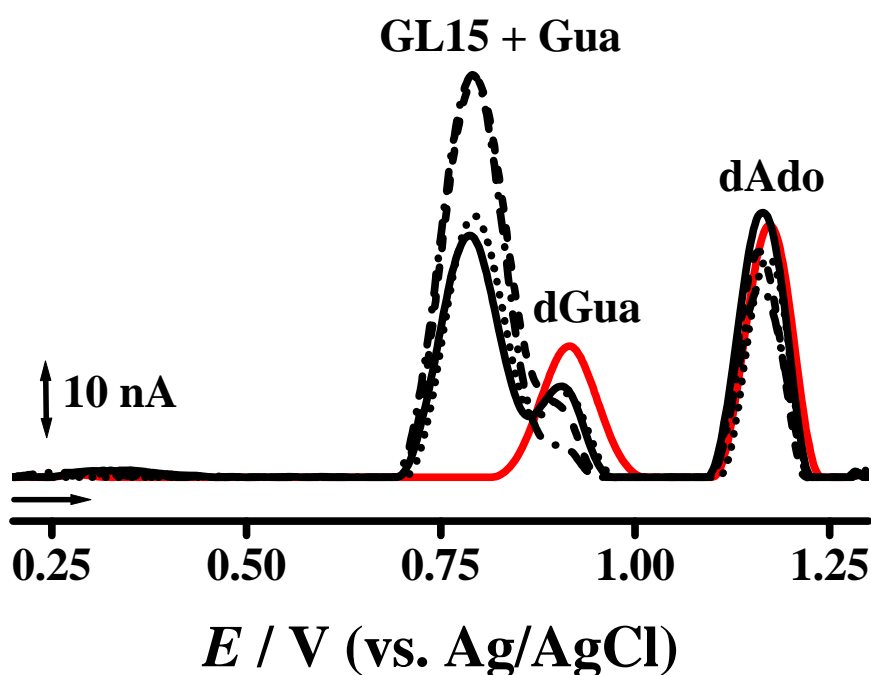


Figura 6.11 – Voltamogramas de DP obtidos em solução de eletrólito de suporte em pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M) de biossensores eletroquímicos de dsDNA (—) antes e depois da incubação, durante: (—) 3, (•••) 5, (---) 7 e (-·-·-) 10 min numa solução 50 μ M GL15.

Esta experiência foi repetida, usando sempre um novo biossensor eletroquímico de dsDNA mas variando o tempo de incubação, 5, 7 e 10 min.

Os resultados mostraram uma diminuição progressiva dos picos de oxidação das bases do dsDNA com o aumento do tempo de incubação. O decréscimo da corrente dos

picos de oxidação da dGuo e da dAdo corresponde à condensação da estrutura morfológica do dsDNA. O pico de oxidação de GL15 aumentou com o tempo devido à incorporação e pré-concentração no filme de DNA.

Estes resultados encontram-se em concordância com os resultados obtidos com as soluções incubadas.

As experiências mostraram os mesmos resultados para o GL15 e o GL7, que interagem e se ligam à cadeia dupla do DNA, não sendo visível nenhuma evidência de dano oxidativo do DNA, pois não há o aparecimento dos picos correspondentes à 8-oxoGua ou à 2,8-oxoAdo.

Para obter mais informações sobre a natureza da interação entre o GL15 e o dsDNA, foram realizadas experiências semelhantes usando biossensores eletroquímicas de polirribonucleótidos de sequências conhecida, poly [G] e poly [A].

O biossensor eletroquímico de controlo de poly [A] mostrou a oxidação da dAdo, a $E_{pa} = + 1,15$ V, **Fig. 6.12A**. Os biossensores poly [A] foram incubados numa solução 50 μ M GL15 durante diferentes períodos de tempo. O pico correspondente à oxidação da dAdo manteve-se constante e o pico de oxidação do GL15 diminuiu com o aumento do tempo de incubação, **Fig. 6.12A**.

O biossensor eletroquímico de poly [G] de controlo mostrou a oxidação de dGuo, a $E_{pa} = + 0,91$ V, **Fig. 6.12B**.

Os biossensores poly [G] foram incubados em 50 μ M GL15 e os voltamogramas obtidos mostraram que o pico de oxidação da guanina, dGuo diminuiu, enquanto que o pico de GL15 aumentou, com o aumento do tempo de incubação. Este aumento da corrente do pico de GL15 é explicado pela ocorrência de guanina livre proveniente do DNA, a $E_{pa} = + 0,70$ V, o mesmo potencial da oxidação de GL15.

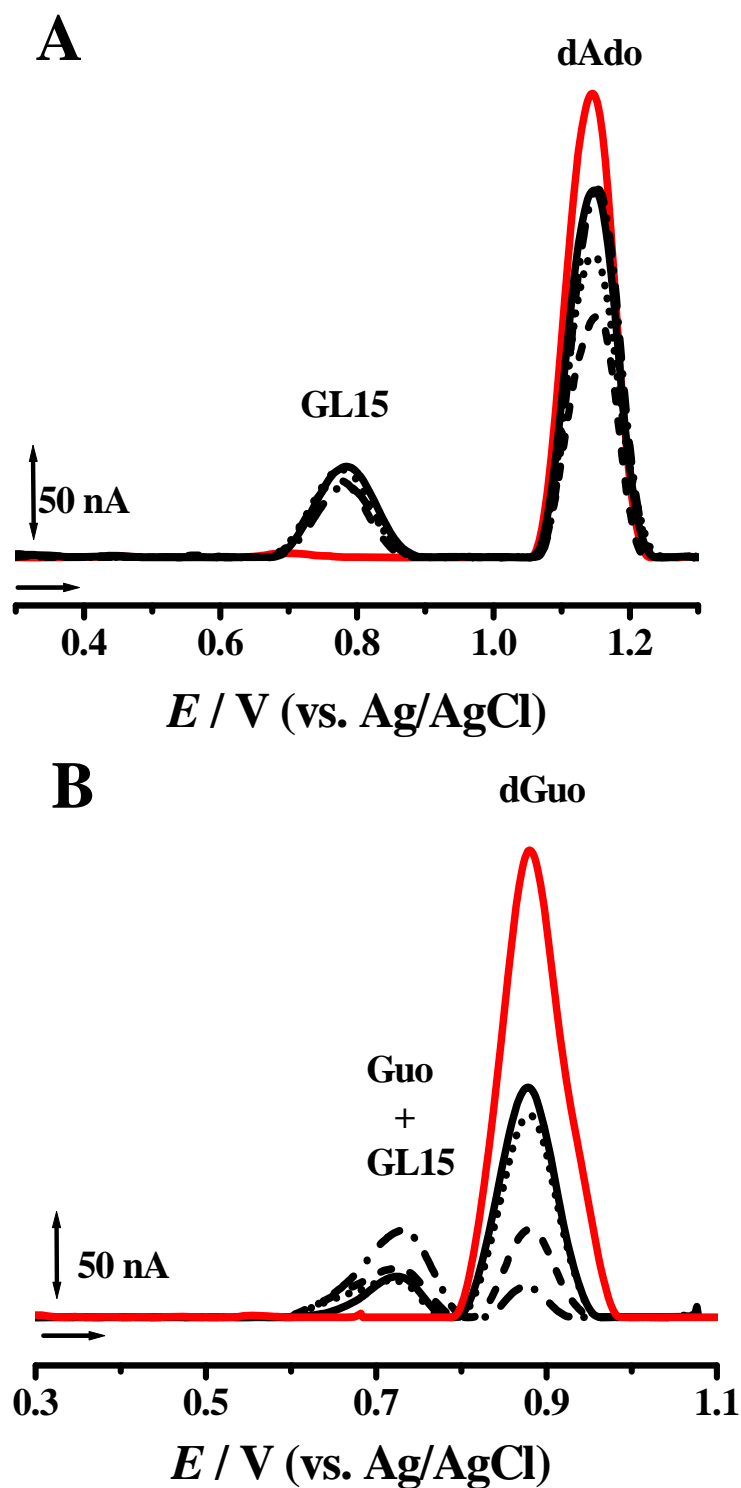


Figura 6.12 – Voltamogramas de DP obtidos em pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M) para biossensores eletroquímicos de: (A) poly [A] e (B) poly [G] (—) antes e depois da incubação: (—) 3, (•••) 5, (---) 7 e (-••••) 10 min com uma solução 50 μ M GL15.

Um comportamento semelhante foi obtido para a interação do GL7 com o biossensor eletroquímico de dsDNA.

As interações GL15-dsDNA e GL7-dsDNA não são seletivas para uma determinada base de dsDNA, não mostram dano oxidativo, mas há indicação de uma interação preferencial com segmentos de dsDNA ricos em guanina.

3. CONCLUSÃO

O comportamento eletroquímico de derivados de acridina-triazol, GL15 e GL7, forneceu informações valiosas sobre as reações redox biológicas destas moléculas.

O estudo foi realizado numa ampla gama de pH e mostrou que tanto o GL15 como o GL7 sofrem oxidação e redução na superfície de um GCE. Para ambos os compostos, a oxidação é um processo irreversível e com dependência do pH. Para o GL15 o processo de oxidação ocorre num único passo com a transferência de um elétron e um próton. Para o GL7, a oxidação ocorre em dois passos consecutivos com a transferência de dois elétrons e dois prótons. A redução de ambos os compostos é semelhante envolvendo a transferência de um elétron e um próton num processo quasi-reversível e dependente do pH.

Foram investigadas as interações GL15-dsDNA e GL7-dsDNA em soluções incubadas e utilizando biossensores eletroquímicos de dsDNA, poly [G] e poly [A]. Verificou-se que o GL15 e o GL7 interagem com dsDNA, de forma dependente do tempo de incubação. O decréscimo da corrente dos picos de oxidação da dGuo e da dAdo deve-se à condensação da estrutura morfológica do dsDNA. Esta interação mostrou ainda que ocorre com afinidade preferencial para segmentos ricos guanina, no entanto não envolve qualquer dano oxidativo.

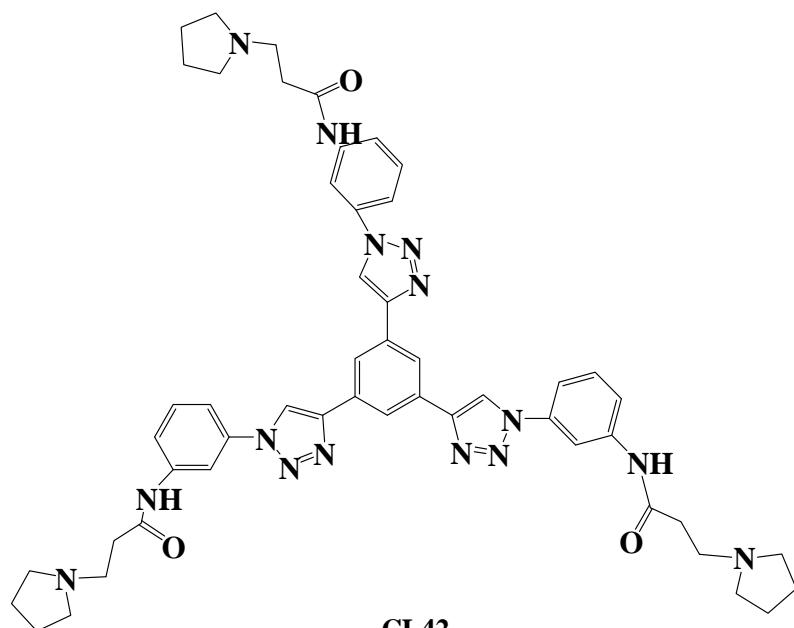
CAPÍTULO VII

ESTUDO ELETROQUÍMICO DE DERIVADOS DE FENIL-TRIAZOL E INTERAÇÃO COM O DNA

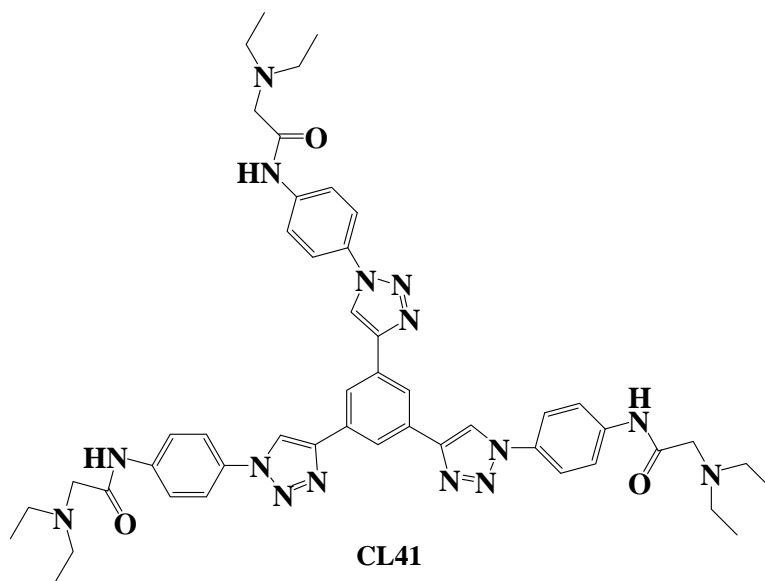
Neste capítulo é descrita a investigação do comportamento eletroquímico de três derivados de fenil-triazol, CL42, CL41 e CL2r50 numa ampla gama de eletrólitos de suporte de diferente valor de pH, na superfície do GCE, **Fig 7.1**, e da reactividade/toxicidade destes derivados de fenil-triazol com o DNA.

A investigação foi direcionada para detetar danos conformacionais na estrutura do DNA e/ou danos oxidativos no DNA causados pela presença de CL42, CL41 e CL2r50 na solução e usando biossensores eletroquímicos de DNA

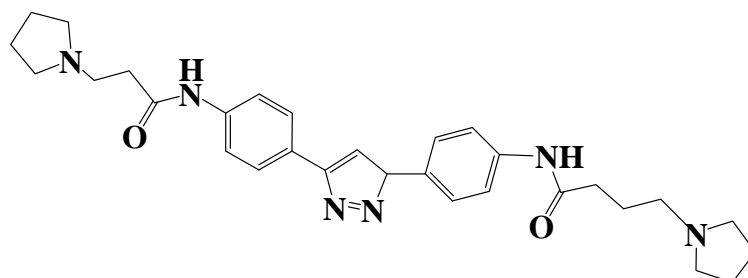
O mecanismo de interação destas moléculas com o dsDNA foi investigado em incubações de curta e longa duração, de modo a identificar eletroquimicamente os efeitos causados no DNA.



