



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

RAYNNARIA COSTA DOS SANTOS

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DOS QUIMIOTERÁPICOS
ANTINEOPLÁSICOS IFOSFAMIDA E CICLOFOSFAMIDA COM O
DNA, UTILIZANDO BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS**

SÃO LUÍS - MA

2018

RAYNNARIA COSTA DOS SANTOS

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DOS QUIMIOTERÁPICOS
ANTINEOPLÁSICOS IFOSFAMIDA E CICLOFOSFAMIDA COM O
DNA, UTILIZANDO BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão – UFMA, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luiza Maria Ferreira Dantas

SÃO LUÍS - MA

2018

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

SANTOS, RAYNNARIA C.

ESTUDO DA INTERAÇÃO DOS QUIMIOTERÁPICOS ANTINEOPLÁSICOS
IFOSFAMIDA E CICLOFOSFAMIDA COM O DNA, UTILIZANDO
BIOSENSORES ELETROQUÍMICOS / RAYNNARIA C. SANTOS. - 2018.
82 p.

Orientador(a): LUIZA M. F. DANTAS.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Química/ccet, Universidade Federal do Maranhão, SÃO LUÍS,
2018.

1. BIOSENSOR. 2. CICLOFOSFAMIDA. 3. DNA. 4.
IFOSFAMIDA. I. DANTAS, LUIZA M. F. II. Título.

RAYNNARIA COSTA DOS SANTOS

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DOS QUIMIOTERÁPICOS
ANTINEOPLÁSICOS IFOSFAMIDA E CICLOFOSFAMIDA COM O
DNA, UTILIZANDO BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão – UFMA, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada em: 31/07/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Luiza Maria Ferreira Dantas/Presidente

Departamento de Tecnologia Química/UFMA

Prof^a. Dr^a. Gilvanda Silva Nunes/Membro titular

Departamento de Tecnologia Química/UFMA

Prof^a. Dr^a. Kiany Sirley Brandão Cavalcante/ Membro titular

Departamento de Química/UFMA

**Seu futuro depende de muitas coisas,
mas principalmente de VOCÊ!**

Frank Tyger

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por me encorajar nos momentos difíceis em que achei que não teria forças para prosseguir. Tu sopraste ao meu ouvido a palavra esperança e tocaste no meu coração.

À Universidade Federal do Maranhão – UFMA, pela oportunidade de realizar o Mestrado, proporcionando não só o conhecimento técnico e científico, mas, também de vida.

Aos órgãos de fomento, FAPEMA e CAPES, pelo auxílio e bolsa concedidos, que foram de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Química da UFMA, pela atenção, apoio e profissionalismo aos seus alunos.

Ao Prof^o Dr. Auro Tanaka, pela oportunidade de fazer parte do seu laboratório de eletroquímica (LELQ), que me acolheu e foi sempre solícito no que foi preciso para este trabalho.

À minha orientadora, Prof^a Dra. Luiza Dantas, pela paciência, pois sei que não foi fácil. E, acima de tudo, por acreditar que poderíamos chegar até aqui.

À minha mãe, por estar ao meu lado, me apoiando, e, sobretudo, pelas lições de vida e amor transmitidas ao longo da minha vida.

Ao meu pai, que sempre foi minha inspiração para continuar essa caminhada.

Aos meus amigos e companheiros, Paulina, Allan, Elizaura, Willian, Geysel e Herbert. E a todos os demais amigos do laboratório de eletroquímica (LELQ), em especial a Adriana.

À Prof^a Dr^a Mayara Lima, pela parceria e colaboração.

Aos meus parceiros do LabGeM, Maydson, Hugo, Marcos e Israel, que contribuíram de forma direta para o desenvolvimento deste trabalho.

Ninguém vence sozinho.

A todos o meu muito obrigada!

RESUMO

A utilização dos quimioterápicos ifosfamida (IF) e ciclofosfamida (CF) trazem efeitos indesejados, como morte celular (citotóxico) e danos às células de DNA (genotóxico), pois, o DNA é o principal alvo de ataques por diferentes tipos de compostos. Devido tais efeitos, torna-se necessário estudar a interação dos compostos alquilantes com o DNA. Portanto, o presente trabalho baseia-se da interação eletroquímica entre a IF e CF com *dsDNA* (do inglês *double stranded Desoxyribonucleic Acid*) tendo como objetivo observar os possíveis danos causados nas bases nitrogenadas do *dsDNA*. Para esse estudo, um sensor de carbono vítreo modificado com *dsDNA* e soluções incubadas em *dsDNA* foram empregadas. A interação dos compostos IF e CF e de seus produtos de degradação com o *dsDNA* foi investigada *in vitro* por voltametria de pulso diferencial (VPD) e evidenciada mediante eletroforese e cometa alcalino. No estudo eletroquímico, observou-se uma condensação da cadeia polinucleotídica, guanosina (*dGua*) e adenosina (*dAdo*), que se compactaram ao interagir com o quimioterápico, dificultando o seu aparecimento na superfície do eletrodo. Também, o surgimento de novos picos, foram indicativo de uma forte interação e possível intercalação da IF e CF e seus produtos de degradação na fita dupla do DNA, respectivamente, além de modificar a conformação das bases do *dsDNA*. A guanina livre também foi observada em todos os estudos de interação, já que é facilmente oxidada, sendo alvo principal dos danos causados por oxidação ao *dsDNA*. Porém, o não aparecimento do biomarcador 8-oxoGua, proveniente da oxidação da guanina livre, não indicou que os compostos não provocaram danos oxidativos ao *dsDNA* nas condições avaliadas, pois, a IF e CF *in vitro* não sofreram o processo de metabolização hepática através da enzima P450, tornando inativa a oxidação deste biomarcador na superfície do eletrodo. Os estudos da eletroforese e cometa comprovaram a ausência de fragmentação (danos) *in vitro*. O comportamento eletroquímico da IF e CF, antes e após a degradação em solução aquosa, foram então estudados; no entanto, tais compostos passavam a superfície do eletrodo, dificultando a sua determinação e/ou conclusão do estudo eletroquímico. O biossensor de *dsDNA*, aplicado pela vez para o estudo da interação com IF e CF, mostrou-se sensível e seletivo garantindo forte interação com os nucleotídeos.

Palavras-chave: Ifosfamida, Ciclofosfamida, DNA, Biossensor

ABSTRACT

The use of the chemotherapy drugs, ifosfamide (IF) and cyclophosphamide (CP) have undesirable effects, such as cell death (cytotoxic) and damage to DNA cells (genotoxic), since DNA is the main target of attack by different types of compounds. Because of such effects, it is necessary to study the interaction of alkylating compounds with DNA. Therefore, the present work is based on the electrochemical interaction between IF and CP with *dsDNA* (*double stranded Desoxyribonucleic Acid*) in order to observe the possible damages caused in the *dsDNA* nitrogen bases. For this study, a modified glass carbon sensor with *dsDNA* and solutions incubated in *dsDNA* were employed. The interaction of the IF and CP compounds and their degradation products with *dsDNA* was investigated *in vitro* by differential pulse voltammetry (DPV) and evidenced by electrophoresis and alkaline comet. In the electrochemical study, a condensation of the polynucleotide chain, guanosine (*dGua*) and adenosine (*dAdo*) was observed, which compacted when interacting with the chemotherapeutic agent, making it difficult to appear on the surface of the electrode. Also, the emergence of new peaks were indicative of a strong interaction and possible intercalation of the IF and CP and their degradation products in the double strand of DNA respectively, in addition to modifying the conformation of the *dsDNA* bases. Free guanine was also observed in all interaction studies, since it is easily oxidized, being the main target of the damage caused by oxidation to the *dsDNA*. However, the non-appearance of the 8-oxoGua biomarker from the free guanine oxidation does not indicate that the compounds do not cause oxidative damage to *dsDNA* under the conditions evaluated, since IF and CP *in vitro* did not undergo the hepatic metabolization process through enzyme P450, rendering the oxidation of this biomarker inactive on the surface of the electrode. Electrophoresis and comet studies have demonstrated the absence of *in vitro* fragmentation (damage). The electrochemical behavior of the IF and CP, before and after the degradation in aqueous solution, were then studied; however, such compounds passivate the surface of the electrode, making it difficult to determine and/or to complete the electrochemical study. The *dsDNA* biosensor, applied at the same time to the study of the interaction with IF and CF, it was sensitive and selective for this study guaranteeing strong interaction with the nucleotides.

Keywords: Ifosfamide, Ciclophosphamide, DNA, Biosensor

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xv
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVO	20
2.1 Geral	20
2.2 Específicos.....	20
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
3.1 Quimioterapia	21
3.2 Ifosfamida e Ciclofosfamida	22
3.3 Métodos Analíticos para Determinação da IF e CF	26
3.3.1 Método eletroquímico	28
3.4 Interação Fármaco – DNA (Ácido Desoxirribonucleico) e os danos causados 29	
3.5 Propriedades Eletroquímicas do DNA	33
3.6 Biossensores Eletroquímicos de DNA	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Reagentes, Soluções e Demais Materiais	37
4.2 Equipamentos e Instrumentação	37
4.3 Estudo do Comportamento Eletroquímico da IF e CF	39
4.4 Degradação Química da Ifosfamida e Ciclofosfamida	39
4.5 Limpeza da Superfície do Eletrodo de Carbono Vítreo	39
4.6 Tratamento dos Dados Voltamétricos	40
4.7 Estudo da Interação da IF e CF e seus Produtos de Degradação com o dsDNA	40
4.7.1 Preparação do biossensor eletroquímico de dsDNA e procedimentos de incubação.....	40

4.7.2	<i>Incubação do dsDNA com IF e CF e seus produtos de degradação em solução</i>	42
4.7.3	<i>Controle do dsDNA</i>	43
4.8	Eletroforese	43
4.9	Teste Cometa	44
4.9.1	<i>Obtenção das amostras celulares para o teste Cometa in vitro.</i>	44
4.9.2	<i>Procedimento experimental para o teste Cometa in vitro.</i>	45
4.9.3	<i>Classificação do potencial genotóxico</i>	47
4.9.4	<i>Análise estatística dos resultados do teste Cometa</i>	47
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	Investigação das Propriedades redox da Ifosfamida	49
5.2	Investigação das Propriedades redox da Ciclofosfamida	50
5.3	Comportamento Eletroquímico da IF e CF Degradada	52
5.4	Interação da Ifosfamida e ciclofosfamida com o DNA	53
5.4.1	<i>Estudo da interação da IF–dsDNA e dIF–dsDNA em solução</i>	54
5.4.2	<i>Estudo da interação da IF-dsDNA e dIF-dsDNA utilizando biossensores de dsDNA</i>	55
5.4.3	<i>Estudo da interação da IF com dsDNA quando o composto começa a degradar</i>	57
5.4.4	<i>Estudo da interação da CF–dsDNA e dCF–dsDNA em solução</i>	58
5.4.5	<i>Estudo da interação da CF e dCF com dsDNA utilizando biossensores de dsDNA</i>	59
5.5	Eletroforese da IF, dIF, CF e dCF com o dsDNA	61
5.6	Teste do Cometa in vitro	62
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
	TRABALHOS FUTUROS	66
	REFERÊNCIAS	67
	APÊNDICES	76

Apêndice 1	77
Apêndice 2	78
Apêndice 3	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura geral de uma mostarda nitrogenada[6]	22
Figura 2. Estrutura química da IF e CF [41].	23
Figura 3. Biotransformação da ifosfamida [11].....	24
Figura 4. Biotransformação da ciclofosfamida [37].....	25
Figura 5. Estrutura da dupla fita do DNA.[69].....	30
Figura 6. Mecanismo de Alquilação da guanina[76]	32
Figura 7. Mecanismos de oxidação para guanina [74].....	32
Figura 8. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos sobre um eletrodo de carbono vítreo em solução tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ pH 4,5 com: 60 µg mL ⁻¹ de ssDNA (•••) 1 ^a e (—) 10 ^a varredura, e 60 µg mL ⁻¹ de dsDNA (••) 1 ^a e (—) 40 ^a varredura de potencial [67]	33
Figura 9. Representação esquemática do sistema eletroquímico.	38
Figura 10. Representação esquemática do preparo do biossensor de dsDNA e incubação do biossensor com IF, CF, dIF ou dCF 0,5 mmol L ⁻¹	41
Figura 11. Esquema da solução contendo dsDNA 100 µg mL ⁻¹ e IF/CF/produto seus produtos de degradação 0,5 mmol L ⁻¹ incubada em tampão acetato pH 4,5, no tempo compreendido de 0 à 96 horas.....	42
Figura 12. Representação esquemática do procedimento experimental do teste cometa <i>in vitro</i>	46
Figura 13. Fotomicrografia das diferentes classes de pesquisa por microscopia de fluorescência. Aumento de 400x [108].....	47
Figura 14 (A) Voltamogramas cíclicos obtidos sobre a superfície do ECV realizados em solução tampão fosfato pH 7,0 (—) na ausência e (—) presença de IF 1,0 mmol L ⁻¹ , com v = 50 mV s ⁻¹ . (B) Voltamogramas cíclicos da IF obtidos após o (—)1 ^o , (—) 2 ^o e (—) 3 ^o ciclo; v = 50 mV s ⁻¹ . Destaque para o pico 1 _a , equivalente ao pico anódico da IF.	49
Figura 15. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida sobre ECV realizados em solução tampão fosfato pH 7,0 (—) na ausência e (—) presença de IF 1,0 mmol/L 1 _a . ΔEs = 2 mV, ΔEt = 70 ms e v = 5 mV s ⁻¹ . Destaque para o pico 1 _a , equivalente ao pico anódico da IF.	50

Figura 16 (A) Voltamogramas cíclicos obtidos sobre a superfície do ECV realizados em solução tampão fosfato pH 7,0 (—) na ausência e (—) presença de CF 1 mmol L⁻¹, com $v = 50$ mV s⁻¹. **(B)** Voltamogramas cíclicos da CF obtidos após o (—) 1º, (—) 2º e (—) 3º ciclo; $v = 50$ mV s⁻¹. Destaque para o pico 1_a, equivalente ao pico anódico da CF. 51

Figura 17. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida sobre ECV realizados em solução tampão fosfato pH 7,0 (—) na ausência e (—) presença de CF 1,0 mmol/L 1_a. $\Delta E_s = 2$ mV, $\Delta E_t = 70$ ms e $v = 5$ mV s⁻¹. Destaque para o pico 1_a, equivalente ao pico anódico da CF. 51

Figura 18 (A) Voltamograma de pulso diferencial com linha de base corrigida da dIF 1 mmol L⁻¹ (degradada por 47 dias) obtido sobre a superfície do ECV em tampão fosfato pH 7,0. **(B)** Voltamograma de pulso diferencial com linha de base corrigida da dCF 1 mmol L⁻¹ (degradada por 47 dias) obtido sobre a superfície do ECV em tampão fosfato pH 7,0. Destaque para os picos anódicos 2_a e 3_a, referentes à hidroxilação da IF e CF, respectivamente. 52

Figura 19. Voltamograma de pulso diferencial com linha de base corrigida de uma solução de dsDNA 100 µg mL⁻¹ em tampão acetato pH 4,5 sobre o ECV, na ausência do fármaco, utilizado como controle. Destaque para os picos anódicos de desoxiguanosina (dGua) e desoxiadenina (dAdo). 53

Figura 20 (A) Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida em uma solução contendo dsDNA 100 µg mL⁻¹ e IF 0,5 mmol L⁻¹ em tampão acetato (pH 4,5), sobre o ECV, com dsDNA antes – controle – (—) e após diferentes tempos de incubação 0 (—), 24 (—), 48 (—), 72 (—) e 96h (—). **(B)** dIF 0,5 mmol L⁻¹, degradada por 47 dias, com dsDNA antes – controle (—) e após diferentes tempos de incubação: 1h (—); 24h (—); 48h (—); 72h (—) e 96h (—). Destaque para os picos anódicos da guanina (Gua), desoxiguanosina (dGua) e desoxiadenina (dAdo). 55

Figura 21.(A) Voltamograma de pulso diferencial com linha de base corrigida para um biossensor de DNA 100 µg mL⁻¹ de controle em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 4,5 sobre o eletrodo de carbono vítreo ECV antes (—) e após diferentes tempos de incubação em solução de IF 0,5 mmol L⁻¹, 0 (—), 24 (—), 48 (—), 72 (—), 96h (—) **(B)** dIF 0,5 mmol L⁻¹ após 47 dias de degradação, com dsDNA antes – controle (—) e após diferentes tempos de incubação: 0 (—), 24 (—), 48 (—), 72 (—), 96h (—). Destaque para os picos anódicos da guanina (Gua), desoxiguanosina (dGua) e desoxiadenina (dAdo). 56

Figura 22. Voltamogramas de pulso diferencial realizado em solução tampão acetato pH 4,5 sobre o ECV com linha de base corrigida de uma solução contendo *dsDNA* 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (—) e da mistura de *dsDNA* 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + IF 0,5 mmol L^{-1} após 196h de incubação (—). Destaque para os picos anódicos da guanina (Gua), da adenina (Ado), desoxiguanosina (*dGua*) e desoxiadenina (*dAdo*)..... 58

Figura 23. (A) Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida de uma solução de *dsDNA* 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e CF 0,5 mmol L^{-1} em tampão acetato pH 4,5 sobre o ECV. Com *dsDNA* 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sendo controle (—); em solução nos tempos de 1 (—); 24 (—); 48 (—); 72 (—) e 96h (—) de incubação. (B) dCF 0,5 mmol L^{-1} , degradada por 47 dias, com *dsDNA* antes – controle (—) e após diferentes tempos de incubação: 1h (—); 24h (—); 48h (—); 72h (—) e 96h (—). Destaque para os picos anódicos da guanina (Gua), desoxiguanosina (*dGua*) e desoxiadenina (*dAdo*)..... 59

Figura 24 (A) Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida para um biossensor de *dsDNA* 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de controle (—) em tampão acetato pH 4,5 sobre o eletrodo de carbono vítreo ECV e após diferentes tempos de incubação em solução de CF 0,5 mmol L^{-1} após 47 dias de degradação, 0h (—), 24h (—), 48h (—), 72h (—), 96h (—). (B) dCF 0,5 mmol L^{-1} após 47 dias de degradação, com *dsDNA* antes – controle (—) e após diferentes tempos de incubação: 0 (—), 24 (—), 48 (—), 72 (—), 96h (—). Destaque para os picos anódicos da guanina (Gua), desoxiguanosina (*dGua*) e desoxiadenina (*dAdo*)..... 60

Figura 25. Eletroforese em gel de agarose, em DNA 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de controle negativo (CN), em solução aquosa de (a)IF, (b) dIF, (c) CF e (d) dCF 0,5 mmol L^{-1} nos tempos de 0, 24, 48 e 72h..... 61

Figura 26. Escores de dano de DNA e frequência de classes presentes nos nucleóides de leucócitos de sangue periférico (PBMC) em indivíduos saudáveis após 3h e 24h de exposição com solução de 0,5 mol L^{-1} IF e CF. Destaque para CN- controle negativo; CP- controle positivo; IF- ifosfamida, CF- ciclofosfamida, C0- classe 0; C1- classe 1; C2- classe 2; C3- classe 3 e C4- classe 4. ns- diferenças estatisticamente não significativas; * $p < 0,05\%$ 63

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ade	Adenina
CF	Ciclofosfamida
CG-EM	Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas
CG-IT/EM ²	Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas de íons-trap
CG-EM/EM	Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas em Tandem
CG-PND	Cromatografia a gás acoplada a detector seletivo: fósforo-nitrogênio
CLAE-EM/EM	Cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massas – espectrometria de massas
CLAE-UV	Cromatografia a líquido de alta eficiência com detector de UV-vis
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
CTC	Complexo de transferência de carga
CYP3A4	Citocromo P450
<i>dAdo</i>	Desoxiadenina
<i>dCF</i>	Ciclofosfamida degradada
<i>dGua</i>	Desoxiguanosina
<i>dIF</i>	Ifosfamida degradada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>dsDNA</i>	Ácido desoxirribonucleico de cadeia dupla
ECV	Eletrodo de carbono vítreo
DP	Desvio padrão
EF	Método Espectrofotométrico
EPC	Eletrodo de pasta de carbono
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
Gua	Guanina
G ₂	Fase de preparação da divisão celular
IF	Ifosfamida
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MIP	Polímero de impressão molecular

POA	Processo de oxidação avançada
PCA	Ácido p-cloranílico
PGE	Eletrodo de lápis de grafite
P450	Enzima microssômica hepática
PVC	Cloreto de poli vinila
RNA	Ácido ribonucleico
RMN	Ressonância magnética nuclear
<i>ssDNA</i>	Ácido desoxirribonucleico de cadeia simples
VPD	Voltametria de pulso diferencial
VC	Voltametria cíclica
ϵ	Absortividade
8-oxoGua	8-oxoguanina

1. INTRODUÇÃO

A quimioterapia é a principal opção no tratamento contra o câncer; no entanto, apresenta muitas reações adversas, pois os medicamentos utilizados afetam as células em todas as fases do ciclo celular, produzindo efeitos tóxicos bastante agressivos. Isso ocorre porque os quimioterápicos atuam tanto nas células neoplásicas como nas células normais em divisão [1-6].

Entre os quimioterápicos, os agentes alquilantes são os mais utilizados, sendo classificados de ciclo celular não específico (CCNE). Esses compostos têm a capacidade de exterminar as células tumorais, independentemente de estar no ciclo celular ou em repouso [6-8]. Os principais compostos inseridos nesta classe dos agentes alquilantes incluem as mostardas nitrogenadas (ciclofosfamida e ifosfamida), a mostarda fenilalanina, os alquilsulfonatos (bussulfan), as nitrosuréias, os complexos de coordenação de platina (a cisplatina e a carboplatina) e os antibióticos naturais (mitomicina, bleomicina, dentre outros) [2,8].