CL42



CL41



CL2r50

Figura 7.1 – Estrutura química de derivados de fenil-triazol

1. OXIDAÇÃO

Voltametria cíclica

O estudo do comportamento eletroquímico dos derivados de fenil-triazol, CL41, CL42 e CL2r50, foi efetuado em eletrólito de suporte a pH = 5,4 (tampão acetato 0,1 M) por CV com uma velocidade varrimento de 100 mV s^{-1} na superfície do GCE, **Fig. 7.2**.

O varrimento do potencial teve início a 0,00 V, evoluiu no sentido negativo atingindo o limite de $-1,20 \text{ V}$, onde foi invertido, uma vez atingido o limite positivo de $+1,30 \text{ V}$, o sentido do varrimento foi novamente invertido até alcançar o potencial inicial, e assim sucessivamente. Durante os varrimentos do potencial, foi mantido um fluxo constante de N_2 sobre a solução, de modo a evitar a difusão do oxigênio atmosférico para o interior da solução.

Independentemente do sentido inicial do varrimento, foram observados apenas picos anódicos para os três compostos, o que indicou que a única reação que ocorre nas condições usadas é a oxidação.

No sentido positivo do primeiro varrimento obtido numa solução $75 \mu\text{M}$ CL42 verificou-se a ocorrência de um pico anódico, pico 1_a, a $E_{p1a} = +1,04 \text{ V}$, **Fig. 7.2A e B**.

Após a inversão do sentido do varrimento não se observou nenhum pico, de onde se conclui que a oxidação de CL42 é uma reação irreversível. Ainda na mesma solução mas sem limpar a superfície do GCE, foram registados varrimentos sucessivos do potencial.

No segundo varrimento ocorreram dois novos picos anódicos, pico 2_a, a $E_{p2a} = +0,26 \text{ V}$, e pico 3_a a $E_{p3a} = +0,54 \text{ V}$. Estes picos correspondem à oxidação dos produtos de oxidação do CL42. Após a inversão do varrimento, verificou-se a

ocorrência de dois picos catódicos, pico 2_c , a $E_{p2c} = + 0,21$ V, e pico 3_c , a $E_{p3c} = + 0,47$ V.

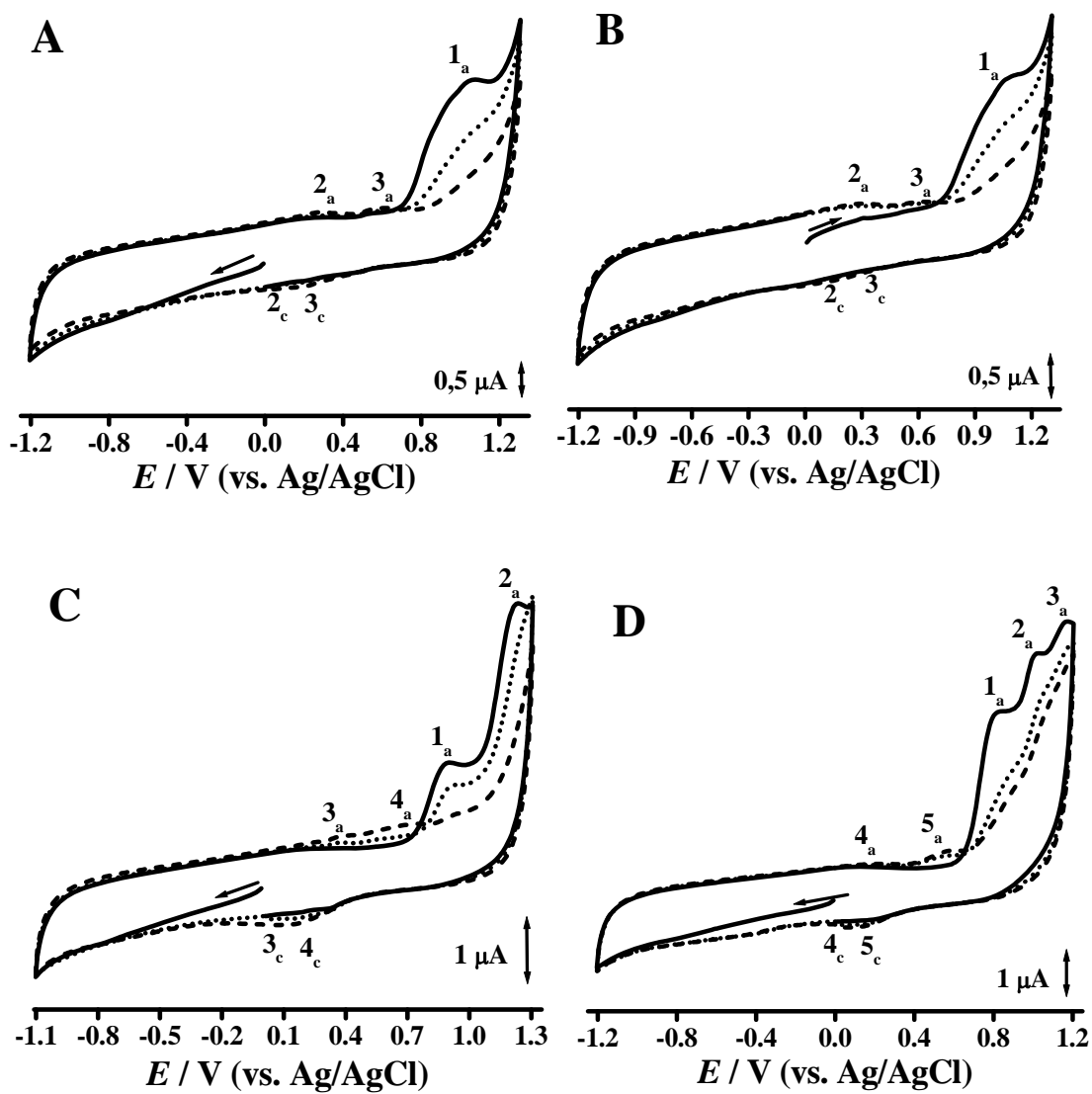


Figura 7.2 CVs obtidos em pH = 5,4 (tampão acetato 0,1 M) em soluções de: (A) e (B) 75 μM CL42, (C) 150 μM CL41 e (D) 150 μM CL2r50: (—) primeiro, (••••) segundo e (----) sexto varrimento de potencial, $v = 100$ mV s⁻¹.

As diferenças entre os potenciais anódicos e catódicos dos picos, $|E_{p2a} - E_{p2c}| = 50$ mV e $|E_{p3a} - E_{p3c}| = 70$ mV indicam que os picos 2 e 3 correspondem a processos de oxidação-redução reversíveis, com a transferência de um elétron [210]. Foi observada uma grande diminuição da corrente do pico 1_a com o aumento do número de varrimentos, devido à adsorção de CL42 e/ou dos seus produtos de oxidação na superfície do GCE.

O perfil voltamétrico de CL41 e CL2r50 também foi avaliado por CV em eletrólitos de suporte com diferentes valores de pH. Os CVs n uma solução 150 μM CL41, com uma velocidade de varrimento de 100 mVs⁻¹, revelaram o aparecimento de dois picos, pico 1_a, a $E_{p1a} = + 0,84$ V, e pico 2_a, a $E_{p2a} = + 1,18$ V, que correspondem à oxidação de CL41 à superfície do GCE, **Fig. 7.2C**. Após inversão da direção do potencial, nenhum pico aparece na região catódica, indicando que se trata de uma oxidação irreversível. Todavia, no segundo varrimento dois novos picos aparecem, correspondentes à oxidação dos produtos do CL41, pico 3_a, a $E_{p3a} = + 0,23$ V, e pico 4_a, a $E_{p4a} = + 0,36$ V, como foi observado anteriormente para CL42. Também os produtos de CL41 sofrem oxidação num processo com duas etapas consecutivas e reversíveis, onde as diferenças entre os potenciais anódicos e catódicos dos picos, $|E_{p3a} - E_{p3c}| = 40$ mV e $|E_{p4a} - E_{p4c}| = 40$ mV revelam que os picos 3 e 4 correspondem a processos de oxidação-redução reversíveis, com a transferência de um elétron. No voltamograma pode ainda observar-se uma diminuição das correntes dos picos 1_a e 2_a, devido à adsorção dos produtos do oxidação do CL42 na superfície do eletrodo.

Os CVs obtidos numa solução 150 μM CL2r20 mostraram que a oxidação de CL2r50 ocorre em três passos irreversíveis, com a formação de produtos eletroativos que também sofrem oxidação em dois passos reversíveis, **Fig. 7.2D**.

Voltametria de onda quadrada

Os voltamogramas de SW registados numa solução 50 μ M CL42 em pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M) mostraram características semelhantes à CV, isso é, no primeiro varrimento verificou-se o aparecimento pico de oxidação 1_a, a $E_{p1a} = + 0,71$ V, **Fig. 7.3A**. A irreversibilidade do pico 1_a foi confirmada após o desdobramento da corrente total nas suas componentes direta (I_f) e inversa (I_b). No segundo varrimento ocorreram dois picos anódicos, correspondentes à oxidação dos produtos de oxidação de CL42, o pico 2_a, a $E_{p2a} = + 0,13$ V, e pico 3_a, a $E_{p3a} = + 0,42$ V, **Fig. 7.3B**.

O primeiro voltamograma de SW registado numa solução 50 μ M CL41 em pH = 5,4 (tampão acetato 0,1 M), mostrou dois picos de oxidação irreversíveis, pico 1_a, a $E_{p1a} = + 0,87$ V, e pico 2_a, a $E_{p2a} = + 1,20$ V. No segundo voltamograma registado sem limpar o CGE, e tal como sucedeu para o CL42, dois novos picos ocorreram, pico 3_a, a $E_{p3a} = + 0,36$ V e pico 4_a, a $E_{p4a} = + 0,53$ V, correspondente à oxidação reversível dos produtos de oxidação do CL41, **Fig. 7.3D**.

Os voltamogramas de SW registados numa solução 50 μ M CL2r50 em pH = 4,3 (tampão acetato 0,1 M) mostraram o aparecimento de três picos de oxidação irreversíveis, pico 1_a, pico 2_a e pico 3_a, **Fig. 7.3E**. No segundo varrimento, sem limpeza do elétrodo, foi observado um comportamento similar aos outros derivados de fenil-triazol, a ocorrência de dois picos anódicos correspondentes à oxidação dos produtos de oxidação de CL2r50, **Fig. 7.3F**. Os valores idênticos de potencial e de corrente dos picos 4_a e 5_a, das curvas de corrente direta (I_f) e inversa (I_b), registadas na solução de CL2r50, indicaram que a transferência de carga é reversível.

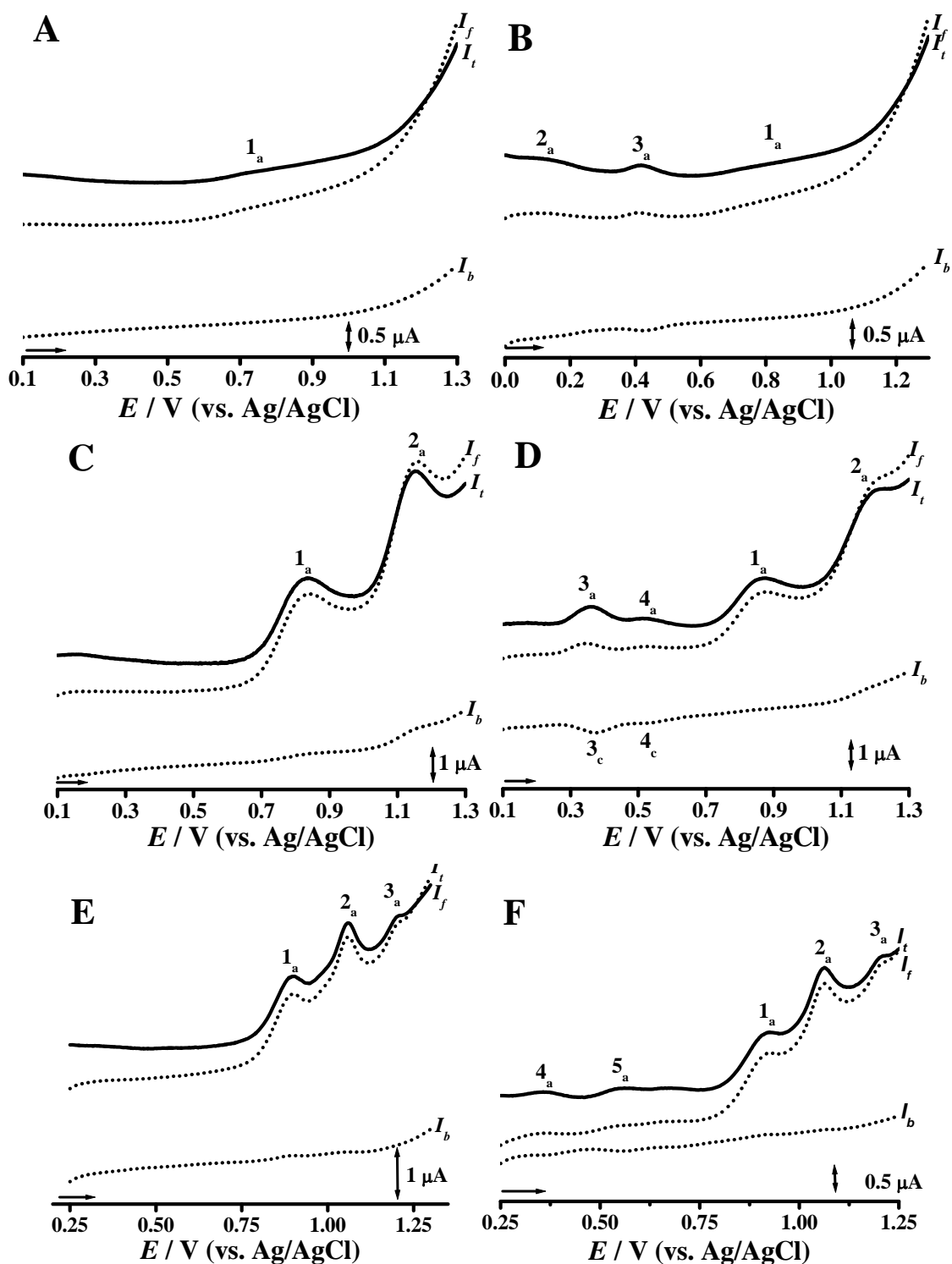


Figura 7.3 – Voltamogramas de SW do primeiro e segundo varrimento registrados em soluções de 50 μM : (A, B) CL42 em $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0,1 M); (C, D) CL41 em $\text{pH} = 5,4$ (tampão acetato 0,1 M); e (E, F) CL2r50 em $\text{pH} = 4,3$ (tampão acetato 0,1 M); I_t – corrente total, I_f – corrente direta e I_b – corrente inversa, $v_{\text{ef}} = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Voltametria de impulso diferencial

A voltametria de DP foi usada no estudo da influência do pH no comportamento eletroquímico dos derivados de fenil-triazol, CL42, CL41 e CL2r50 em diferentes eletrólitos de suporte numa faixa de pH entre 2,0 e 12,0.