Estes medicamentos têm o potencial de formar ligação cruzada com o DNA, impedindo sua replicação e, conseqüentemente, destruindo as células em repouso ou em processo de divisão ativa, o que resulta na sua citotoxicidade [2,6, 9]. Os agentes alquilantes são capazes de substituir na molécula, um átomo de hidrogênio por um radical alquil, ligando-se ao DNA, de modo a impedir a separação dos dois filamentos do DNA na dupla hélice espiralar, resultando na replicação desenfreada das células [7,8,10].

O processo de alquilação das mostardas nitrogenadas no DNA dá se por meio das ligações interfilamentares com os genes, sendo metabolizados pelas fosfamidases (enzima microsomal hepática), para que seus metabólitos possam exercer o efeito alquilante celular [6, 7].

A ifosfamida (IF) é um quimioterápico da classe dos agentes alquilantes e apresenta, em sua estrutura, um átomo quiral, definido como mistura racêmica dos enantiômeros (+)-R e (-)-S [7,11]. O composto tem sido amplamente utilizado no tratamento de uma variedade de tumores sólidos, incluindo os do colo do útero, endométrio, pulmão, ovário, testículos e próstata [12, 13]. Seu modo primário de ação é baseado na sua interação com o DNA, resultando em divisão celular reprimida [6,14].

O tratamento com a IF também resulta em reações adversas como mielossupressão (leucopenia, trombocitopenia e anemia), náusea e vômitos, as quais limitam o uso do

quimioterápico [4, 5, 15]. A leucopenia é uma forma severa de mielossupressão e representa risco grave ao paciente, pois pode diminuir a imunidade celular, tornando-o suscetível a infecções graves [16]. Contudo, o que mais preocupa são os efeitos citotóxicos e genotóxicos que este pró-fármaco traz às células do DNA [15].

A ciclofosfamida (CF), agente antineoplásico isômero da ifosfamida, também apresenta propriedades alquilantes, complexando-se com o DNA sem distinção entre células normais e cancerosas. Inúmeros relatos na literatura apontam para o potencial carcinogênico destes fármacos, possuindo efeitos citotóxicos [7].

A CF é um imunossupressor, com uso direcionado para a nefrite lúpica [7, 17, 18]. Outras manifestações mais graves do lúpus eritematoso sistêmico (LES), uma doença neuropsiquiátrica, também podem ser tratadas com essa mesma medicação, podendo ser administrada tanto por via oral quanto endovenosa intermitente [17, 19]. Náuseas, vômitos, cistite hemorrágica e carcinoma de bexiga, além de outras neoplasias, são citados na literatura como possíveis efeitos adversos [20, 21].

A IF e CF e seus metabólitos (pró-fármacos degradados) apresentam efeito carcinogênico. O metabólito denominado mostarda fosforamida, advindo da IF e CF, liga-se a muitas estruturas moleculares intracelulares, incluindo os ácidos nucleicos. Sua ação citotóxica deve-se principalmente ao entrecruzamento da cadeia de DNA e RNA, assim como à inibição da síntese de proteínas [20-23]. Tal metabólito é bem absorvido no trato gastrintestinal, com baixa associação às proteínas, metabolizando-se no fígado [22].

Os citotóxicos da IF e CF, não estão presentes só na ingestão direta do quimioterápico, por ocasião do combate ao câncer, mas podem ser encontrados também no ambiente, atuando de forma direta ou indireta nos seres vivos. Eles afrontam os ecossistemas por meio das águas residuais, efluentes de estação de tratamento, esgotos, sedimentos e rios, causando danos nas bases do DNA da biota aquática [7].

Baseado na alta toxicidade dos pró-fármacos IF e CF, vários estudos tornaram-se necessários para avaliar o metabolismo de interação destes em pacientes ou profissionais expostos. As técnicas eletroquímicas tem sido importantes ferramentas no estudo da interação entre o *dsDNA* com tais quimioterápicos [24, 25].

Devido à sua alta sensibilidade e especificidade, as técnicas eletroquímicas permitem observar interações dos compostos com a dupla fita do DNA, as mudanças de conformações das bases nitrogenadas e a intercalação dos compostos, bem como avaliar as ligações formadas.

Diante dessas possibilidades, vários autores mostraram-se interessados em desenvolver biossensores eletroquímicos a base de *dsDNA* para diagnósticos rápidos, fáceis e baratos das doenças causadas por mutações dos genes. Em comparação com outras técnicas - microscopia de força atômica e métodos ópticos com fluorescência [26,27], os biossensores mostraram-se mais sensíveis para detectar pequenas perturbações na estrutura da dupla hélice e investigar os possíveis danos oxidativos causados ao DNA [28-31].

Assim, no presente trabalho foi desenvolvido um biossensor eletroquímico, combinado a um componente biológico de *dsDNA* que interage com o substrato alvo, CF e IF e seus metabólitos, permitindo o reconhecimento das bases nitrogenadas imobilizadas na superfície do eletrodo, bem como o estudo do mecanismo de ação e interação das bases oxidadas do *dsDNA*.

2. OBJETIVO

2.1 Geral

Desenvolver um biossensor eletroquímico à base de DNA de dupla hélice, que seja suficientemente sensível, seletivo e estável, e possa ser empregado no estudo dos mecanismos de interação entre o DNA e os pró-fármacos ifosfamida e ciclofosfamida, bem como dos seus produtos de degradação.

2.2 Específicos

- ✓ Investigar as propriedades redox da ifosfamida e ciclofosfamida sobre eletrodo de carbono vítreo (ECV), utilizando voltametria cíclica (VC) e voltametria de pulso diferencial (VPD);
- ✓ Desenvolver e aplicar biossensores eletroquímicos à base de DNA, desenvolvidos na investigação da interação da IF e CF com o DNA;
- ✓ Evidenciar a formação de possíveis danos ao DNA, em razão da presença dos pró-fármaco, mediante eletroforese e Cometa.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Quimioterapia

A quimioterapia é o método que utiliza substâncias químicas sintéticas (quimioterápicos), isoladas ou em combinação, com a finalidade de destruir patógenos infecciosos no tratamento de doenças causadas por agentes biológicos. Esta técnica pode ser empregada no trato curativo ou paliativo, dependendo do tipo do tumor, da extensão da doença e da condição do paciente [1, 32]. Os quimioterápicos, também denominados de agentes antineoplásicos, atuam em nível celular, interferindo no seu processo de crescimento e divisão [33].

Os antineoplásicos atuam destruindo células em processo de divisão desordenada, a fim de evitar ou inibir o crescimento acelerado e a disseminação de tumores. Como algumas células do nosso corpo crescem mais rápida do que outras – folículos capilares, epitélio intestinal e células do sistema imunológico – e esse tratamento ser baseado na destruição de células que se multiplicam de forma desordenada, isso explica porque os quimioterápicos não são seletivos, já que não diferenciam as células tumorais das células normais em estado de divisão ordenada [33]. Em geral, esses compostos são tóxicos aos tecidos de rápida proliferação caracterizados por alta atividade mitótica, e apresentam efeitos colaterais sobre todas as células desordenadas no organismo [34]. Devido a esses efeitos adversos, tornou-se necessário o estudo das ações desses quimioterápicos nos seres humanos submetidos a tratamentos paliativos [1].

Os quimioterápicos são divididos em várias categorias: agentes alquilantes, antibióticos com ação sobre ácidos nucleicos, inibidores mitóticos, antimetabólitos, modificadores da resposta biológica e compostos hormonais [6, 9]. O primeiro antineoplásico utilizado pertence à classe dos agentes alquilantes, o mecloroetamina, sendo empregado como arma química na primeira guerra mundial. Os cientistas observaram que a mecloroetamina provocou danos sobre as células de proliferação rápida. Apesar da toxicidade dos fármacos provenientes da classe dos agentes alquilantes, estes constituem a base da maioria dos tratamentos contra o câncer, tendo como finalidade proteger um grupo funcional reativo [35].

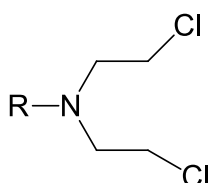
Os agentes alquilantes são bastantes reativos, capazes de substituir, em outra molécula, um átomo de hidrogênio por um radical alquil. Produzem ligações covalentes do grupo alquil com moléculas celulares e se ligam facilmente a grupos fosfatos, aminos, hidroxilas e imidazólicos, encontrados nos ácidos nucleicos, DNA e RNA [36]. O fármaco decompõe-se espontaneamente

em pH fisiológico, e os íons alquilam o DNA, afetando as células em todas as fases do ciclo celular de modo inespecífico, impedindo assim a duplicação do DNA e causando a morte celular [37].

A maioria dos agentes alquilantes citotóxicos é bifuncional, causando ligação e entrecruzamento intrafilamentos (intracadeias) na fita do DNA, interferindo na transcrição e replicação do ácido nucleico [6,7]. A farmacologia molecular e celular dos agentes alquilantes está bem estabelecida, e o mecanismo molecular de ação consiste na acilação com substituição nucleofílica, SN1 ou SN2 do DNA. Por ser extremamente nucleofílico, o nitrogênio na posição 7 (N7) da guanina é o principal alvo da alquilação no DNA. O impacto é observado durante a replicação na fase S, quando algumas áreas no DNA não estão pareadas sendo mais suscetíveis à alquilação, resultando no bloqueio em G₂ – fase de preparação da divisão celular - e morte celular apoptótica [38].

Dentro da classe dos agentes alquilantes encontram-se as mostardas nitrogenadas, (**Figura 1**) que são compostos monofuncionais (HN1) e bifuncionais (HN2), devido à sua capacidade de se ligar com a guanina por uma ou pelas duas vias do grupo cloroetil [39]. Esses agentes metabolizam-se no fígado e fazem ligações cruzadas interfilamentar com o DNA, alquilando a célula [6].

Figura 1. Estrutura geral de uma mostarda nitrogenada [6].



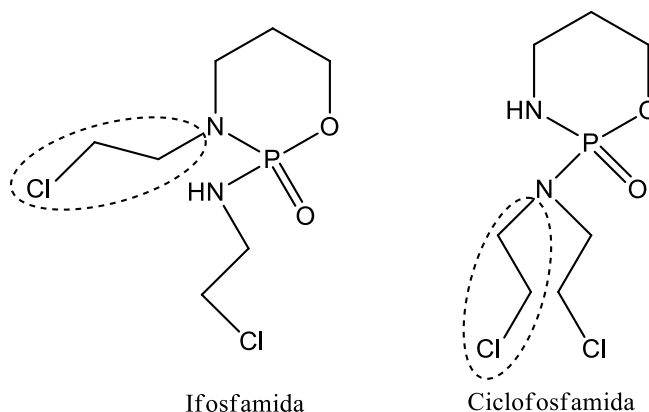
As mostardas nitrogenadas ligam-se facilmente às bases nitrogenadas, formando ligações cruzadas, o que torna importante o estudo da interação da ifosfamida e ciclofosfamida com o DNA.