Os voltamogramas de DP obtidos numa solução 50 μM CL42 mostraram o aparecimento de um pico de oxidação para valores de pH entre 3,4 e 9,2, **Fig. 7.4**. Para valores muito ácidos e muito básicos, não se verifica a oxidação de CL42. Os resultados mostraram um desdobramento do pico 1_a , em soluções a $3,4 < \text{pH} < 5,4$, em dois picos de oxidação, **Fig. 7.4A**.

O voltamograma de DP numa solução 50 μM CL42 em $\text{pH} = 3,4$ (tampão acetato 0,1 M) mostrou os dois picos de oxidação, pico $1_a'$, a $E_{p1'a} = + 0,85 \text{ V}$, e pico $1_a''$, a $E_{p1''a} = + 0,96 \text{ V}$. Para $\text{pH} > 5,4$ aparece um único pico de oxidação. Verificou-se que o potencial de oxidação foi deslocado para valores mais negativos com o aumento do pH, **Fig. 7.4B**. O declive da reta de 59 mV por unidade de pH, mostra que o mecanismo deste processo de oxidação envolve o mesmo número de elétrons e prótons, **Fig. 7.4B**.

O número de elétrons transferidos, n , foi determinado pela largura a meia-altura $W_{1/2} \sim 100 \text{ mV}$ (pico $1_a'$) e $W_{1/2} \sim 90 \text{ mV}$ (pico $1_a''$), correspondendo a uma reação eletroquímica com a transferência de um elétron em cada etapa. Por consequência, foi concluído que oxidação de CL42 ocorre em duas etapas, com a transferência de um elétron e de um próton, em cada uma das etapas.

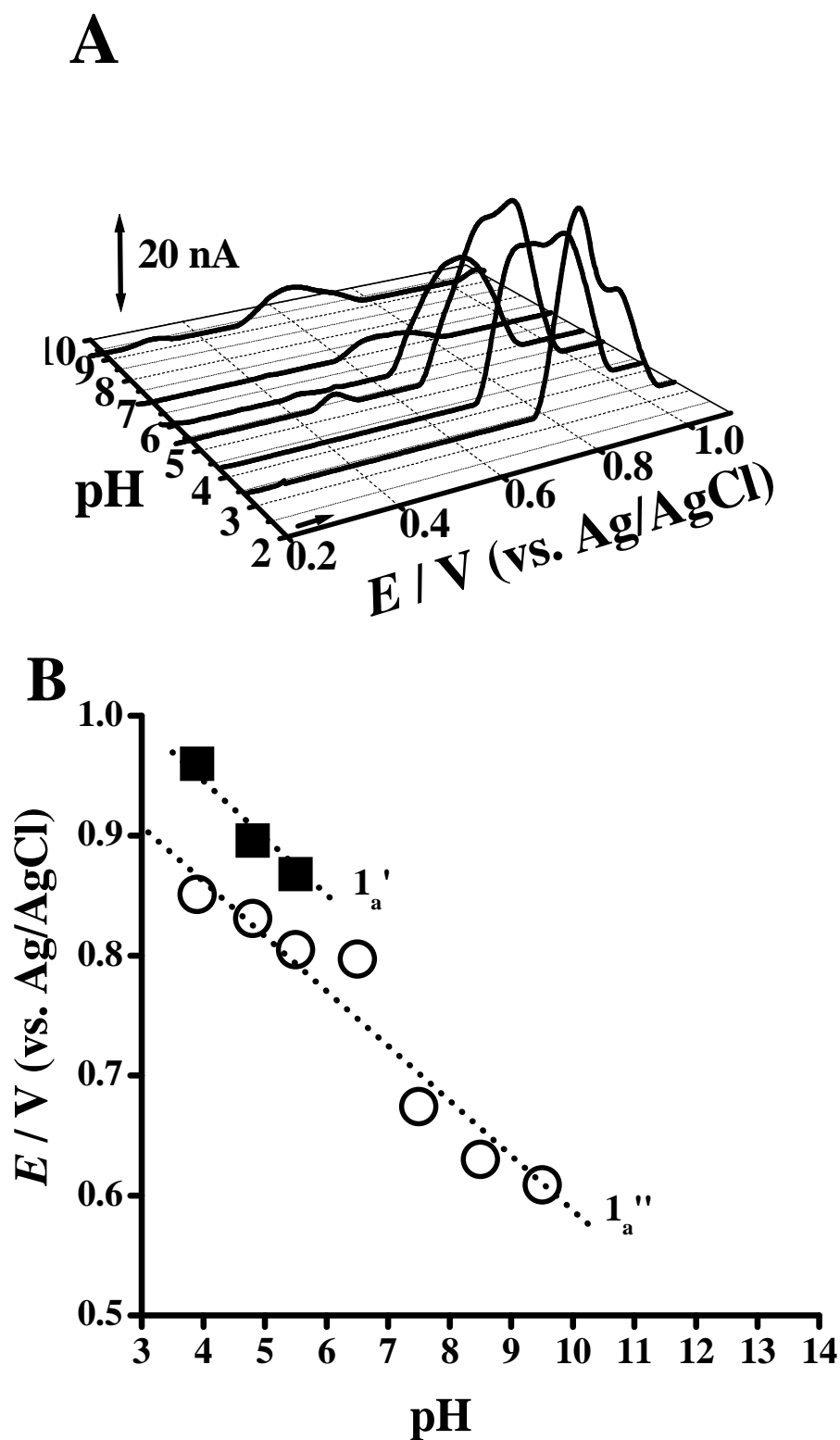


Figura 7.4 – (A) Gráfico 3D dos voltamogramas de DP obtidos em soluções 50 μ M CL42 em electrólitos de diferentes valores de pH. (B) Gráfico da variação do (■) $E_{p1'a}$ e do (○) $E_{p1''a}$ com o pH da solução. A linha pontilhada corresponde a uma inclinação de 59 mV por unidade de pH.

A influência do pH na oxidação de CL41 foi estudada em soluções 50 μ M CL41, **Fig. 7.5**. Verificou-se o aparecimento de dois picos de oxidação, pico 1_a e pico 2_a, que se deslocam para valores mais positivos de potencial à medida que o pH diminui e verificou-se uma dependência linear do potencial de ambos os picos de oxidação em soluções com $2,0 < \text{pH} < 8,0$ seguindo a relação $E_{p1a} \text{ (V)} = 1,083 - 0,059 \text{ pH}$ para o pico 1_a e $E_{p2a} \text{ (V)} = 1,379 - 0,059 \text{ pH}$ para o pico 2_a, **Fig 7.5**.

O declive da recta, **Fig. 7.5B**, 59 mV por unidade de pH, mostra que o mecanismo de oxidação de CL41 envolve o mesmo número de eletrões e de protões. Tendo em consideração que em todos as soluções do electrólito de suporte a largura a meia altura do pico 1_a foi de $W_{1/2} \sim 110 \text{ mV}$ e a largura a meia altura do pico 2_a foi de $W_{1/2} \sim 87 \text{ mV}$, pode concluir-se que o mecanismo de oxidação de CL41 ocorre em duas etapas com a transferência de um eletrão e um protão em cada uma das etapas de oxidação.

Para $\text{pH} > 8,8$ os pico 1_a e 2_a, são independentes do pH indicando um mecanismo que envolve somente a transferência de um eletrão.

A determinação do pK_a está relacionado com os seus efeitos sobre a lipossolubilidade e solubilidade. Para se obter o valor do pK_a é necessário investigar o analito em electrólitos de suporte com diferentes valores de pH e monitorar a variação do potencial em função do estado de ionização da molécula. Assim, o valor do $\text{pK}_a \sim 9$ foi determinado para CL41, **Fig. 7.5B**.

Varrimentos sucessivos em voltametria de DP foram efectuados na mesma solução de CL41 sem qualquer limpeza do eléctrodo, **Fig 7.6**. O segundo varrimento mostrou o aparecimento de dois novos picos, o pico 3_a, a $E_{p3a} = + 0,18 \text{ V}$, e o pico 4_a, a $E_{p4a} = + 0,33 \text{ V}$, correspondentes à oxidação dos produtos da oxidação de CL41.

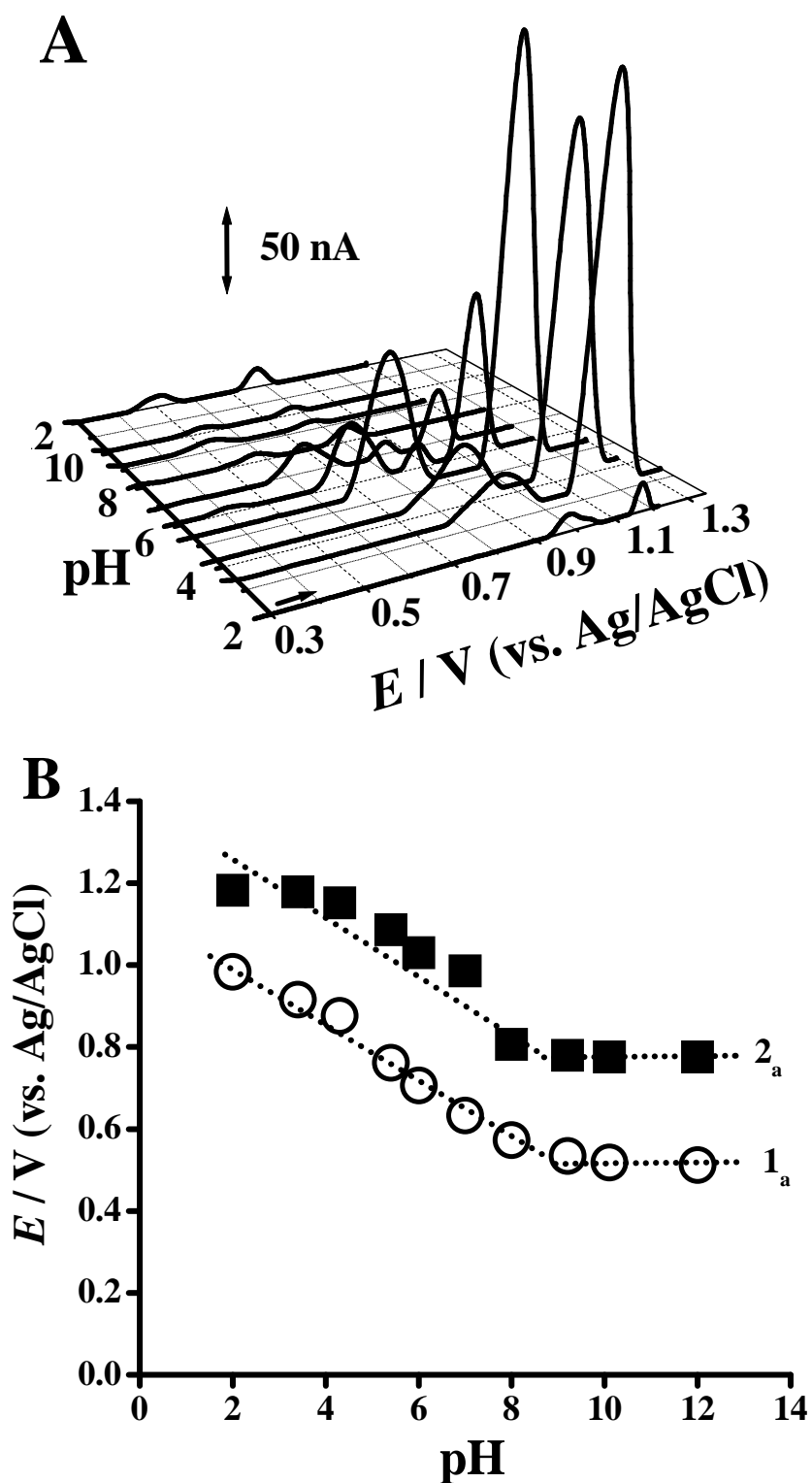


Figura 7.5 – (A) Gráfico 3D dos voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, obtidos numa solução de 50 μ M CL41 em eletrólitos de diferentes valores de pH; (B) Gráfico da variação de: (○) E_{p1a} e (■) E_{p2a} com o pH da solução.

A intensidade de corrente para o pico 1_a e 2_a diminuiu com os sucessivos varrimentos na solução de CL41, sendo essa diminuição atribuída à adsorção dos produtos da oxidação de CL41 na superfície do GCE.

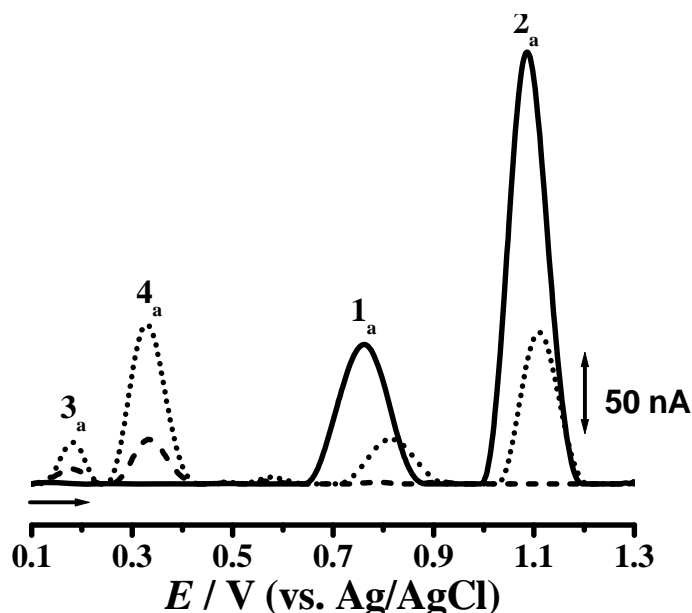


Figura 7.6 Voltamogramas de DP sucessivos numa solução 50 μM CL41 em pH = 5,4 (tampão acetato 0,1 M): (—) primeiro, (•••) segundo e (---) sexto varrimentos.