3.2 Ifosfamida e Ciclofosfamida

Quimicamente, a ifosfamida e a ciclofosfamida são isômeros (C₇H₁₅C₁₂N₂O₂P), sendo diferenciados apenas pela posição do grupamento cloroetila. A ciclofosfamida possui os dois grupos cloroetila no átomo de nitrogênio exocíclico, enquanto um dos grupos 2-cloroetila da ifosfamida encontra-se ligado no nitrogênio do anel cíclico da oxazafosforina. A extensão da

formação dos metabólitos também difere na IF da CF, devido à mudança desse grupo cloroetila na estrutura dos compostos (**Figura 2**) [11, 40].

Figura 2. Estrutura química da IF e CF [41].



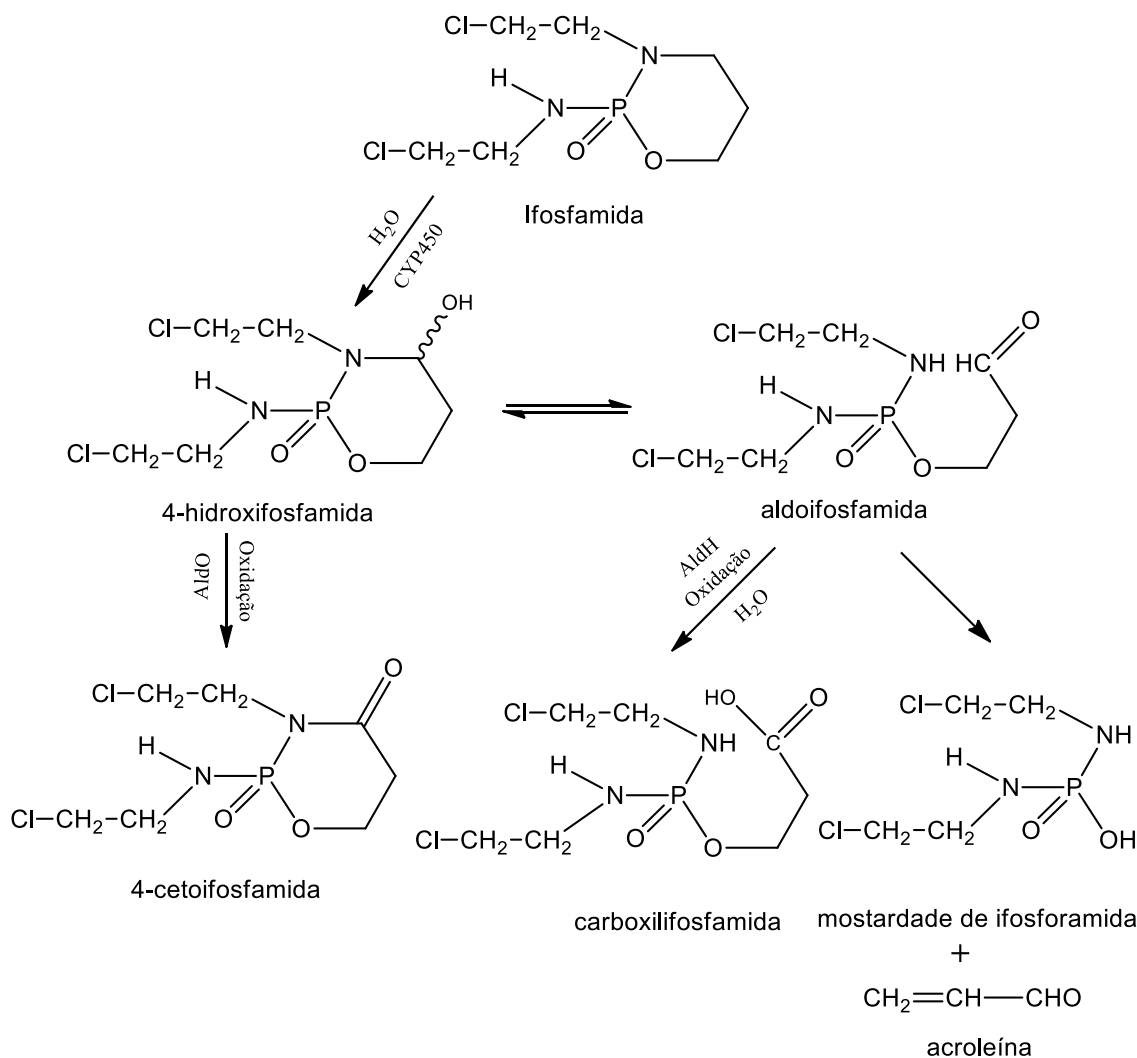
A IF é um agente citotóxico alquilante, pertencente ao grupo das oxazafosforina [42]. Foi sintetizada a partir de uma modificação química da ciclofosfamida, resultando em uma estrutura com maior solubilidade em água [43]. Tal quimioterápico é altamente reativo, tendo a capacidade de atacar grupos nucleofílicos específicos da molécula de DNA e células cancerosas, impedindo a divisão celular e fragmentando as hélices das bases nitrogenadas [7, 44].

A ifosfamida não tem propriedade ativa *in vitro* e sofre hidroxilação do carbono 4 do anel. Para adquirir atividade alquilante *in vivo*, esse quimioterápico precisa ser metabolizado em uma variedade de metabólitos ativos e potencialmente citotóxicos [45]. O metabolismo do composto é mediado por um processo complexo de ativação (fígado e tecidos), através das enzimas microsômicas das cadeias oxidativas do citocromo P450 [44, 46]. O metabolismo hepático deste fármaco possibilita a formação de grupo eletrófilo capaz de se ligar aos grupamentos nitrogenados dos ácidos desoxirribonucleicos e dos elementos proteicos, modificando a sua estrutura. Desta forma, essa droga produz ligação covalente com moléculas e estruturas fundamentais para o metabolismo e a sobrevivência da célula, exercendo os efeitos citotóxicos independente do ciclo celular e ativando atividades imunossupressoras [44, 47].

A conversão da IF em 4-OH-ifosfamida é catalisada pela isoforma CYP3A4 (citocromo P450), através da hidroxilação do átomo do carbono 4 do anel, impulsionada pela oxidase da função mista do citocromo, além de resultar na tautomerização de um anel aberto, a aldofosfamida. A 4-OH-ifosfamida é um metabólito instável, existindo em equilíbrio com a

aldofosfamida, levando à formação espontânea da mostarda da ifosforamida (metabólito ativo) e liberação de acroleína (metabólito urotóxico) (**Figura 3**) [7, 44-46].

Figura 3. Biotransformação da ifosfamida [11]



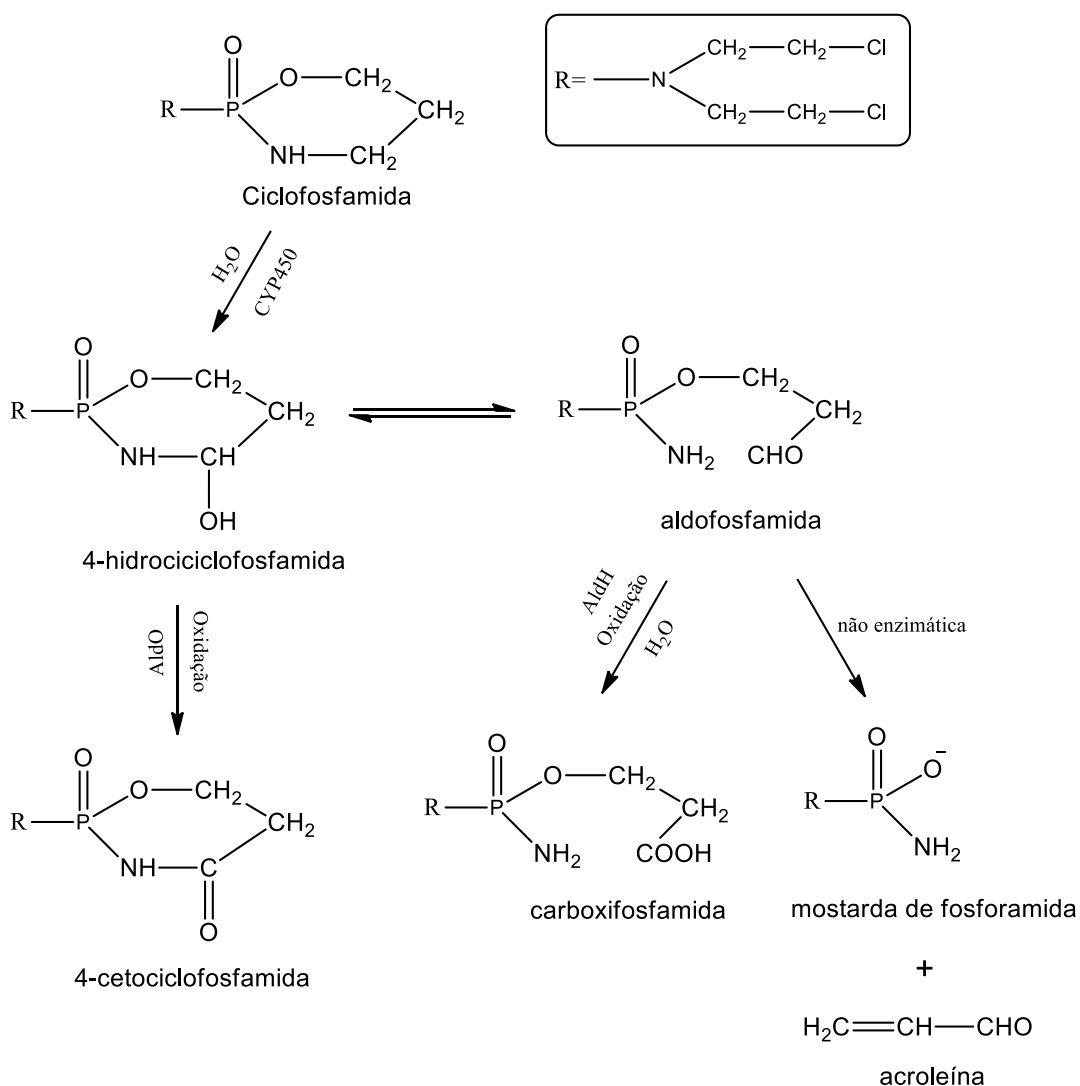
O metabólito ativo da ifosfamida, a isofosforamida, tem a capacidade de promover alquilação do DNA, com formação de ligação cruzada. Por impossibilidade de reparo da ligação cruzada no DNA, a célula entra em apoptose [7, 46].

A ciclofosfamina, por ser isômero da ifosfamida, também faz parte dos agentes alquilantes pertencentes à classe das mostardas nitrogenadas e subdividas no grupo das oxazafosforinas. IF e CF possuem características análogas [42]. A CF corresponde ao éster fosfamídico cíclico da mecloretamina, possuindo um centro quiral no átomo de fósforo, denominada de mistura racêmica (RS) [21, 48, 49]. A CF não possui atividade citotóxica *in vitro*, sendo inativa até ser metabolizada no fígado pelas oxidases de função mista do P450.

Tem efeito pronunciado nos linfócitos e é usado como imunossupressor. O metabolismo via citocromo P450 hepático demonstra que a CF é biotransformada em 4-hidroxiciclofosfamida.

Em condições fisiológicas, a 4-hidroxiciclofosfamida está em equilíbrio com seu tautômero aldofosfamida. Ambos os produtos de hidroxilação sofrem ação das isoenzimas, aldeído oxidase (AldO) e aldeído desidrogenase (AldH), resultando respectivamente, em 4-cetociclofosfamida e carboxifosfamida, substâncias consideradas metabolitos inativos. A bioativação da aldofosfamida ocorre espontaneamente, liberando acroleína e formando a mostarda de fosfamida, convertida em mostarda nitrogenada e metabolitos ativos (**Figura 4**) [21, 50]

Figura 4. Biotransformação da ciclofosfamida [37].



A biotransformação da CF e da IF em 4-OH-ciclofosfamida e 4-OH-ifosfamida, respectivamente, tem sido comprovada por estudos experimentais *in vitro* nos microsomas hepáticos e isoenzimas do sistema citocromo P450 em condições fisiológicas [37].

As mostardas fosforamidas apresentam efeitos terapêuticos e atividades alquilantes, responsáveis pela citotoxicidade e genotoxicidade da ifosfamida e ciclofosfamida nas células do DNA. As indicações terapêuticas desses compostos são direcionadas aos casos de câncer testicular de células germinativa, sarcoma de partes moles, câncer pancreático, cânceres do color do útero, de ovário, do pulmão, leucemia linfocítica crônica, doença de Hodgkin e linfomas, dentre outros. Os efeitos tóxicos observados são náuseas, vômitos, mielossupressão, alopecia, pigmentação e cistite hemorrágica.

Os efeitos adversos são causados por elevada concentração do metabólito altamente reativo, chamado de acroleína, que ataca os epitélios renais. Já os efeitos citotóxicos são oriundos de câncer secundário – fator mais preocupante da ação citotóxica [37, 41, 51]. A ocorrência desses efeitos citotóxicos é, na maioria das vezes, em decorrência da administração dos quimioterápicos, os quais interagem diretamente com DNA ou por meio da exposição ocupacional a estes compostos, oriunda da exposição dérmica e inalatória. Há também relatos que traços dos antineoplásicos, IF e CF, são excretados pela urina e podem ser encontrados nas águas residuais, nos efluentes de estação de tratamentos, nos rios e nos sedimentos [37, 50, 52].

3.3 Métodos Analíticos para Determinação da IF e CF

Com o objetivo de avaliar as principais vias de absorção e caracterizar as áreas de maior concentração da ciclofosfamida, Minoia *et al.* [37] investigaram as luvas dos trabalhadores envolvidos na manipulação de CF e constataram que as vias de maior absorção dérmica eram nas luvas (vinil, látex) utilizadas por estes trabalhadores nas áreas de preparo.

Segundo Kummerer *et al.* [52], os fármacos CF e IF e seus metabólitos são excretados pelos pacientes em águas residuais. A fim de observar o comportamento desses agentes antitumorais isoméricos, esses autores realizaram um estudo laboratorial e constataram que tais quimioterápicos não são biodegradáveis, além de não serem eliminados totalmente das usinas municipais de tratamento, sendo detectados, portanto nos efluentes.

Diante dessa problemática, vários estudos apontam claramente a presença generalizada destes compostos tanto no meio ocupacional quanto no ambiental, tornando-se necessário a investigação desses compostos e de seus metabólitos [15, 53-60]. Na **Tabela 1** são mostrados

alguns desses estudos de determinação da IF e CF, em diferentes condições, para fins demonstrativo e comparativo.

Tabela 1. Métodos de determinação de IF e CF proposto por vários autores.

MÉTODO	CONDIÇÃO	RESULTADO	REF
CLAE-EM / EM	Determinação em efluentes de estação de tratamento de esgoto	LD IF: 0,05 ng L ⁻¹ CF: 0,03 ng L ⁻¹	[53]
CLAE-EM / EM	Determinação em estações de tratamento de águas residuais e águas superficiais na Suíça	LD < 0,3 – 11 ng L ⁻¹	[54]
CG-EM	Determinação em ambiente aquosos, devido os resíduos das drogas citostáticas desenvolverem efeitos tóxicos em organismos vivos.	LD IF: 11 µg L ⁻¹ CF: 15 µg L ⁻¹	[55]
CLAE-EM/EM	Desenvolveram um método rápido para a análise de dez medicamentos anticancerígenos em águas residuais hospitalares e urbanas.	LD 0,8 a 24 ng L ⁻¹	[56]
CLAE-EM/EM	Desenvolveram uma metodologia analítica que permitisse uma avaliação confiável da exposição dos trabalhadores, aos riscos inerentes que eles sofriam em contato com a CF no meio ocupacional.	LD CF: 1,0 ng mL ⁻¹	[57]
EF	Desenvolveram dois métodos para a determinação da CF em formas puras e formuladas. Os métodos foram baseados na formação do complexo de transferência de carga (CTC).	Foi preciso, com teste de recuperação de 100% e o desvio padrão relativo: DPR < 2%.	[58]
CG-PND e CG-IT/EM ²	Fizeram uma comparação entre dois métodos para determinar a IF e seus metabólitos em plasma humano. O CG-PND mostrou-se linear, específico e sensível para a determinação do analito.	CG-PND: LD: 0,0500-100µg mL ⁻¹ LQ: < 0,05 µg mL ⁻¹	[59]
CG-EM	Monitoramento da quantidade de IF e CF em amostras biológicas (urina) e ambientais (água de esgoto).	LQ 3,8 nmol L ⁻¹	[60]
CLAE-UV	Determinaram simultaneamente, a concentração de IF e dIF) em plasma humano de indivíduos ligados diretamente ao ambiente de laboratório hospitalar.	LD IF 0,1 – 50 µg mL ⁻¹ dIF 0,1-100 µg mL ⁻¹ LQ 0,100 µg mL ⁻¹	[61]

Embora a literatura registre muitos trabalhos envolvendo métodos baseados em técnicas cromatográficas para determinação dos fármacos IF e CF, tais técnicas são relativamente complexas e demoradas, necessitam o preparo da amostra, envolvendo procedimentos de extração e purificação de extratos. Isso tudo impulsiona a busca por métodos alternativos.

3.3.1 Método eletroquímico

Os métodos eletroquímicos têm sido bastante difundidos para a determinação de vários compostos, devido a sua sensibilidade, seletividade, simplicidade, custo moderado, rapidez na análise e ainda a possibilidades de serem automatizados para projetar um dispositivo portátil [16, 62-64]. Várias são as aplicações das técnicas eletroquímicas, com eletrodos lisos e modificados, destacando a oxidação e redução dos compostos em vários meios, a adsorção na superfície do eletrodo, o mecanismo de transferência de elétrons, entres outros. A determinação de IF e CF envolvem a construção de sensores e biossensores.

Hassan *et al.* [62] desenvolveram dois sensores eletroquímicos modificados com membranas de PVC (sensor 1) e PVC-carboxilato (sensor 2) para a determinação de ciclofosfamida e ifosfamida, obtendo resposta linear para ambos os fármacos na faixa de concentração $10^{-3} - 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Em amostra real, os sensores 1 e 2, obtiveram recuperação média de $101,3 \pm 0,6$, $100,8 \pm 10,7$, respectivamente. Estes sensores também foram utilizados para acompanhar a estabilidade dos fármacos estudados na presença dos seus produtos de degradação.

Prasad *et al.* [16] construíram um eletrodo funcionalizado com nanocompósitos de pontos quânticos de grafeno com polímero impresso na superfície do eletrodo de carbono, usando N-acrilóil-4-aminobenzamida, como um monômero funcional, e uma droga anticancerosa, ifosfamida, como impressão molecular (MIP). Os nanocompósitos de pontos quânticos de grafeno induziram à atividade eletrocatalítica, diminuindo o excesso de oxidação da IF e, assim, ampliando a transmissão eletrônica, sem qualquer barreira interfacial entre a película e a superfície do eletrodo. O sensor proposto (IF-MIP) mostrou uma excelente atividade eletrocatalítica para a análise de IF.

Huang *et al.* [63] desenvolveram um sensor por meio da aplicação de compósitos de grafenos dopados com nitrogênio e enxofre, funcionalizado com polímero de impressão molecular (MIP) e sintetizado com tiourea, KOH e óxido de grafeno. Os modificadores objetivaram melhorar a capacidade de transferência de elétrons e a área superficial do eletrodo, enquanto que a camada MIP eletropolimerizada proporcionou o reconhecimento e a quantificação da ciclofosfamida (CF), utilizando ferrocianeto ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$) atuando como

sonda para indicar sinais elétricos. O sensor foi estável e seletivo, além de monitorar a administração CF em coelhos.

Fabiańska *et al.* [64] utilizaram um sensor eletroquímico de diamante dopado com boro em solução eletrolítica para eletrodegradação da IF e CF nas águas residuais. O tratamento químico foi baseado no processo oxidativo avançado (POA). O eletrodo de diamante dopado com boro mostrou-se bastante eficiente em relação à degradação de ambos os medicamentos analisados.

Palaska *et al.* [65] desenvolveram três sensores eletroquímicos (pasta de carbono, lápis de grafite e eletrodo suspenso de mercúrio) para determinar a CF em meio aquoso e observar a interação deste fármaco com o DNA. No entanto, os resultados apresentados não foram satisfatórios, pois a CF na faixa de concentração estudada, não se mostrou eletroativa e nenhuma informação pôde ser relacionada ao estudo eletroquímico do próprio composto após a interação do DNA. Mas foi observado, nos biossensores de pasta de carbono e lápis de grafite, por meio da técnica voltametria de pulso diferencial, que estes são adequados para detectar danos nas bases do DNA, através da interação da CF nas bases de oxidação, guanina e adenina [65].

A interação fármaco-DNA tem sido extensivamente estudada, e os métodos analíticos empregados para decifrar essas interações. O DNA é um alvo importante para uma ampla variedade de medicamentos que podem interagir especificamente ou não especificamente com o DNA e afetar suas funções [66].

Ainda são poucos os trabalhos envolvendo técnicas eletroquímicas para a determinação das oxazafosforinas IF e CF. Porém, muitos trabalhos indicaram que estes fármacos estão presentes no meio ocupacional e ambiental. Várias são as pesquisas sobre as propriedades alquilantes que estes compostos causam no DNA. A técnica eletroquímica também vem sendo empregada na investigação dos mecanismos de interação entre os quimioterápicos e o DNA.