A influência do pH na oxidação de CL2r50 foi estudada numa solução 10 μM CL2r50 em diferentes eletrólitos de suporte, **Fig. 7.7**. Nos voltamogramas de DP registados observou-se o aparecimento de três picos oxidação para CL2r50. Os três picos ocorrem para uma faixa de pH $3,4 < \text{pH} < 12$. Os valores dos potenciais dos três picos diminuíram com o aumento do pH do eletrólito de suporte. A dependência do potencial com o pH foi sempre linear e está representada na **Fig 7.7B**. O declive da reta do gráfico do E_{p1a} em função do pH, linha pontilhada, foi de 59 mV por unidade de pH, **Fig. 7.7B**, e mostrando que o mecanismo de todos os processos de oxidação de CL2r50 ocorre com a transferência do mesmo número de prótons e elétrons [210]. Considerando a largura a meia altura do pico 1_a, $W_{1/2} \sim 87$ mV, corresponde a uma reação eletroquímica que envolve a transferência de um elétron [210].

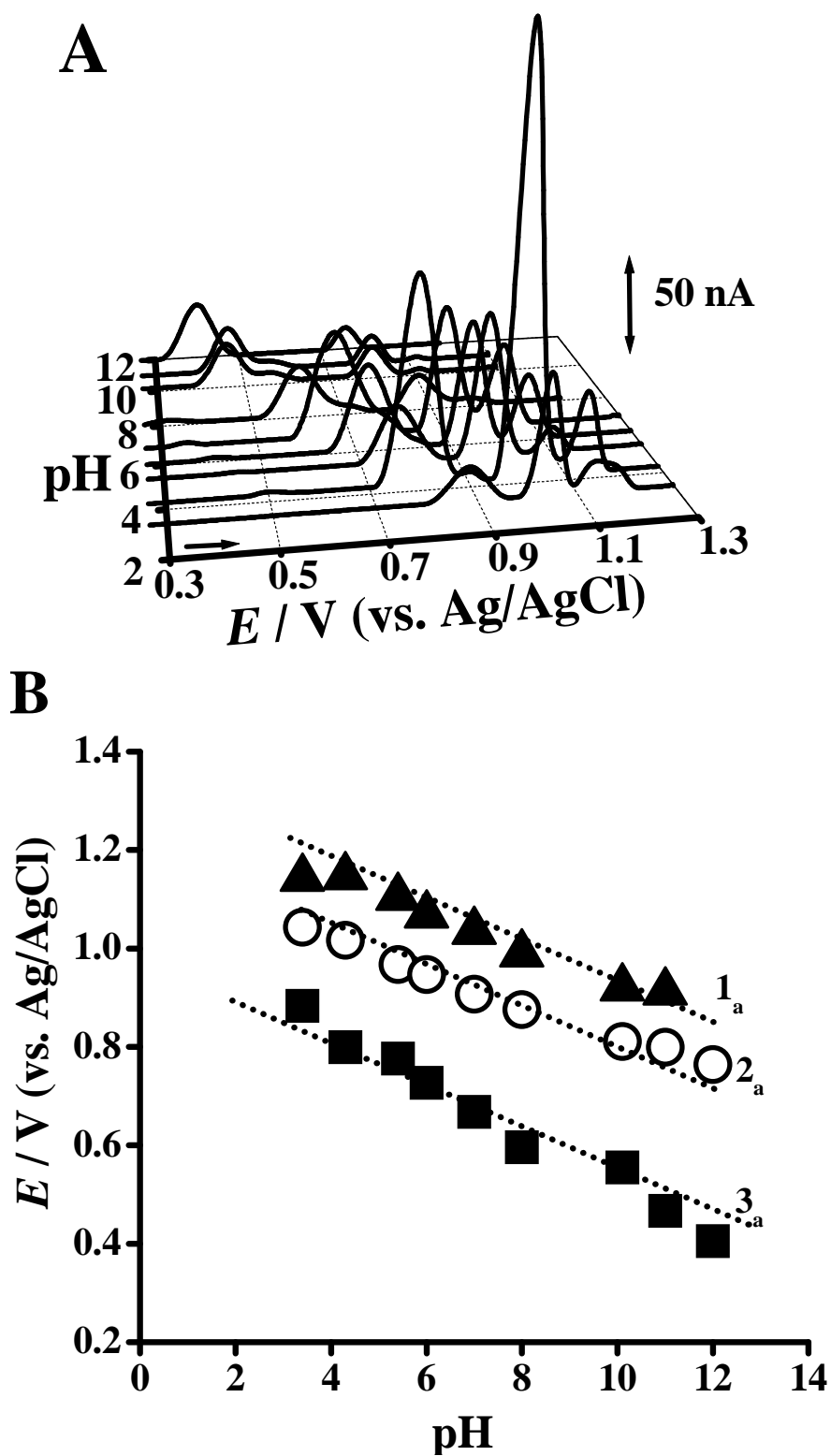


Figura 7.7 – (A) Gráfico 3D dos voltamogramas de DP obtidos numa solução 10 μ M CL2r50 em electrólitos de diferentes valores de pH; (B) Gráfico da variação de: (■) E_{p1a} , (○) E_{p2a} e (▲) E_{pa3a} com o pH.

Para a segunda oxidação, o pico 2_a, $W_{1/2} \sim 60$ mV e para o pico 3_a, $W_{1/2} \sim 60$ mV, ou seja, nestas duas ultimas etapas, a oxidação de CL2r50 envolve a transferência de dois elétrões e dois protões. No segundo varrimento de DP de CL2r50 ocorre o aparecimento de dois novos picos, pico 4_a e pico 5_a, correspondentes à oxidação dos produtos de oxidação de CL2r50, para soluções com pH < 8.

Nos voltamogramas de DP nas diferentes soluções de eletrólito de suporte, verificou-se que o potencial de ambos os picos se desloca de forma linear para valores mais negativos com o aumento do pH, seguindo a relação E_{p4a} (V) = 0.535 – 0,059 pH para o pico 4_a e E_{p5a} (V) = 0.749 – 0,059 pH para o pico 5_a, **Fig. 7.8**.

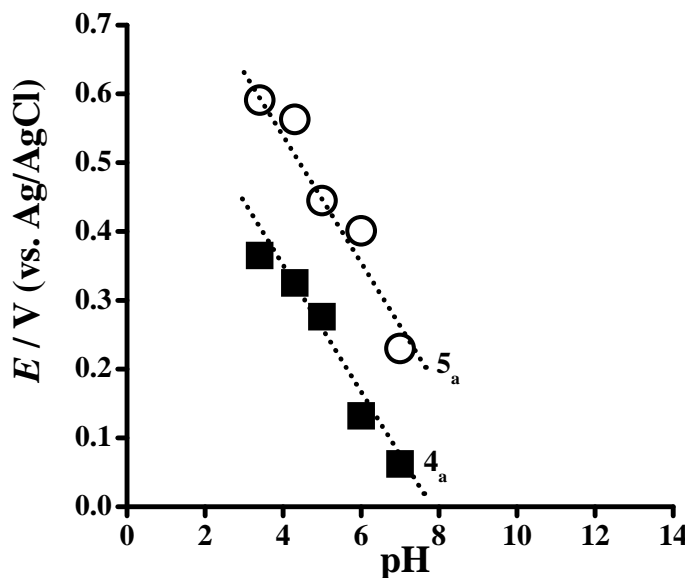


Figura 7.8 Gráfico da variação do (■) E_{p4a} e (○) E_{p5a} com o pH numa solução 10 μ M CL2r50 . A linha pontilhada corresponde a uma inclinação de 59 mV por unidade de pH.

A inclinação da reta de 59 mV por unidade de pH, mostra que o mecanismo deste processo de oxidação em meio aquoso envolve o mesmo número de elétrões e de protões. O número de elétrões transferido, n , foi determinado pela largura a meia altura para cada pico, $W_{1/2} \approx 90$ mV, correspondendo a uma reação de oxidação em que estão envolvidos um eletrão e um protão.

2. INTERAÇÃO DE CL41, CL42 E CL2R50 COM O DNA

Os derivados de fenil-triazol estão em fase de estudos para serem utilizados como inibidores da telomerase. É importante o uso de técnicas eletroquímicas para o estudo da interação com o DNA.

2.1 Soluções incubadas de CL42-dsDNA, CL41-dsDNA e CL2r50-dsDNA

Em todas as experiências diferentes concentrações de CL42, CL41 ou CL2r50 foram incubadas com $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA em solução de eletrólito de suporte a $\text{pH} = 4,5$ (tampão acetato $0,1 \text{ M}$) durante diferentes períodos de tempo. Após o fim de cada incubação as amostras contendo CL42-dsDNA, CL41-dsDNA ou CL41-dsDNA foram avaliadas eletroquimicamente no eletrólito de suporte a $\text{pH} = 4,5$ devido às baixas intensidades de corrente observadas nas experiências em $\text{pH} = 7,0$. Depois de cada medida voltamétrica a superfície do GCE foi limpa para evitar a diminuição das correntes de oxidação devidas à forte adsorção na superfície do eléctrodo de cada um dos compostos. Soluções de controle de $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA foram também preparadas e incubadas apenas em tampão acetato por igual período de tempo das amostras com o dsDNA e após o fim de cada incubação foram também medidas eletroquimicamente por voltametria de DP.

A interação entre $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA e $50 \mu\text{M}$ CL42 foi registada imediatamente após a incubação, 0h. O voltamograma de DP registado na solução mostrou uma diminuição muito significativa na intensidade de corrente dos picos correspondentes às bases do DNA, **Fig. 7.9**, sugerindo que ocorreu uma forte condensação do dsDNA provocada por uma rápida e forte interação entre o CL42 e o

DNA. Também a intensidade de corrente do pico do CL42 decresceu em relação ao de controle. Ocorreu ainda o aparecimento de um novo pico a + 0,80 V, correspondente à guanina livre, libertada da estrutura do dsDNA devido à interação CL42-dsDNA.

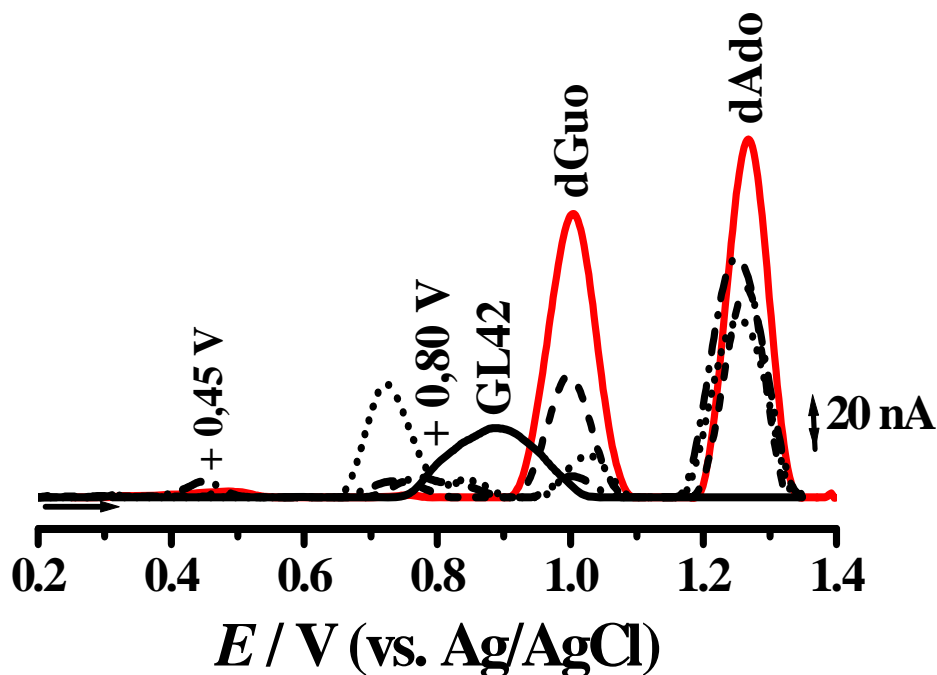


Figura 7.9 – Voltamogramas de DP obtidos numa solução 50 μM CL42 (—) e incubada em solução com 300 $\mu\text{g/mL}$ dsDNA em $\text{pH} = 4,5$ (tampão acetato 0,1 M), em diferentes períodos de tempo: DNA (—), 0h (•••), 6h (---) e 24h (---).

Numa amostra de CL42-dsDNA incubada durante 6 h, o voltamograma de DP mostrou, nas mesmas condições experimentais, o aparecimento de quatro pequenos e bem definidos de picos oxidação, **Fig. 7.9**. Quando comparados com os resultados obtidos para a solução de dsDNA de controle, os dois picos de oxidação da dGuo e dAdo aparecem para os mesmos potenciais, embora com uma intensidade de corrente muito menor. Já o pico de oxidação a + 0,45 V é atribuído à 8-oxoGua e/ou à 2,8-DHA.

Os voltamogramas de DP registados nas amostras de CL42-dsDNA incubadas durante 24 h, **Fig. 7.9**, mostraram novamente os quatro picos de oxidação.

No entanto, um aumento na intensidade de corrente para todos os picos foi observado quando os mesmos são comparados com o resultado da amostra anterior, incubada durante 6h, mas a intensidade de corrente é menor quando comparada com os resultados de controle do dsDNA, **Fig. 7.9**.

Experiências similares foram realizadas também para o CL41 e o CL2r50, **Fig. 7.10A e 7.10B**.

O voltamograma de DP registado na amostra mostrou uma diminuição muito significativa na intensidade de corrente dos picos correspondentes às bases do DNA e aos picos de oxidação de CL41 e CL2r50, **Fig. 7.10A**, imediatamente após a incubação.

Numa amostra de CL41-dsDNA incubada durante 6 h, o respetivo voltamograma de DP mostrou, nas mesmas condições experimentais, o aparecimento de um novo pico a $E_{pa} = + 0,45$ V sendo este atribuído à 8-oxoGua e/ou à 2,8-DHA. O pico de oxidação observado a $E_{pa} = + 0,70$ V correspondente à CL41 intercalada no dsDNA, e, o pico a $+ 0,80$ V à guanina livre, libertada da estrutura do dsDNA devido a interação CL41-dsDNA depois de 1h, **Fig.7.10A**. O mesmo aconteceu para a interação CL2r50-dsDNA, **Fig. 7.10B**.

O voltamograma registado na amostra de CL41 incubada com o dsDNA durante 24 h, mostrou picos bem definidos correspondentes às bases de DNA.

Houve um aumento na intensidade de corrente para CL42 e CL2r50 para todos os picos, para 24h, quando estes são comparados com os resultados das experiências para 0 h e 6 h, **Fig. 7.10A e B**.