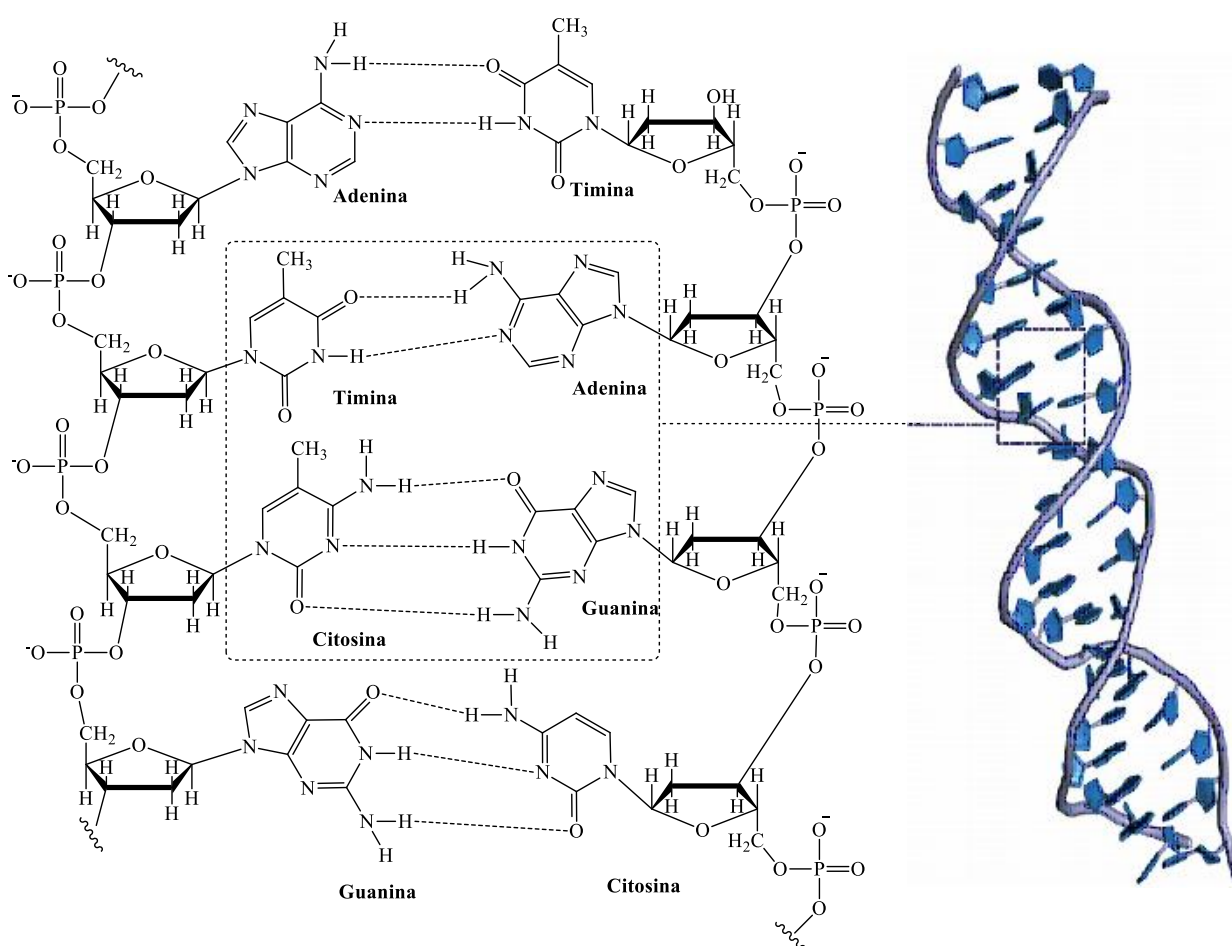
3.4 Interação Fármaco – DNA (Ácido Desoxirribonucleico) e os danos causados

O ácido desoxirribonucleico (do inglês *desoxiribonucleic acid* – DNA) desempenha um papel importante nos processos biológicos. Sendo a molécula responsável pela síntese de proteínas e enzimas, capazes de transmitir as características hereditárias por meio do armazenamento de informações genéticas que são necessárias para a replicação de organismos vivos [67].

A fita dupla de DNA (*dsDNA*) é formada por duas fitas simples (*ss-DNA*) ligadas uma a outra, formando a dupla hélice. Essas fitas são cadeias polinucleotídicas antiparalela, as quais

formam unidades nucleotídicas monoméricas. Esses nucleotídeos são compostos por três componentes químicos: um grupo fosfato, um açúcar (desoxirribose) e uma base nitrogenada [67], formando a estrutura da cadeia do DNA (**Figura 5**). As cadeias da dupla hélice estão unidas por meio de ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas, purina e pirimidinas. As bases purinas são adenina (A) e guanina (G), e as bases pirimidinas são citosina (C) e timina (T) [68].

Figura 5. Estrutura da dupla fita do DNA [69].



Essa molécula genética vem sendo alvo de diferentes classes terapêuticas, variando de antineoplásicos a antibióticos. Tais fármacos, além de interagirem com proteínas ou DNA associado, híbrido de DNA-RNA, ligam-se diretamente às bases nitrogenadas, interferindo a atividade de várias enzimas e proteínas envolvidas na manutenção da estrutura e funções da célula [66].

A interação fármaco-DNA, acontece de diferentes modos, incluindo a ligação não covalente de sulcos, ligação covalente ou reticulação, empilhamento π - π , intercalação,

clivagem das bases nitrogenadas e incorporação de análogo de nucleosídeo, inibindo o aumento da cadeia e alterando o pareamento das bases [70, 71]. A alteração no pareamento das bases, afeta as propriedades estruturais e funcionais dos ácidos nucleicos, levando a formação de danos no DNA.

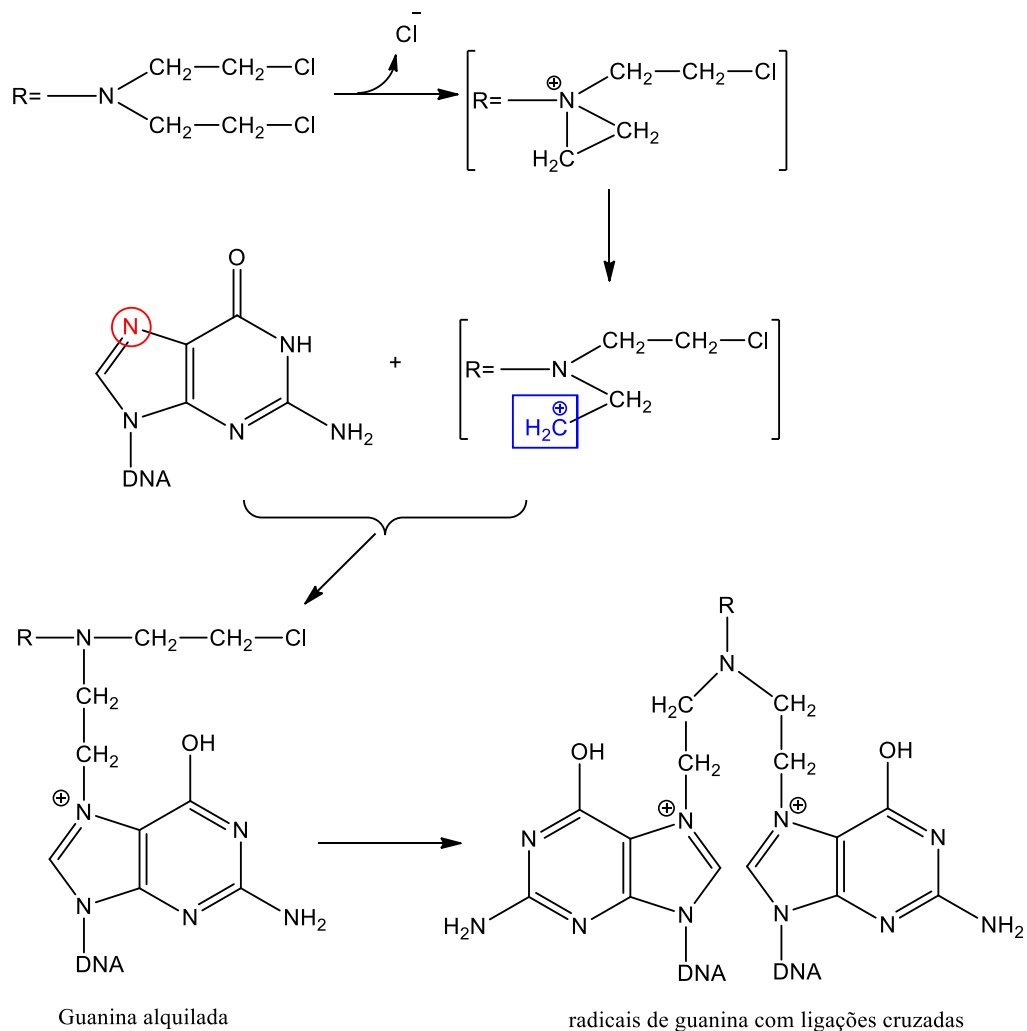
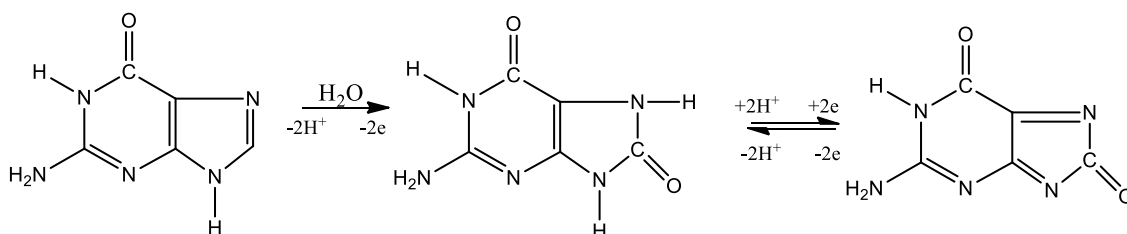
O DNA está sujeito a danos por agentes químicos e físicos internos e externos, prejudicando os processos metabólicos essenciais do DNA, como replicação, transcrição e recombinação. Se estes danos não sofrerem processo de reparo, podem gerar rearranjos cromossômicos, fusão, deleção, mutações ou perda cromossômica, levando a mudança permanente na informação genética, podendo passar para as células filhas [72, 73].

Os tipos de danos ao DNA variam de quebra simples ou dupla da fita de DNA até as ligações cruzadas (cross-links) entre as bases, por meios da intercalação de uma substância química entre os pares das bases nitrogenadas (aduto) [72]. Os compostos químicos eletrofílicos reagem com o DNA, sendo facilmente clivado.