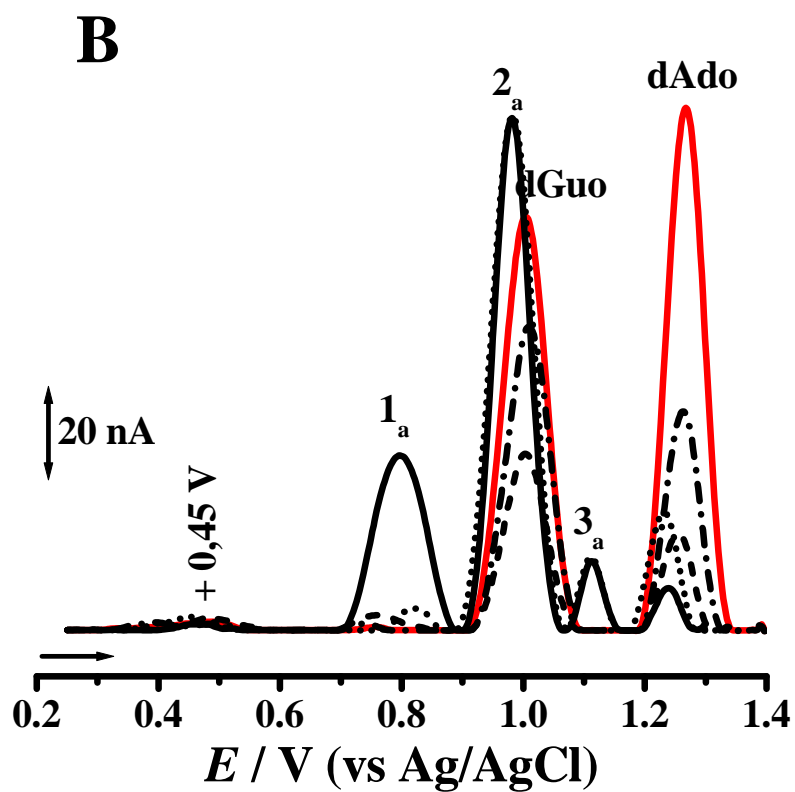
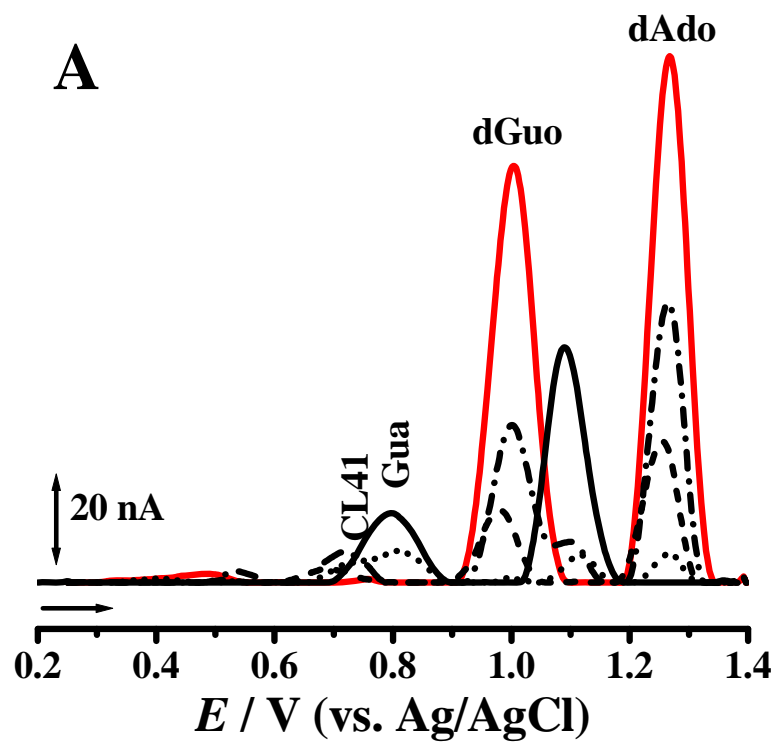


Figura 7.10 – Voltamogramas de DP obtidos numa solução: (A) 50 μ M CL42 (—) e (B) 5 μ M CL2r50 (—), e incubadas em solução com 300 μ g/mL dsDNA em pH = 4,5 (tampão acetato 0,1 M), em diferentes períodos de tempo: DNA (—), 0h (•••), 6h (---) e 24h (-••).

Para obter mais informações e maior seletividade sobre a interação CL42-dsDNA, CL41-dsDNA ou CL2r50-dsDNA foram realizadas alguns experiências de incubação com polihomorribonucleotídeos com sequências conhecidas, nomeadamente o poly [G] e o poly [A].

As interações entre 50 μM de CL42, de CL41 ou de 5 μM de CL2r50 com 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de poly [G] e poly [A] foram investigadas por voltametria de DP depois das amostras serem incubadas por períodos de tempo de 0h, 6h e 24h.

Os voltamogramas de DP nas incubações com poly [G] e poly [A] mostraram uma diminuição significativa da intensidade de corrente dos picos de oxidação da dGuo e da dAdo quando comparados com as soluções de controle com o aumento do tempo de incubação.

Os resultados demonstraram claramente que os compostos CL42, CL41 e CL2r50 tem afinidade para ambas as bases purínicas, guanina e adenina, intercalando no poly [G] e no poly [A], em $\text{pH} = 4,5$.

Como nenhum pico referente à oxidação da 8-oxoGua e/ou da 2,8-DHA foi observado, pode concluir-se que nestas condições experimentais não ocorreu nenhum dano oxidativo no DNA.

Estes resultados podem ser explicados pela maior estabilidade das estruturas secundárias do poly [G] e do poly [A] relativamente ao dsDNA em $\text{pH} = 4,5$ o que, conseqüentemente, torna mais difícil a intercalação dos derivados de fenil-triazol, dificultado a interação.

2.2 Interação CL42, CL41 e CL2r50 com biossensor eletroquímico com DNA

As interações CL42-dsDNA, CL41-dsDNA e CL2r50-dsDNA foram estudadas usando o biossensor eletroquímico com dsDNA numa solução de eletrólito de suporte em pH = 7,0. Os biossensores foram preparados usando o processo multicamada descrito no *capítulo II, seção 4.2*.

Os efeitos da interação foram seguidos eletroquimicamente comparando as variações dos picos de oxidação nos biossensores eletroquímicos com dsDNA e pelo aparecimento ou não dos picos de oxidação da guanina e dos produtos do dano oxidativo, 8-oxoGua ou 2,8-DHA.

Vários biossensores foram preparados e incubados em soluções a pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M) dos derivados de fenil-triazol com concentração 10 μ M por tempos diferentes. Biossensores eletroquímicos com dsDNA de control também foram preparados e incubados por igual período, **Fig. 7.11**.

Um biossensor eletroquímico com dsDNA recém preparado foi imerso durante 5 min numa solução de CL42, e após este período de incubação, foi retirado da solução, lavado cuidadosamente com água desionizada e só depois transferido para o eletrólito de suporte, tampão acetato, pH = 7,0 e o voltamograma obtido mostrou uma diminuição dos picos de oxidação das bases do dsDNA, assim como uma diminuição do pico de CL42. Com um novo biossensor eletroquímico com DNA o procedimento foi repetido para 10 min e 20 min de incubação e o voltamograma de DP mostrou um aumento para o pico da dGuo, a + 0,67 V, quando comparado com o biossensor de control e também com o resultado da incubação durante 5 min, **Fig.7.11**.

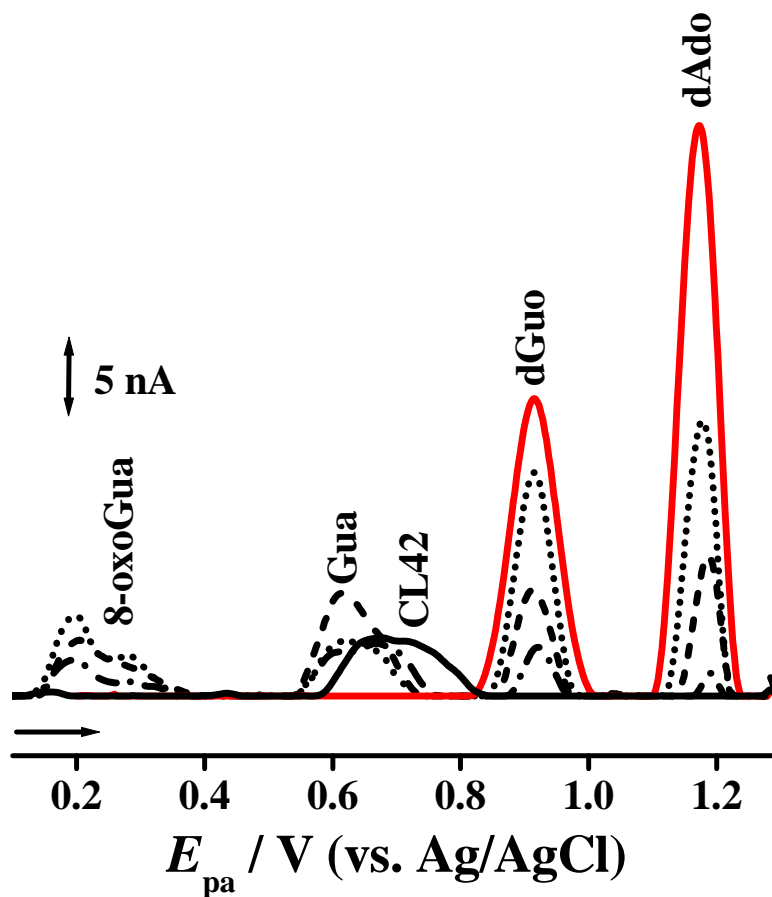


Figura 7.11 – Voltamogramas de DP obtidos com os biossensores eletroquímicos com dsDNA: (—) biossensor eletroquímico com DNA de controle e após a incubação em 10 μM CL42 em $\text{pH} = 7,0$ durante (---) 5 e (···) 10 min e (- - -) 20 min, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Os voltamogramas de DP registados mostraram claramente que o CL42 interage e liga-se ao dsDNA ocorrendo uma forte interação observada através da diminuição dos picos de oxidação das bases do dsDNA e do CL42 para $t = 5 \text{ min}$. O pico a $+ 0,67 \text{ V}$ é um indicativo da quebra da cadeia do dsDNA, correspondendo à oxidação da guanina livre proveniente do DNA. Adicionalmente, um resultado de extrema importância foi a detecção do dano oxidativo sofrido pelo DNA em $\text{pH} = 7,0$, confirmada pelo aparecimento do pico da 8-oxoGua e/ou do 2,8-DHA em $+ 0,34 \text{ V}$. O CL42 causa

mudanças conformacionais no dsDNA de uma maneira dependente do tempo originando uma forte condensação no dsDNA.

A intercalação destes inibidores da telomerase está descrita na literatura [13, 148, 152], estando associada com a intercalação destas moléculas na estrutura do DNA. A intercalação do CL42 no dsDNA é seguida pela destabilização da morfologia da dupla hélice do DNA, ficando as bases do DNA mais expostas à superfície do eléctrodo, facilitando conseqüentemente a sua oxidação. Isto explica os aumentos da intensidade de corrente dos picos de oxidação da dGuo, dAdo e da CL42 para $t = 10$ min. Para tempos de incubação maiores torna a ocorrer a diminuição dos picos de oxidação das bases, devido à condensação do DNA. Esta condensação do dsDNA foi confirmada principalmente pelo desaparecimento dos picos da oxidação da dGuo e da dAdo. Uma vez condensado, o dsDNA dificulta ainda mais o contacto das bases com a superfície do GCE, de tal modo que, vai impossibilitar a transferência de carga.

A condensação e intercalação também foi observada em voltamogramas da interação CL41 e CL2r50, com o biossensor eletroquímico de dsDNA.

3. CONCLUSÃO

Ao longo deste trabalho investigou-se pela primeira vez, por intermédio de técnicas voltamétricas, os mecanismos redox e os processos de eléctrodo envolvidos na oxidação de três moléculas de derivados de fenil-triazol, CL42, CL41 e CL2r50, que se encontram ainda em ensaios laboratoriais com o objetivo de serem usadas para inibir a telomerase em células cancerígenas. O estudo eletroquímico realizado mostrou que estas moléculas só sofrem oxidação, não existindo qualquer processo de redução.

A oxidação dos três derivados de fenil-triazol é um processo dependente do pH envolvendo a formação de um produto eletroativo na superfície do GC. O CL42 sofre uma oxidação irreversível. O CL41 apresentou uma oxidação irreversível, ocorrendo em duas etapas, e, o valor do pK_a foi determinado, $pK_a \approx 9$. A oxidação do CL2r50 é um processo irreversível que ocorre em três etapas.

A interação destes compostos com o DNA mostrou que CL42, CL41 e CL2r50 induzem mudanças na estrutura do DNA, de uma forma dependente do tempo. O dano oxidativo no DNA causado pelos derivados de fenil-triazol também foi detetado eletroquimicamente pelo aparecimento do pico de oxidação da 8-oxoGua e/ou da 2,8-DHA.

CAPÍTULO VIII

CONCLUSÕES

A investigação realizada consistiu no estudo do comportamento eletroquímico e dos mecanismos de oxidação e de redução de vários fármacos, entre os quais a metolazona (MT), o ácido úsnico (UA), o omeprazol (OMZ), o metotrexato (MTX), a cladribina (CLD), a clofarabina (CLF) e de novas moléculas, que têm sido sintetizadas para actuar na inibição da telomerase, GL7, GL15, CL2, CL41 e CL2r50.

A interação *in vitro* dos fármacos antineoplásicos com o DNA de dupla hélice por meio de técnicas voltamétricas também foi investigada para melhor compreensão do mecanismo de ação destes fármacos *in vivo* sobre o DNA.

Os resultados obtidos no estudo eletroquímico da MT, um diurético pertencente ao grupo dos tiazidicos, que inibem a reabsorção de NaCl permitiram propor o

mecanismo redox do MT, que sofre oxidação, controlada por difusão, em duas etapas. e dependente do pH do eletrólitos de suporte. A primeira etapa é reversível e envolve a oxidação do azoto no anel da sulfonamida, ocorrendo a transferência de dois elétrões e dois prótões. A segunda etapa ocorre com a formação de um radical ião, a partir do grupo sulfonamida, levando à formação um produto final hidroxilado. A constante de ionização para a MT foi determinada, $pK_a \sim 9$.