As mostardas nitrogenadas possuem capacidade em estabelecer reações químicas eletrofílicas, formando intermediário de íon carbônico ou complexo de transição com as moléculas-alvos. A reação subsequente no anel aromático age como nucleófilo, atacando uma espécie eletrofílica, processo denominado de alquilação [22]. Dependendo do agente específico, a alquilação pode ocorrer nos átomos de nitrogênio ou de oxigênio da base, na estrutura de fosfato ou em uma proteína associada ao DNA. Os átomos N7 e O6 das bases da guanina mostram-se suscetíveis a alquilação [6]. No organismo, cada cadeia lateral de 2-cloroetil sofre ciclização intracelular, com a liberação de um íon Cl^- , formando um derivado altamente reativo, etileno imônio, capaz de interagir rapidamente com o DNA, modificando a sequência genética [39] (**Figura 6**).

Os danos oxidativos causados pela modificação na sequência genética geram mutações nas bases do DNA, promovendo a oxidação das bases nitrogenadas. Os adutos que causam danos oxidativos no DNA podem ser encontrados nas quatro diferentes bases nitrogenadas. A guanina é a base mais suscetível à oxidação, devido ao seu baixo potencial redox, tendo como principal produto de oxidação, a 8-oxoguanina (8-oxoGua), (**Figura 7**) [67, 74].

A modificação química nas bases de DNA causa perturbação molecular à sequência de genes, levando ao mau funcionamento das células. Essas características tornam a 8-oxoGua um biomarcador celular para indicar a extensão do estresse oxidativo [74]. Em decorrência disso, estudos têm sido desenvolvidos na intenção de investigar os danos que os antineoplásicos causam ao DNA [68, 75].

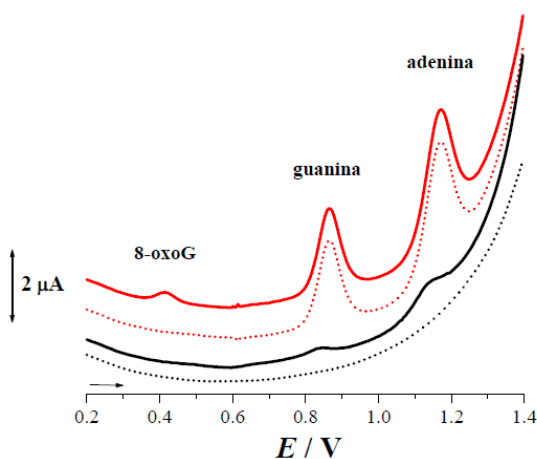
Figura 6. Mecanismo de Alquilação da guanina [76]**Figura 7.** Mecanismos de oxidação para guanina [74]

O estudo eletroquímico, por meio de sensores, investiga a interação, o mecanismo de ação dos danos oxidativos causados ao DNA e mudança na conformação da cadeia dos nucleotídeos [30, 77].

3.5 Propriedades Eletroquímicas do DNA

Estudos da interação eletroquímica do DNA evidenciaram que as bases nitrogenadas são eletroativas e podem oxidar ou reduzir na superfície do eletrodo [68, 75, 78-82]. Segundo Disculescu *et al.* [67], a interação eletroquímica do DNA na superfície do eletrodo de carbono, analisa os picos oxidados das bases purinas (guanina e adenosina), demarcando um sinal eletroativo dessas bases. No voltamograma da **Figura 8**, Disculescu *et al.* [67] fala que existem três picos de oxidação, correspondentes ao primeiro pico da 8-oxoGua, em $E_{p_a} = +0,45$ V, o segundo da guanina (Gua), em $E_{p_a} = +0,85$ V e o terceiro da adenina (Ade), em $E_{p_a} = +1,14$ V. Esses picos de oxidação podem ser usados como biomarcadores da 8-oxoGua e sonda dos pares de bases nitrogenadas da dupla hélice do DNA [67].

Figura 8. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos sobre um eletrodo de carbono vítreo em solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5 com: $60 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de ssDNA (•••) 1ª e (—) 10ª varredura, e $60 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de dsDNA (•••) 1ª e (—) 40ª varredura de potencial [67].



Uma das formas de investigar a interação dos compostos com o DNA é utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD), a qual detecta alterações da conformação da cadeia do DNA e seus possíveis danos oxidativos. Esta técnica, além de propiciar a análise estrutural das bases nitrogenadas, consegue determinar a interação dos compostos em baixas concentrações [75]. Estudos indicam que antineoplásicos interagem com o DNA, alterando a sua estrutura, durante a replicação celular, e gerando danos irreparáveis [74, 77].

3.6 Biossensores Eletroquímicos de DNA

Biossensores são pequenos dispositivos que utilizam componentes biológicos como elementos de reconhecimento, ligados a um sistema de detecção, transdução e amplificação do sinal gerado na reação com o analito alvo [83-86]. Os biossensores eletroquímicos são

vantajosos, sendo bastante sensíveis, seletivos, fáceis de serem desenvolvidos e apresentam baixo custo [86-89].

Os sinais eletroquímicos que mostram as bases nitrogenadas interagindo com o fármaco propõem um mecanismo de interação e de conformação de adutos [31], o que torna possível o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos à base de DNA para diagnósticos rápidos de doenças genéticas [89].

Os biossensores de DNA têm sido construídos mediante a imobilização de uma fita dupla de DNA (*dsDNA*) na superfície do eletrodo, e os sinais eletroquímicos reconhecem a sequência dos nucleotídeos, guanosina e adenosina, bem como dos seus produtos de oxidação [31, 90]. Como ilustrado na **Figura 8**.

O objetivo da imobilização do ácido nucleico à superfície do transdutor é mostrar as mudanças que ocorrem na estrutura do DNA durante a interação entre o fármaco e as bases nitrogenadas, resultando em sinais eletroativos bem característicos para o mecanismo de interação fármaco-DNA [30, 91]. Dessa maneira, o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos de DNA apresentam resultados satisfatórios na interação de vários compostos com o DNA, devido à sua sensibilidade e seletividade [92].

Mehdinia *et al.* [93] desenvolveram um sensor eletroquímico modificado com monocamadas de azidohexano tiol (MAT) na superfície do eletrodo de ouro, para melhorar a área de imobilização do *dsDNA* e por consequência a interação com o fármaco (Taxol) nas bases nitrogenadas. As características eletroquímicas do *dsDNA* no eletrodo de ouro modificado por MAT foram investigadas por voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. A interação do *dsDNA* com o taxol (paclitaxel) resultou na redução da corrente de pico da oxidação da guanina. Esta queda de corrente foi usada como controle para monitorar a interação do taxol com o DNA. Os resultados obtidos mostraram forte interação na ligação do taxol com o DNA. O eletrodo modificado foi utilizado como biossensor sensível para quantificação do taxol em amostras de soro humano.

Congur *et al.* [94] construíram um biossensor à base de lápis de grafite descartável, para investigar eletroquimicamente a interação entre o antineoplásico topotecano (TPT) e o DNA. A detecção eletroquímica da TPT e a interação TPT-*dsDNA* foram investigadas na superfície do eletrodo de lápis de grafite, antes e após a modificação com nanotubos de carbono de parede simples (NTCPS), usando voltametria de pulso diferencial (VPD). Os resultados foram obtidos mediante as alterações no sinal de corrente, da oxidação do TPT e da guanina, avaliadas antes e

após cada etapa de modificação e/ou imobilização. Após a interação, as respostas diminuíram, resultando em forte interação TPT-*dsDNA*. Os LD obtidos antes e após a modificação foram 0,51 e 0,37 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Zeybek *et al.* [95] desenvolveram um biossensor, modificado com *dsDNA* e um indicador 5',5"-dibromo-o-cresolsulftaleína, conhecido como púrpura de bromocresol (PBCR), para observar a interação entre 5-fluorouracil (5-FU) e o *dsDNA* na cadeia dos espermatozoides de peixe. O filme PBCR foi eletrodepositado na superfície do eletrodo de carbono vítreo (ECV) por voltametria cíclica. O biossensor foi preparado através da imobilização do *dsDNA* na superfície do ECV modificado com PBCR. O mecanismo de interação do *dsDNA* com 5-FU foi investigado por VPD utilizando o biossensor *dsDNA*-ECV/PBCR. Uma diminuição na corrente de pico da oxidação da guanina no biossensor foi observada após a interação do *dsDNA* e 5-FU 0,5 mol L⁻¹ em tampão acetato (pH 4,8). O tempo de acumulação e concentração de *dsDNA* foram otimizados para obter a melhor resposta da corrente de pico. Sob ótimas condições, a resposta linear na curva decrescente do sinal da guanina foi observada na faixa de concentração de 5-FU variando de 1,0-50 mg L⁻¹. O mecanismo de interação entre o *dsDNA* e o 5-FU foi posteriormente investigado por espectroscopia UV-vis e viscosímetro. Os resultados revelaram que a intercalação é o principal modo de interação entre o 5-FU e o *dsDNA*.

Erdem *et al.* [96] desenvolveram um sensor descartável de óxido de grafeno (OG) para investigar as interações da mitomicina C (MC) com o *dsDNA*. As interações interfaciais entre o *dsDNA* e o MC foram estudadas por voltametria de pulso diferencial (VPD) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). Os estudos de EIS revelaram que a ligação do fármaco MC ao *dsDNA* conduz a uma diminuição gradual da sua carga negativa. Como consequência dessa interação, as espécies redox foram eletroativas na superfície do eletrodo, aumentando a transferência de carga. Por outro lado, estudos por VPD, mostraram diminuição no sinal da guanina, devido à forte ligação do fármaco, MC e o *dsDNA*.

Hajian *et al.* [97] desenvolveram um sensor eletroquímico para determinação do quimioterápico doxorrubicina (DOX), em plasma humano. O eletrodo de platina foi modificado com nanotubo de carbono (Pt/NTC) e DOX. DOX mostrou-se reversível em torno de 0,522 e 0,647 V e, nas condições otimizadas, tal composto foi linear na faixa correspondente de 0,05 a 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com limite de detecção de 0,002 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O sensor construído apresentou excelente precisão, sensibilidade, repetibilidade e seletividade na determinação da doxorrubicina no plasma. Além disso, estudos de voltametria cíclica mostraram que a

doxorubicina possui forte ligação com as fitas do DNA, intercalando com as bases nitrogenadas.

Hajian *et al.* [98] também desenvolveram um sensor de ouro modificado com nanotubos de carbono decorados com nanopartículas de Au (AuNPs/NTC/Au), para determinação em amostras biológicas da valrubicina (VB). A VB adsorvida na superfície do eletrodo de AuNPs/NTC/Au, respondeu reversivelmente em torno de 0,662 e 0,578 V, tendo a resposta sido linear na faixa compreendida entre 0,5 a 80,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O sensor construído, além de ser aplicado com sucesso para determinação de valrubicina em urina humana e soro sanguíneo, também foi utilizado para estudar a interação do fármaco do *dsDNA*, além de ter mostrado que os nucleotídeos sofreram forte interação com a VB.