O UA é um fármaco conhecido pela inibição do efeito de vírus, capacidade analgésica, antipirética e atividade anti-inflamatória. Este fármaco é praticamente insolúvel em água e a voltametria do estado sólido, usando o UA mecanicamente ligado à superfície do GCE permitiu a investigação das propriedades redox do UA em meio aquoso. Este método mostrou ser viável e rápido para o estudo da oxidação eletroquímica do UA, um processo irreversível e dependente do pH, que ocorre em três etapas, correspondendo à oxidação dos grupos hidróxilo ligados aos aneis aromáticos e foi proposto o mecanismo de oxidação do UA. A constante de ionização determinada para o UA foi $pK_a = 8,8$.

O OMZ é um derivado benzimidazol, que atua como inibidor da bomba de prótões no estomago, sofre oxidação e redução. A oxidação do OMZ é um processo dependente do pH do eletrólito de suporte que ocorre em duas etapas irreversíveis. A primeira etapa envolve a remoção de um elétron seguindo-se a desprotonação e formação de um produto hidroxilado, com a transferência de um elétron e um prótão. A segunda etapa é atribuída à oxidação do grupo amino da molécula de benzimidazol, envolvendo a transferência de dois elétrões e dois prótões. A adsorção dos produtos eletroativos do OMZ levou ao bloqueamento da superfície do elétrodo. Os resultados obtidos para a redução do OMZ demonstraram que ocorre um processo irreversível com

a formação de uma quinona que, em meio ácido, adsorve fortemente sobre a superfície do GCE e sofre uma oxidação reversível. A redução do OMZ é um processo dependente do pH e ocorre com a transferência de um elétron e um próton. Em solução alcalina o OMZ sofre desprotonação e conseqüentemente a sua redução torna-se independente do pH e envolve apenas a transferência de um elétron.

O MTX é um fármaco antineoplásico que pertence à categoria dos antimetabólitos, interrompe a formação de purinas e pirimidinas, inibindo a síntese do DNA. O processo de oxidação do MTX é um processo complexo e irreversível e corresponde à oxidação do grupo da pirazina, envolvendo a transferência de dois elétrons e dois prótons. A oxidação do MTX é irreversível, dependente do pH e conduz à formação de um produto eletroativo na superfície do eléctrodo, o 7-hidroxiemetotrexato, principal metabolito do MTX *in vivo*. Este metabolito sofre redução, envolvendo a transferência de dois prótons e dois elétrons. A forte adsorção na superfície do GCE dos produtos de oxidação do MTX influencia os parâmetros eletroquímicos. A redução do MTX é um processo simples dependente do pH e que ocorre num único passo com a transferência de dois elétrons e dois prótons, correspondente à redução do grupo diamino-pteridinil. Este produto da redução sofre oxidação, com transferência de dois elétrons e dois prótons, ocorrendo esta oxidação no grupo amino do segundo anel aromático. Foram propostos os mecanismos de oxidação e redução para o MTX.

A interação do MTX com o dsDNA foi estudada eletroquimicamente. Os dados voltamétricos foram confirmados pelos resultados de AFM, que demonstraram que o MTX interage especificamente com o dsDNA, induzindo mudanças na estrutura do DNA dependentes do tempo. A reorganização da rede de camadas auto-montadas na

superfície do eletrodo do HOPG foi observada após a incubação do MTX com o dsDNA, resultando numa aumento da espessura da rede MTX-DNA, e no aumento da altura dos agregados MTX-DNA, com o aumento do tempo de incubação. O estudo voltamétrico demonstrou ainda que o MTX apresenta afinidade preferencial para segmentos ricos em adenina, de acordo com as fracas ligações de hidrogénio entre a adenina e a timina. Não foi detetado qualquer dano oxidativo no DNA causado pelo MTX, uma vez que não ocorreu o aparecimento do pico de oxidação da 8-oxoGua e/ou 2,8-DHA.

Os resultados deste estudo confirmam os efeitos tóxicos do MTX, correlacionados com uma ação conjunta de vários danos no dsDNA: condensação do DNA seguida de intercalação do MTX na dupla hélice do DNA com subsequente desnaturação da hélice.

Os análogos da adenina, a CLD e a CLF, são usados como agentes antineoplásicos que podem induzir reações adversas tóxicas consideráveis. A sua oxidação de ambos os fármacos é um processo irreversível e o potencial depende do pH do eletrólito de suporte. O mecanismo de oxidação ocorre numa única etapa com a transferência de dois eletrões e dois protões. O centro eletroativo é o núcleo da adenina. Os resultados obtidos mostraram que a oxidação de CLD ou CLF leva à formação de um produto hidroxilado que adsorve na superfície do eletrodo e é irreversivelmente oxidado. A CLF foi concebida como um análogo de adenina com uma maior estabilidade que a CLD, é mais difícil de oxidar, apresentando um valor de potencial mais elevado.

Sendo estes dois análogos de purina de elevada toxicidade mas de muito interesse no tratamento de diversas doenças foi investigada a interação da CLD e CLF

com o dsDNA, em soluções incubadas e utilizando biossensores eletroquímicos de dsDNA, poly [A] e poly [G]. A diminuição dos picos das bases purínicas dGuo e dAdo com o aumento do tempo de incubação levou a concluir que tanto a CLD como a CLF interagem com o dsDNA. As interações CLD-dsDNA e CLF-dsDNA provocam a condensação da estrutura morfológica do dsDNA, sendo que estas interações não são específicas para um determinado tipo de base. Todavia, nenhuma evidência de dano oxidativo no dsDNA foi encontrada causado por estas duas moléculas.

O uso de pequenas moléculas na inibição da telomerase tem despertado interesse da comunidade científica como um modo de curar o cancro. O comportamento eletroquímico de derivados de acridina-triazol, GL15 e GL7, forneceu informações valiosas sobre as reações redox biológicas destas moléculas. A oxidação eletroquímica de GL15 e GL7 é um processo irreversível e com dependência do pH do eletrólito de suporte. Para o GL15 o processo de oxidação ocorre num único passo com a transferência de um eletrão e um protão. Para o GL7, a oxidação ocorre em dois passos consecutivos com a transferência de dois eletrões e dois protões. A redução de ambos os compostos é semelhante uma vez que envolve um processo quasi-reversível e dependente do pH. A redução ocorre nos grupos amino em dois passos consecutivos, com a transferência de um eletrão e um protão.

Os biossensores eletroquímicos de dsDNA de multicamada foram utilizados, assim como soluções incubadas, para avaliar as interações GL15-dsDNA e GL7-dsDNA. Os resultados demonstraram claramente que a estes dois inibidores da telomerase interagem com o dsDNA dependente do tempo de incubação, tendo mostrado que ocorrem com afinidade preferencial para segmentos ricos guanina, não envolvendo qualquer dano oxidativo causado ao DNA.

O comportamento eletroquímico e os processos de eléctrodo para três moléculas derivadas de fenil-triazol, CL42, CL41 e CL2r50, foram investigadas por técnicas voltamétricas. Estas moléculas sofrem oxidação na superfície do GCE, não existindo qualquer evidência de redução nas condições experimentais utilizadas.

A oxidação da CL42 é um processo irreversível, que ocorre em duas etapas com a transferência de um eletrão e um protão. Este processo depende do pH da solução, apresentando também um comportamento diferente em meio ácido e básico, sendo que em meio ácido a oxidação ocorre em duas etapas. A forte adsorção na superfície do GCE dos seus produtos de oxidação influencia os parâmetros eletroquímicos. A oxidação do CL41 é um processo irreversível, com dependência do pH do eletrólito de suporte, ocorrendo em duas etapas, havendo a transferência de um eletrão e um protão em ambas as etapas. Foi determinado para o CL41 o valor da constante de ionização, $pK_a \approx 9,0$. A oxidação da CL2r50 é um processo irreversível, e dependente do pH da solução, que ocorre em três etapas. Todas as etapas envolvem a transferência de um eletrão e um protão. A oxidação dos três derivados de fenil-triazol conduz à formação de um produto eletroativo na superfície do GCE. Este produto sofre oxidação num processo reversível que envolve duas etapas e a transferência de um eletrão e um protão em ambas as etapas.

Sendo moléculas de muito interesse para a inibição da telomerase, considerou-se fundamental o estudo da interacção destes derivados de fenil-triazol com o DNA. Ficou demonstrado que CL42, CL41 e CL2r50 interagem especificamente com o dsDNA, induzindo mudanças na estrutura do DNA, numa maneira dependente do tempo. O dano oxidativo basal no DNA causado pelos derivados de fenil-triazol também foi detetado eletroquimicamente pelo aparecimento do pico de oxidação da 8-oxoGua e/ou 2,8-

DHA. Os resultados deste estudo confirmam os efeitos tóxicos dos derivados de fenil-triazol, correlacionados com uma ação conjunta de vários danos ao dsDNA: condensação do DNA, seguido de intercalação na dupla hélice do DNA com subsequente desnaturação e dano oxidativo.

A investigação realizada permite concluir que as técnicas eletroquímicas podem ser aplicadas com sucesso para a determinação de mecanismos de reações redox de fármacos. Tendo em conta as inúmeras vantagens que os métodos eletroquímicos apresentam, a determinação e deteção rápida e simultânea de compostos farmacêuticos, com custos reduzidos e evitando o uso de solventes orgânicos, são ferramentas adequadas para a caracterização e a avaliação dos mecanismos de interação de moléculas e fármacos antineoplásicos com o DNA. Estes métodos, em conjunto com outras técnicas, potenciam o desenvolvimento de novas moléculas com potencial uso farmacológico, elevada eficácia e maior seletividade.

A investigação dos mecanismos de transferência de eletrões de reações biológicas forneceu dados eletroquímicos correlacionados com a estrutura e atividade da molécula, fornecendo informações úteis relativamente aos mecanismos dos compostos nas células vivas. Os mecanismos sugeridos para os fármacos irão permitir disponibilizar informações relevantes para compreender as vias pelas quais exercem a sua ação bioquímica assim como o seu metabolismo em sistemas biológicos.

O uso de elétrodos de GC modificados com DNA em dupla hélice permitiu a investigação rápida e de baixo custo dos efeitos causados por compostos perigosos sobre o material genómico e a determinação de lesões no DNA. Portanto, os resultados eletroquímicos permitiram detetar os danos causados ao DNA imobilizado na superfície

do elétrodo, e podem contribuir para uma melhor compreensão dos processos de interação que ocorrem *in vivo*.

REFERÊNCIAS

-
- [1] C.W. Greider, E.H. Blackburn, *Cell*, 1985, 43, 405.
- [2] C.W. Greider, E.H. Blackburn, *Cell*, 1987, 51, 887.
- [3] C.W. Greider, E.H. Blackburn, *Nature*, 1989, 337, 331.
- [4] J. Lingner, T.R. Hughes, A. Shevchenko, M. Mann, V. Lundblad, T.R. Cech, *Science*, 1997, 276, 561.
- [5] S. Neidle, em *Theurapeutic Application of Quadruplex Nucleic Acids*, Elsevier, 2012.
- [6] V.C. Diculescu, M. Vivan, A.M. Oliveira Brett, *Electroanalysis*, 2006, 18, 1963.
- [7] A.M. Oliveira Brett, S.H.P. Serrano, T.A. Macedo, D. Raimundo, M.H. Marques, M.A. La-Scalea, *Electroanalysis*, 1996, 8, 992.
- [8] J.A. Piedade, I.R. Fernandes, A.M. Oliveira Brett, *Bioelectrochemistry*, 2002, 56, 81.
- [9] M.-L. Riekkola, J.H. Jumppanen, *J. Chromatogr. A*, 1996, 735, 151.
- [10] Z.Y. Yang, M.Y. Qu, C.L. Yu, (Eds.), *Sports Medical*, Peking University Medical Press, Beijing, 2003, pp. 315-343.
- [11] R. Ventura, J. Segura, *J. Chromatogr. B*, 1996, 687, 127.
- [12] M.H. Lu, P. Tong, H. Xiao, S.F. Xia, X.Y. Zheng, W. Liu, L. Zhang, G. N. Chen, *Electrophoresis*, 2007, 28, 1461.
- [13] B.G. Katzung, *Farmacologia Básica e Clínica*, Guanabara Koogan, 9^a edição, 2006.
- [14] M.D.A. Stern, *Am. Heart J.*, 1976, 9, 262.
- [15] S.R. Steinmuller, J.B. Puschett, *Kidney Int.*, 1972, 1, 169.

- [16] K. Mohammad, W. David, S.J. Enna, B.B. David, em *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, Elsevier, New York, 2008.
- [17] J.F. Winchester, R.J. Kellett, K. Boddy, P. Boyle, H.J. Dargie, M.E. Mahaffey, D.M. Ward, A.C. Kennedy, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1980, 28, 611.
- [18] C.L. Curry, S.M. Janda, R. Harris, J.H. Mackay, C.A. Nugent, J.Ryan, H. Schnaper, J. Schoenberger, *Clin. Ther.*, 1986, 9, 47.
- [19] O. Abdel Razak, *J. Pharmaceut. Biomed.*, 2004, 34, 433.
- [20] D. Farthing, D.A. Sica, I. Fakhry, T.W.B. Gehr, *J. Chromatogr. B*, 1994, 653, 171.
- [21] G. Wei, S. Xiao, C. Liu, *J. Chromatogr. B*, 2007, 845, 169.
- [22] M. Ciborowski, M.C. Icardo, J.V.G. Mateo, J. Martínez Calatayud, *J. Pharmaceut. Biomed.*, 2004, 36, 693.
- [23] T.H.Nash III, em *Lichen Biology*, Nash III, T. H.; Ed.; Cambridge University Press, Cambridge, 1996.
- [24] K. Ingólfssdóttir, *Phytochemistry*, 2002, 61, 729.
- [25] M. Cochietto, N. Skert, P.L. Nimis, G. Sava, *Naturwissenschaften*, 2002, 89, 137.
- [26] F. Rancan, S. Rosan, K. Boehm, E. Fernández, M.E., Hidalgo, W. Quihot, C. Rubio, F. Boehm, H. Piazena, U. Oltmanns, *J. Photochem. Photobio. B*, 2002, 68, 133.
- [27] B. Dixon, *Lancet Infectious Diseases*, 2005, 5, 534.
- [28] I. Francolini, P. Norris, A. Piozzi, G. Donelli, P. Stoodley, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48, 4360.

-
- [29] E. Fernández, W. Quihot, C. Rubio, M.E. Hidalgo, R. Diaz, J. Ojeda. *Photochem. Photobiol.*, 2006, 82, 1065.
- [30] E. Okuyama, K. Umeyama, M. Yamazaki, Y. Kinoshita e Y. Yamamoto, *Planta Med.*, 1995, 61, 113.
- [31] C.S. Vijayakumar, S. Viswanathan, M. Kannappa-Reddy, S. Parvathavarthini, A.B. Kundu, E. Sukumar, *Fitoterapia*, 2000, 71, 564.
- [32] B. Proksa, M. Sturdíková, N. Prónayová T. Liptaj, *Pharmazie*, 1996, 51, 195.
- [33] J.G. Romagni, G. Meazza, D. Nanayakkara, F.E. Dayan, *FEBS Lett.*, 2000, 480, 301.
- [34] R. Emmerich, I. Giez, O.L. Lange, P. Proksch, *Phytochemistry*, 1993, 33, 1389.
- [35] M. Ghione, D. Parrello, L. Grasso, *Chemoterapia* 1988, 7, 302.
- [36] R.K. Sharma e P.J. Jannke, *Ind. J. Chem.*, 1966, 4, 16.
- [37] C. Demet, C. Demet, H.M. Gokhan, A. Orhan, *Z. Naturforsch. C.* 2006, 61, 47.
- [38] S. Kreft, B. Strukely, *Electrophoresis*, 22: 2001, 13, 2755.
- [39] A. Falk, T.K. Green, P. Barboza, *J. Chromatogr. A.*, 2008, 1182, 141.
- [40] F. Scholz, B. Meyer. *Chem. Soc. Rev.*, 1994, 23, 341.
- [41] P. Janeiro, A.M. Oliveira-Brett. *Electroanalysis.*, 2005, 17, 733.
- [42] O. Corduneanu, P. Janeiro, A.M. Oliveira-Brett, *Electroanalysis*, 2006, 18, 757.
- [43] T. Grygar, F. Marken, U. Schroder, F. Scholz. *Collec. Czech. Chem. C.*, 2002, 67, 163.

- [44] M. Lovric, F. Scholz. *J. Solid State Electr.*, 1997, 1, 108.
- [45] A.M. Bond, *J. Solid State Electr.*, 1997, 1, 185.
- [46] M.E. Bosch, A.J.R. Sánchez, F.S. Rojas, C.B. Ojeda, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2007, 44, 831.
- [47] N. El-Enany, F. Belal, M. Rizk, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2008, 70, 889.
- [48] A. Radi, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2003, 31, 1007.
- [49] C.S.P. Sastry, P.Y. Naidu, S.S.N. Murtyi, *Talanta*, 1997, 44, 1211.
- [50] N. Ozaltin, A. Koçer, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1997, 16, 337.
- [51] F. Salama, N. El-Abasawy, S.A. Abdel Razeq, M.M. F. Ismail, M.M. Fouad, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 33, 411.
- [52] G.W. Mihaly. P.J. Prichard, R.A. Smallwood, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 1983, 278, 311.
- [53] I. Grundevik, G. Jerndal, K. Balmer, B.A. Persson, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 1986, 4, 389.
- [54] N.L. Rezk, K.C. Brown, A.D.M. Kashuba, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2006, 844, 314.
- [55] D. Agbaba, D. Novovic, K. Karljickovic-Rajic, V. Marinkovic, *J. Planar Chromatogr. Mod.TLC*, 2004, 17, 169.
- [56] D. Hebenstreit, W. Bicker, M. Laemmerthofer, W. Lindner, *Electrophoresis*, 2004, 25, 277.
- [57] J.J.B. Nevado, G.C. Peñalvo, R.M.R. Dorado, *Anal. Chim. Acta*, 2005, 533, 127.
- [58] N. Ozaltin, A. Temizer, *Electroanalysis*, 1994, 6, 799.

-
- [59] A.M. Qaisi, M.F. Tutunji, L.F. Tutunji, *J. Pharm. Sci.*, 2006, 95, 384.
- [60] S. Pinzauti, P. Gratteri, S. Furlanetto, P. Mura, E. Dreassi, R. Phan-Tan-Luu, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1996, 14, 881.
- [61] S. McClean, E. O`Kane, V.N. Ramachandran, W.F. Smyth, *Anal. Chim. Acta*, 1994, 292, 81.
- [62] F. Belal, N. El-Enany, M. Rizk, *J. Food Drug Anal.*, 2004, 12, 102.
- [63] H. Yamazaki, K. Inoue, P.M. Shaw, W.J. Checovich, F.P. Guengerich, T. Shimada, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1997, 283, 434.
- [64] W. Tassaneeyakul, W. Tassaneeyakul, S. Vannaprasaht, Y. Hamazoe, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 2000, 49, 139.
- [65] J.S. Marinac, J.D. Balian, J.W. Foxworth, S.K. Willsie, J.C. Daus, R. Owen, D.A. Flockhart, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1996, 60, 138.
- [66] M. Chang, M.-L. Dahl, G. Tybring, E. Gotharson, L. Bertilsson, *Pharmacogenetics*, 1995, 5, 358.
- [67] I. Ieiri, T. Kubota, A. Urae, M. Kimura, Y. Wada, K. Mamiya, S. Yoshioka, S. Irie, T. Amamoto, K. Nakamura, S. Nakano, S. Higuchi, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1996, 59, 647.
- [68] G.C. Ibeanu, B.I. Ghanayem, P. Linko, L. Li, L.G. Pedersen, J.A. Goldstein, *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 12496.
- [69] T. Ishizaki, D.-R. Sohn, K. Kobayashi, K. Chiba, K. H. Lee, S.-G. Chin, T. Andersson, C.-G. Regardh, Y.-C. Low, Y. Zhang, M.-L. Dahl, L. Bertilsson, *Ther. Drug Monit.*, 1994, 16, 214.

- [70] D.J. Birkett, T. Andersson, J.O. Miners, em *Method Enzymol Cytochrome P450, Part B272*, Eds: E.F. Johnson, M.R. Waterman, Academic Press, San Diego 132, 1996.
- [71] T. Andersson, C.G. Regardh, M.L. Dahl-Puustinen, L. Bertilsson, *Ther. Drug Monit.*, 1990, 12, 415.
- [72] J.D. Balian, N. Sukhova, J.W.Harris, J. Hewett, L. Pickle, J.A. Goldstein, R.L. Woosley, D.A. Flockhart, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1995, 57, 662.
- [73] M. Chang, G. Tybring, M.L. Dahl, E. Gotharson, M. Sagar, R. Seensalu, Balian, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1995, 39, 511.
- [74] T. Andersson, J.O. Miners, M.E. Veronese, W. Tassaneeyakul, W.-W. Tassaneeyakul, U.A. Meyer, D.J. Birkett, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1993, 36, 521.
- [75] Y. Bottiger, G. Tybring, E. Gotharson, L. Bertilsson, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1997, 62, 384.
- [76] L. Bertilsson, G. Tybring, J.Widen. M. Chang, T. Tomson, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1997, 44, 186.
- [77] D.R. Sohn, K. Kobayashi, K. Chiba, K. Lee, S. Shin, T. Ishizaki, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1992, 262, 1195.
- [78] T. Andersson, J. O. Miners, M. E. Veronese, D. J. Birkett., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1994, 37, 597.
- [79] J.L. Yan, *J. Appl. Sci.*, 2006, 6, 1625.
- [80] W.A. Bleyer, *Cancer*, 1978, 41, 36.

-
- [81] R.S. Vardanyan, V.J. Hruby, em *Synthesis of Essential Drugs*, Eds: R. S. Vardanyan, V. J. Hruby, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2006, pp. 389–418.
- [82] M. Krajcinovic, A. Moghrabi, *Pharmacogenomics*, 2004, 5, 819.
- [83] H. Tian, B.N. Cronstein, *Bull NYU Hosp Jt. Dis.*, 2007, 65, 168.
- [84] W.A. Bleyer, *Cancer Treat. Rev.*, 1977, 4, 87.
- [85] M. Chow, H. Rubin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1998, 95, 4550.
- [86] H.-P. Lipp, J.T. Hartmann, em *Elsevier*, Ed: J.K. Aronson, Amsterdam, The Netherlands 2007, pp. 551–572.
- [87] S. Manfrida, S. Chiesa, L. Teofili, B. Diletto, S. Hohaus, A. Fiorentino, B. De Bari, V. Frascino, C. Aristei, M. Balducci, *Eur. J. Cancer Supplements*, 2010, 8, 22.
- [88] P.J. Mease, B.S. Goffe, J. Metz, A. VanderStoep, B. Finck, D.J. Burge, *Lancet*, 2000, 356, 385.
- [89] F.M. Rubino, *J. Chromatogr. B*, 2001, 764, 217.
- [90] T. Hirai, S. Matsumoto, I. Kishi, *J. Chromatogr. B*, 1997, 690, 267.
- [91] H. Aboleneen, J. Simpson, D. Backes, *J. Chromatogr. B*, 1996, 681, 317.
- [92] F. Palmisano, T.R.I. Cataldi, P.G. Zambonin, *J. Chromatogr. B*, 1985, 344, 249.
- [93] I.D. Merás, A.E. Mansilla, F.S. López, M.J.R. Gómez, *Talanta*, 2001, 55, 623.
- [94] S.M. Sabry, M. Abdel-Hady, M. Elsayed, O.T. Fahmy, H.M. Maher, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2003, 32, 409.

- [95] S. Pinzauti, P. Gratteri, S. Furlanetto, P. Mura, E. Dreassi, R. Phan-Tan-Luu, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1996, 41, 881.
- [96] F. Wang, Y. Wu, J. Liu, B. Ye, *Electrochim. Acta*, 2009, 54, 1408.
- [97] F. Wang, Y. Wang, K. Lu, X. Wei, B. Ye, *J. Electroanal. Chem.*, 2012, 674, 83.
- [98] A. Temizer, A.N. Onar, *Talanta*, 1988, 35, 805.
- [99] L. Gao, Y. Wu, J. Liu, Y. Baoxian, *J. Electroanal. Chem.*, 2007, 610, 131.
- [100] R. Selesovska, L. Bandzuchova, T. Navratil, *Electroanalysis*, 2011, 23, 177.
- [101] B.-X. Ye, S. Qu, F. Wang, L. Li, *J. Chin. Chem. Soc.*, 2005, 52, 1111.
- [102] R.C. Gurira, L.D. Bowers, *J. Electroanal. Chem.*, 1983, 146, 109.
- [103] R.C. Gurira, L.D. Bowers, *J. Electroanal. Chem.*, 1987, 220, 323.
- [104] A.J.M. Ordieres, A.C. García, J.M.F. Alvarez, P.T. Blanco, *Anal. Chim. Acta*, 1990, 233, 281.
- [105] C.M. Galmarini, J.R. Mackey, C. Dumontet, *Lancet Oncol.*, 2002, 3, 415.
- [106] T. Robak, A. Korycka, E. Lech-Maranda, P. Robak, *Molecules*, 2009, 14, 1183.
- [107] A. Korycka, E. Lech-Maranda, T. Robak, *Recent Patents AntiCancer Drug Discov.*, 2008, 3, 123.
- [108] M. Hocek, A. Holy, I. Votruba, H. Dvořáková, *J. Med. Chem.*, 2000, 43, 1817.
- [109] J.A. Montgomery, K. Hewson, *J. Med. Chem.*, 1968, 11, 48.
- [110] M. Hocek, A. Holý, I. Votruba, H. Dvořáková, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 2001, 66, 483.

-
- [111] N. Kode, L. Chen, D. Murthy, D. Adewumi, S. Phadtare, *Eur. J. Med. Chem.*, 2007, 42, 327.
- [112] M. Else, C.E. Dearden, E. Matutes, J. Garcia-Talavera, A.Z.S. Rohatiner, S.A.N. Johnson, N.T.J. O'Connor, A. Haynes, N. Osuji, F. Forconi, F. Lauria, D. Catovsky, *Brit. J. Haematol.*, 2009, 145, 733.
- [113] R.A. Linker, B.C. Kieseier, R. Gold., *Trends Pharmacol. Sci.*, 2008, 29, 558.
- [114] J.C. Davis, H. Austin, D. Boumpas, T.A. Fleisher, C. Yarboro, A. Larson, J. Balow, J.H. Klippel, D. Scott, *Arthritis Rheum.*, 1998, 41, 335.
- [115] W. Kong, K. Engel, J. Wang, *Curr. Drug Metab.*, 2004, 5, 63.
- [116] J. Hammond, B.J. Rider, *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, 2008, 1.
- [117] J. Liliemark, G. Juliusson, *Cancer Res.*, 1991, 51, 5570.
- [118] D.A. Carson, J. Kaye, J.E. Seegmiller, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1977, 74, 5677.
- [119] P. Hentosh, P. Grippo, *Mol. Pharmacol.*, 1994, 45, 955.
- [120] L.M. Leoni, Q. Chao, H.B. Cottam, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1998, 95, 9567.
- [121] D. Genini, I. Budihardjo, W. Plunkett, X. Wang, C.J. Carrera, H.B. Cottam, D.A. Carson, L.M. Leoni *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 29.
- [122] S. Jansen, H. Rosing, C.J.F. Wolf, J.H. Beijnen, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2007, 21, 4049.
- [123] M.D. Moyer, T. Johannsen, R.J. Stubbs, *J. Pharmaceut. Biomed.*, 1998, 17, 45.

- [124] Y. Hsieh, C.J.G. Duncan, S. Lee, M. Liu, *J. Pharmaceut. Biomed.*, 2007, 44, 492.
- [125] V. Reichelova, F. Albertioni, J. Liliemark, *J. Chromatogr. B*, 1996, 682, 115.
- [126] N. Santos-Alvarez, M.J. Lobo-Castanon, A.J. Miranda-Ordieres, P. Tunon-Blanco, *Electroanalysis*, 2003, 15, 441.
- [127] B. Czochralska, W. Kawczyn'ski, W. Bratkowski, E. Bojarska, A. Bzowska, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1996, 39, 241.
- [128] E. Bojarska, B. Czochralska, *J. Electroanal. Chem.*, 1999, 477, 89.
- [129] H.E. Satana, A.M. Oliveira-Brett, *Int. J. Electrochem.*, 2011, doi:10.4061/2011/340239.
- [130] A. Zhenchuk, K. Lotfi, G. Juliusson, F. Albertioni, *Biochem. Pharmacol.*, 2009, 78, 1351.
- [131] V. Reichelova, J. Liliemark, F. Albertioni, *J Pharm Biomed Anal.*, 1995, 13, 711.
- [132] D.A. Carson, D.B. Wasson, L.M. Esparza, C.J. Carrera, T.J. Kipps, H.B. Cottam, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 1992, 89, 2970.
- [133] C. Xie, W. Plunkett, *Cancer Res.*, 1995, 55, 2847.
- [134] A.H. Sjoberg, L. Wang, S. Eriksson, *Mol. Pharmacol.*, 1998, 53, 270.
- [135] X. Wang, F. Albertioni, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2010, 29, 414.
- [136] Y. Hsieh, C.J.G. Duncan, S. Lee, M. Liu, *J. Pharmaceut. Biomed.*, 2007, 44, 492.

-
- [137] P.G. Steinherz, N. Shukla, R. Kobos, S. Latcha, *Blood Cancer*, 2010, 55, 196.
- [138] B.G. Anderson, W.E. Bauta, W.R. Cantrell, T. Engles, D.P. Lovett, *Org. Proces. Res. Dev.*, 2008, 12, 1229.
- [139] T.M. Bryan, T.R. Cech, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1999, 11, 318.
- [140] M. Mason, A. Schuller, E. Skordalakes, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2011, 21 92.
- [141] N.H. Campbell, D.L. Smith, A.P. Reszka, S. Neidle, D. O'Hagan, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, 9, 1328.
- [142] M.O' Reilly, S.A. Teichmann, D. Rhodes, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1999, 9, 58.
- [143] S. Neidle, G.N. Parkinson, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2003, 13, 275.
- [144] S.M. Haider, S. Neidle e G.N. Parkinson, *Biochimie*, 2011, 93, 1239.
- [145] R.J. Harrison, S.M. Gowan, L.R. Kelland, S. Neidle *Bioorgan Med Chem Lett.*, 1999, 9, 2463.
- [146] M. Wainwright, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2001, 47, 1.
- [147] P. Belmont, J. Bosson, T. Godet, M. Tiano, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, 2007, 7, 139.
- [148] M. Gunaratnam, O. Greciano, C. Martins, A.P. Reszka, C.M. Schultes, H. Morjani, J.-F. Riou, S. Neidle, *Biochem. Pharmacol.*, 2007, 7, 679.
- [149] R.J. Harrison, S.M. Gowan, L.R. Kelland, S. Neidle, *Bioorg. Med. Chem. Letters*, 1999, 9, 2463.
- [150] M.A. Read, A.A. Wood, J.R. Harrison, S.M. Gowan, L.R. Kelland, H.S. Dosanjh, S. Neidle, *J. Med. Chem.*, 1999, 42, 4538.

- [151] M.A. Read, R.J. Harrison, B. Romagnoli, F.A. Tanious, S.H. Gowan, A. Reszka, *P. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 2001, 98, 4844.
- [152] S. Sparapani, S.M. Haider, F. Doria, M. Gunaratnam, S. Neidle, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132, 12263.
- [153] S.M. Haider, G.N. Parkinson, S. Neidle, *J. Mol. Biol.*, 2003, 326, 117.
- [154] N.H. Campbell, G.N. Parkinson, A.P. Reszka, S. Neidle, *J. Amer. Chem. Soc.*, 2008, 130, 6722.
- [155] N.H. Campbell, M. Patel, A.B. Tofa, R. Ghosh, G.N. Parkinson, S. Neidle, *Biochemistry*, 2009, 48, 1675.
- [156] Y.T. Fu, B.R. Keppler, J. Soares, M.B. Jarstfer, *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, 17, 2030.
- [157] A.N. Lane, J.B. Chaires, R.D. Gray, J.O. Trent, *Nucleic Acids Res.*, 2008, 36, 5482.
- [158] J.-L. Mergny, A.T. Phan, L. Lacroix, *FEBS Lett.*, 1998, 435, 74.
- [159] P.A. Rachwal, K.R. Fox, K.R., *Methods*, 2007, 43, 291.
- [160] J.-L. Mergny, J.-C. Maurizot, *ChemBioChem*, 2001, 2, 124.
- [161] A. Guédin, L. Lacroix, J.-L. Mergny, *Methods Mol. Biol.*, 2010, 613, 25.
- [162] C.M. Lombardo, I.S. Martínez, S. Haider, V. Gabelica, E. De Pauw, J.E. Moses, S. Neidle, *Chem. Commun.*, 2010, 46, 9116.
- [163] A. Gringauz, *Introduction to Medicinal Chemistry. How Drug Act and Why*, Wiley-VCH: New York, 1997. p. 34.
- [164] H. Gao, W.A. Denny, R. Garg, C. Hansch, *Chem.-Biol. Inter.*, 1998, 116, 157.
- [165] S.M. Gasper, G.B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, 121, 12762.

-
- [166] B.C. Baguley, L.P.G. Wakelin, J.D. Jacintho, P. Kovacic, *Curr. Med. Chem.*, 2003, 10, 2643.
- [167] W. Saenger, *Principles of nucleic acid structure*, Springer-Verlag New York, 1984.
- [168] S. Arnott, D.W.L. Hukins, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1972, 47, 1504.
- [169] A.J.F. Griffiths, W.M. Gelbart, J.H. Miller, R.C. Lewontin, *Modern Genetic Analysis*, W.H. Freeman & Co., New York, 1999.
- [170] J. Cadet, , *CLEFS CEA*, SPRING, 2000, 43, 10.
- [171] M.F. Denissenco, A. Pao, M. Tang, G.P. Pfeifer, *Science*, 1996, 274, 430.
- [172] D. Sidranky, *Curr. Opin. Oncol.*, 1995, 7, 229.
- [173] D.C. Malins, N.L. Polissar, S.J. Gunselman, *P. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1996, 93, 2557.
- [174] A.M. Oliveira-Brett, J.A.P. Piedade, S.H.P. Serrano, *Electroanalysis*, 2000, 12, 969.
- [175] R.A. Floyd, J.J. Watson, J. Harris, M. West, P.K. Wong, *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 1986, 137, 841.
- [176] P. Di Mascio, P.C. Teixeira, J. Onuki, M.H.G. Medeiros, D. Dornemann, T. Douki, J. Cadet, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000, 373, 368.
- [177] C.G. Fraga, J. Onuki, F. Lucesoli, E.J.H. Bechara, P. Di Mascio, *Carcinogenesis*, 1994, 15, 2241.
- [178] P.C. Teixeira, J. Onuki, M.H.G. Medeiros, D. Dornemann, P. Di Mascio, *Biol. Chem.*, 2001, 382, 913.
- [179] B.N. Ames, *Mutat. Res.*, 1989, 214, 41.
- [180] R.C. Gupta, W.K. Lutz, *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.*, 1999, 424, 1.

- [181] J. Anastassopoulou, *J. Mol. Struct.*, 2003, 651, 19 (2003)
- [182] M.C. Perry, *The Chemotherapy Source Book*, Baltimore, USA, 1996.
- [183] C.M.A. Brett, A.M. Oliveira-Brett, em *Encyclopedia of Electrochemistry*, 3, eds A.J.B.A.M. Stratmann, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany, 2003, p. 105.
- [184] D. Wang, D.A. Kreutzer, J.M. Essigmann, *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.*, 1998, 400, 99.
- [185] D. A. Kreutzer, J.M. Essigmann, *P. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1998, 95, 3578.
- [186] J. Tchou, H. Kasai, S. Shibutani, M.H. Chung, J. Laval, A P. Grollman, S. Nishimura, *P. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1991, 88, 4690.
- [187] M.L. Michaels, J. Tchou, A.P. Grollman, J.H. Miller, *Biochemistry*, 1992, 31, 10964.
- [188] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, New York, 1999.
- [189] S.S. Wallace, *Free Radic. Biol. Med.*, 2002, 33, 1.
- [190] J. Cadet, T. Douki, D. Gasparutto, J.L. Ravanat, *Mutat. Res.* 2003, 531, 5.
- [191] E. Palecek, M. Fojta, F. Jelen, V. Vetterl, *The Encyclopedia of Electrochemistry, Bioelectrochemistry* 9, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Federal Republic of Germany, 2002.
- [192] A.M. Oliveira-Brett, S.H.P. Serrano, J.A.P. Piedade, *Comprehensive Chemical Kinetics, Applications of Kinetic Modelling* 37, Elsevier, Oxford, UK, 1999.
- [193] A.M. Oliveira-Brett, M. Vivan, I.R. Fernandes, J.A.P. Piedade, *Talanta*, 2002, 56, 959.

-
- [194] A.M. Oliveira-Brett, F.-M. Matysik, *Bioelectroch. Bioener.*, 1997, 42, 111.
- [195] A.M. Oliveira-Brett, V.C. Diculescu, J.A.P. Piedade, *Bioelectrochemistry*, 2002, 55, 61.
- [196] C.M.A. Brett, A.M. Oliveira-Brett, S.H.P. Serrano, *J. Electroanal. Chem.*, 1994, 366, 225.
- [197] A.M. Oliveira-Brett, F.-M. Matysik, *J. Electroanal. Chem.* 1997, 429, 95.
- [198] A.M. Oliveira-Brett, J.A.P. Piedade, L.A. Silva, V.C. Diculescu, *Anal. Bioch.*, 2004, 332, 321.
- [199] A.M. Chiorcea-Paquim, J. A.P. Piedade, R. Wombacher, A. Jaschke, A.M. Oliveira-Brett, *Anal. Chem.*, 2006, 78, 8256.
- [200] A.-M. Chiorcea, A. M. Oliveira Brett, *Bioelectrochemistry*, 2004, 63, 229.
- [201] A.M. Oliveira-Brett, V.C. Diculescu, A.M. Chiorcea-Paquim, S.H.P. Serrano em *Comprehensive Analytical Chemistry*, eds. S. Alegret, A. Merkoçi, 49, Elsevier, 2007.
- [202] A.M. Oliveira-Brett, em *Encyclopedia of Sensors*, eds C. A. Grimes, E. C. Dickey, M. V. Pishko, American Society Publishers USA, 2006.
- [203] A.M. Oliveira-Brett, A.-M. Chiorcea-Paquim, *Electrochem. Commun.*, 2003, 5, 178.
- [204] V.C. Diculescu, J.A.P. Piedade, A.M. Oliveira-Brett, *Bioelectrochemistry*, 2007, 70,141.
- [205] R.N. Goyal, N. Jain, D.K. Garg, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 1997, 43, 105.
- [206] R.N. Goyal, A. Kumar, A. Mittal, *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions*, 1991, 2, 1369.

- [207] A.-M. Chiorcea-Paquim, O. Corduneanu, S.C.B. Oliveira, V.C. Diculescu, A.M. Oliveira-Brett, *Electrochim. Acta*, 2009, 54, 1978.
- [208] E. Palecek, *Talanta*, 2002, 56, 809.
- [209] S.C.B. Oliveira, A.M. Oliveira-Brett, *Comb. Chem. High T. Scr.*, 2010, 13, 628.
- [210] C.M.A. Brett, A.M. Oliveira-Brett, *Electroquímica. Princípios, Métodos e Aplicações*, Oxford University Press, 1993.
- [211] C.M.A. Brett, A.M. Oliveira-Brett, *Electroanalysis*, Oxford University Press, 1998.
- [212] D.T. Fagan, I.F. Hu, T. Kuwana *Anal Chem.*, 1985, 57, 2759.
- [213] N.M. Pontikos, R.L. McCreery, *J. Electroanal. Chem.*, 1992, 324, 229.
- [214] P.T. Kissinger, W.R. Heineman *J. Chem. Educ.*, 1983, 60, 702.
- [215] P.T. Kissinger, W.R. Heineman em *Electroanalytical Chemistry*, Marcel Dekker, Inc., 1996.
- [216] J.J. O'Dea, A. Ribes, J.G. Osteryoung, *J. Electroanal. Chem.*, 1993, 345, 287.
- [217] J.J. Odea, M. Wojciechowski, J. Osteryoung, K. Aoki, *Anal. Chem.*, 1985, 57, 954.
- [218] J.J. Odea, J. Osteryoung, R.A. Osteryoung, *Anal. Chem.*, 1981, 53, 695.
- [219] S.C.B. Oliveira, V.C. Diculescu, G. Palleschi, D. Compagnone, A.M. Oliveira-Brett, *Anal. Chim. Acta*, 2007, 588, 283.
- [220] A.I. Cohen, A.D. Hartman, O.N. Hinsvark, P.F. Kraus, W. Zazulak, *J. Pharm. Sci.*, 1973, 62, 931.
- [221] E.J. Belair, J. Yelnosky, A.I. Cohen, *Br. J. Pharmacol.*, 1972, 45, 476.

-
- [222] M. Filipiak, *Anal. Sci.*, 2001, 17, i1667.
- [223] S.V. Jovanovic, S. Steenken, Y. Hara, M.G. Simic. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1996, 2, 2497.
- [224] A.M. Oliveira-Brett, A.-M. Chiorcea-Paquim, *Bioelectrochemistry*, 2005, 66, 117.
- [225] A.-M. Chiorcea-Paquim, T.S. Oretskaya, A.M. Oliveira-Brett, *Biophys Chem.*, 2006, 121, 131.
- [226] V.C. Diculescu, A. Militaru, A. Shah, R. Qureshi, L. Tugulea, A.M. Oliveira-Brett, *J. Electroanal. Chem.*, 2010, 647, 1.
- [227] A.K. Saxena, D. Singh, G. Singh, *Biomed. Res.*, 2009, 20, 28
- [228] J. Bartek, C. Lukas, J. Lukas, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2004, 5, 792.
- [229] S. Padmanabhan, D.N. Tripathi, A. Vikram, P. Ramarao, G.B. Jena, *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, 2009, 673, 43.
- [230] C. Keshava, N. Keshava, W.-Z. Whong, J. Nath, T.M. Ong, *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, 1998, 397, 221.
- [231] A. Lorico, G. Toffoli, M. Boiocchi, E. Erba, M. Broggin, G. Rappa, M. D'Incalci, *Cancer Res.*, 1988, 48, 2036.
- [232] Z. Kazimierzuk, J.A. Vilpo, F. Seela, *Helv. Chim. Acta* 1992, 75, 2289.
- [233] A. Tarasiuk, J. Skierski, Z. Kazimierzuk, *Arch. Immunol. Ther. Ex.*, 1994, 42, 13.
- [234] S.W.C. Hahn, S.A. Stewart, M.W. Brooks, S.G. York, E. Eaton, A. Kurachi, R.L. Beijersbergen, J.H.M. Knoll, M. Meyerson, R.A. Weinberg, *Nat. Med.*, 1999, 5, 1164.

- [235] A.M. Burger, F. Dai, C.M. Schultes, A.P. Reszka, M.J. Moore, J.A. Double, S. Neidle, *Cancer Res.*, 2005, 65, 1489
- [236] J.W. Shay, W.E. Wright, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2006, 5, 577.
- [237] D. Monchaud, M.-P. Teulade-Fichou, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, 6, 627.