Erdem *et al.* [99] estudaram a interação do antineoplásico, bleomicina (BLM) com *ssDNA* e *dsDNA*, por meio da técnica eletroquímica de impedância (EIS) com eletrodo de platina. As condições experimentais foram otimizadas: concentrações do *dsDNA*, *ssDNA* e BLM, e tempo de interação. A interação *in situ* de BLM com *dsDNA* foi testada na ausência e presença de outros agentes quimioterápicos, como mitomicina C (MC) e *cis*-platina (*cis*-DDP) para testar a seletividade do biossensor.

Nawaz *et al.* [100] estudaram a interação da ciprofloxacina (CIP) com DNA, utilizando um biossensor eletroquímico. O estudo foi realizado em um eletrodo de carbono vítreo modificado com *dsDNA*, por meio de VPD. A guanina oxidada em torno de 0,9 V foi utilizada como controle do mecanismo de interação fármaco-DNA. Os valores da constante de ligação (K) obtidos foram $1,33 \pm 0,02 \times 10^4$ e $1,32 \pm 0,08 \times 10^4$ mol. Os autores observaram uma dependência linear da guanina com o CIP na faixa de 40-80 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com limite de detecção de 24 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A diminuição da corrente de pico da guanina na presença do fármaco mostrou que o biossensor foi eficiente na resposta de interação CIP-DNA.

O presente trabalho vem aproveitar as experiências anteriores, mas propõe um sistema mais simples e eficiente para estudar a interação da IF e CF e dos seus produtos de degradação com o *dsDNA*, em solução fármaco-*dsDNA*. Para tal, será desenvolvido um biossensor eletroquímico feito de carbono vítreo contendo *dsDNA* imobilizado.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes, Soluções e Demais Materiais

Todos os reagentes utilizados no presente trabalho foram de pureza analítica (P.A) e utilizados sem purificação prévia. A ifosfamida (pureza $\geq 98\%$), ciclofosfamida (pureza $\geq 98\%$), *dsDNA* (*Deoxyribonucleic acid, sodium salt from calf thymus*), blue-green, gel red, ficoll paque plus, Na₂EDTA e Triton, foram adquiridos da Sigma-Aldrich; o gel de agarose foi adquirido da Kasvi; cloreto de sódio (pureza $\geq 99,5\%$), hidróxido de sódio (pureza $\geq 99\%$), EDTA, ácido bórico (pureza $\geq 99,5\%$), ácido clorídrico (pureza $\geq 37\%$), dimetilsulfóxido (DMSO) (pureza $\geq 99,7\%$), n-lauril sarcosina e trisaminometano (Tris), foram adquiridos da Merck; o ácido fosfórico (pureza $\geq 85\%$) e ácido acético (pureza $\geq 99,7\%$), foram adquiridos da Isofar; o meio RPMI e soro bovino fetal foram adquiridos da Gibco.

Soluções estoque de IF e CF na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas em água e armazenadas em frasco de vidro âmbar a -4°C (geladeira).

Soluções de *dsDNA* foram preparadas pela dissolução de $\sim 2\text{mg}$ do *dsDNA* em 5 mL de água deionizada em tubo Falcon com capacidade de 15 mL. A solução foi mantida a -4°C por 24 h para evitar sua degradação, para posterior cálculo da concentração. A concentração do *dsDNA* é determinada por espectroscopia UV-Vis, através da multiplicação da absorbância obtida experimentalmente pelo fator de conversão ($1 \text{ u } A_{260\text{nm}} = 50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de *dsDNA*) [101].

Soluções tampão em diferentes valores de pH e eletrólitos suportes foram preparadas utilizando reagentes de grau analítico e água deionizada.

O gel de agarose 0,8 % foi preparado em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) pH 8,0.

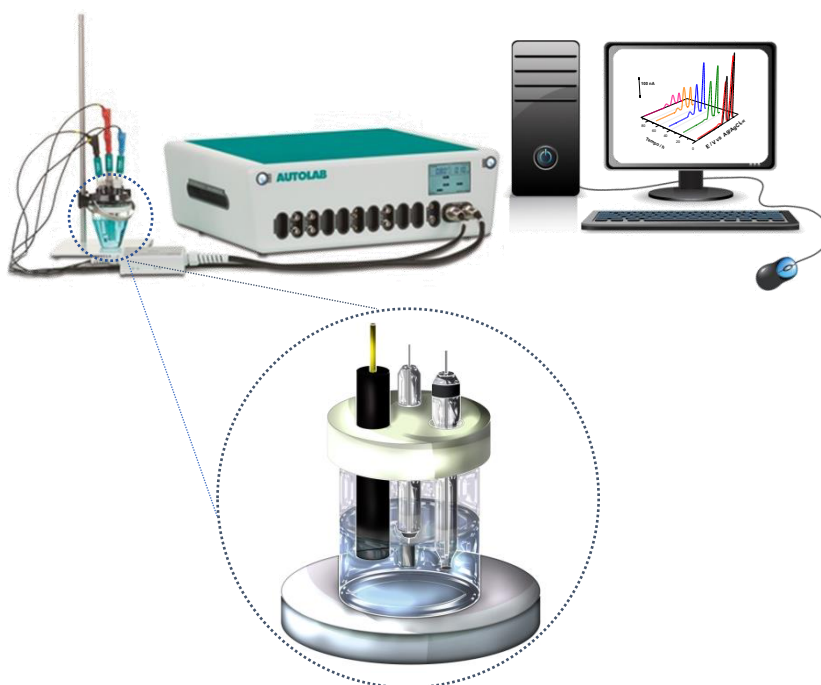
Água deionizada de alta pureza (resistividade $\leq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ e condutividade $< 0,1 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$) obtida a partir de um sistema de purificação de água Milli-Q® Direct 8 (Millipore, Bedford, EUA) foi utilizada para a limpeza de vidrarias e o preparo de todas as soluções aquosas.

4.2 Equipamentos e Instrumentação

Os experimentos eletroquímicos foram realizados utilizando o potenciostato Autolab (modelo PGSTAT 302N, da Metrohm) acoplado a um computador com o *Software* GPES (*General Purpose Electrochemical System*), versão 4.9 (**Figura 9**). Para os estudos, utilizou-se

uma célula eletroquímica com capacidade de 5 mL, empregando-se um sistema de três eletrodos: eletrodo de trabalho (carbono vítreo - ECV, $\Phi = 3$ mm), eletrodo de referência (Ag/AgCl/KCl_{sat}) e o eletrodo auxiliar (fio de platina), representado na **Figura 9**.

Figura 9. Representação esquemática do sistema eletroquímico.



Fonte: Autores (2018).

O estudo de eletroforese foi realizado em uma cuba de eletrofóretica da Kasvi contendo gel de agarose ligada à uma fonte, modelo Eletrophoresis Power Suppey, durante 30 min à 90 V e 300 mA. O gel foi analisado em um transluminador, modelo Quantum-ST 1100-26MX (Apêndice 1).

Para o estudo do teste do cometa, a técnica eletroforética foi realizado em uma cuba de eletroforese da Loccus de modelo LCH 20x25 contendo as lâminas preparadas para o estudo de interação DNA-IF, DNA-CF, CP e CN ligada a uma fonte de eletroforese, modelo Eletrophoresis Power Suppey, durante 20 min à 25 V e 300 mA. As lâminas foram analisadas em um microscópio de fluorescência, modelo Olympus BX61, com aumento de 400 X.

Para o ajuste do pH das soluções tampão, utilizou-se um pHmetro modelo 827, da Metrohm Swiss Made.

4.3 Estudo do Comportamento Eletroquímico da IF e CF

O comportamento eletroquímico da IF e CF 1 mmol L^{-1} , sob eletrodo de carbono vítreo foi avaliado por meio da técnica de voltametria cíclica (VC) em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Os voltamogramas foram obtidos em varreduras sucessivas no intervalo de potencial aberto (-1,0 a 1,0 V) e fechado (0,0 a 1,0 V), a 50 mV s^{-1} . Este estudo também foi realizado por voltametria de pulso diferencial (VPD) nas mesmas condições experimentais de VC, em um intervalo de potencial de 0,0 a 1,0 V, 5 mV s^{-1} .

Também foi estudado o comportamento eletroquímico dos produtos de degradação da IF e CF 1 mmol L^{-1} em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), por VPD, no intervalo de potencial de 0,1 a 1,4 V a uma velocidade de 5 mV s^{-1} .

O estudo eletroquímico deste trabalho foi baseado no artigo de Palaska *et al.* [65], no qual o autor analisou a CF por VPD em solução tampão acetado pH 4,8 e tampão fosfato pH 8,5, sob o eletrodo de pasta de carbono e lápis de carbono.

4.4 Degradação Química da Ifosfamida e Ciclofosfamida

Para o estudo eletroquímico, as soluções de IF e CF 1 mmol L^{-1} em tampão fosfato pH 7,0 foram estocadas por 1.128 h (47 dias) a temperatura ambiente e estudada por VPD

Para o estudo de interação, as soluções de IF e CF $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 4,5 foram estocadas por diferentes períodos de tempo (0 h, 24 h, 48 h, 96 h, 240 h, 480 h, 720 h e 1.128 h à temperatura ambiente. Essas soluções foram analisadas por voltametria de pulso diferencial (VPD). Também foi feito um estudo, quando o composto começa a degradar, em 196h.

4.5 Limpeza da Superfície do Eletrodo de Carbono Vítreo

Antes de cada medida voltamétrica, a superfície do ECV foi polida em um papel de filtro (gramatura 80 g m^{-2}) umedecido com spray de diamante da Kemet (partículas de $1,0 \mu\text{m}$), em movimentos contínuos, e em seguida, o eletrodo foi lavado com água deionizada.

Antes de cada medida, o ECV foi condicionado em eletrólito suporte para obtenção de uma linha de base estável.

4.6 Tratamento dos Dados Voltamétricos

Foram realizados, por meio do software GPS instalado do potenciostato autolab, uma suavização dos voltamogramas e a correção da linha de base, de forma a melhorar a visualização e a identificação dos picos, sem modificar a resposta obtida, embora a corrente de pico, em alguns casos, reduzia (< 10%) em relação ao sinal voltamétrico não tratado.

4.7 Estudo da Interação da IF e CF e seus Produtos de Degradação com o *dsDNA*

O estudo eletroquímico da interação da IF e CF e da dIF e dCF 0,5 mmol L⁻¹ com *dsDNA* foi realizada em função do tempo de incubação 0, 24, 48, 72 e 96 h, em soluções de *dsDNA* 100 µg mL⁻¹ e biossensores eletroquímicos à base de *dsDNA* 100 µg mL⁻¹ imobilizado em eletrodo de carbono vítreo. Tal estudo foi realizado utilizando o tampão acetato pH 4,5 como eletrólito e a técnica VPD, em um intervalo de potencial de 0,1 a 1,4 V.

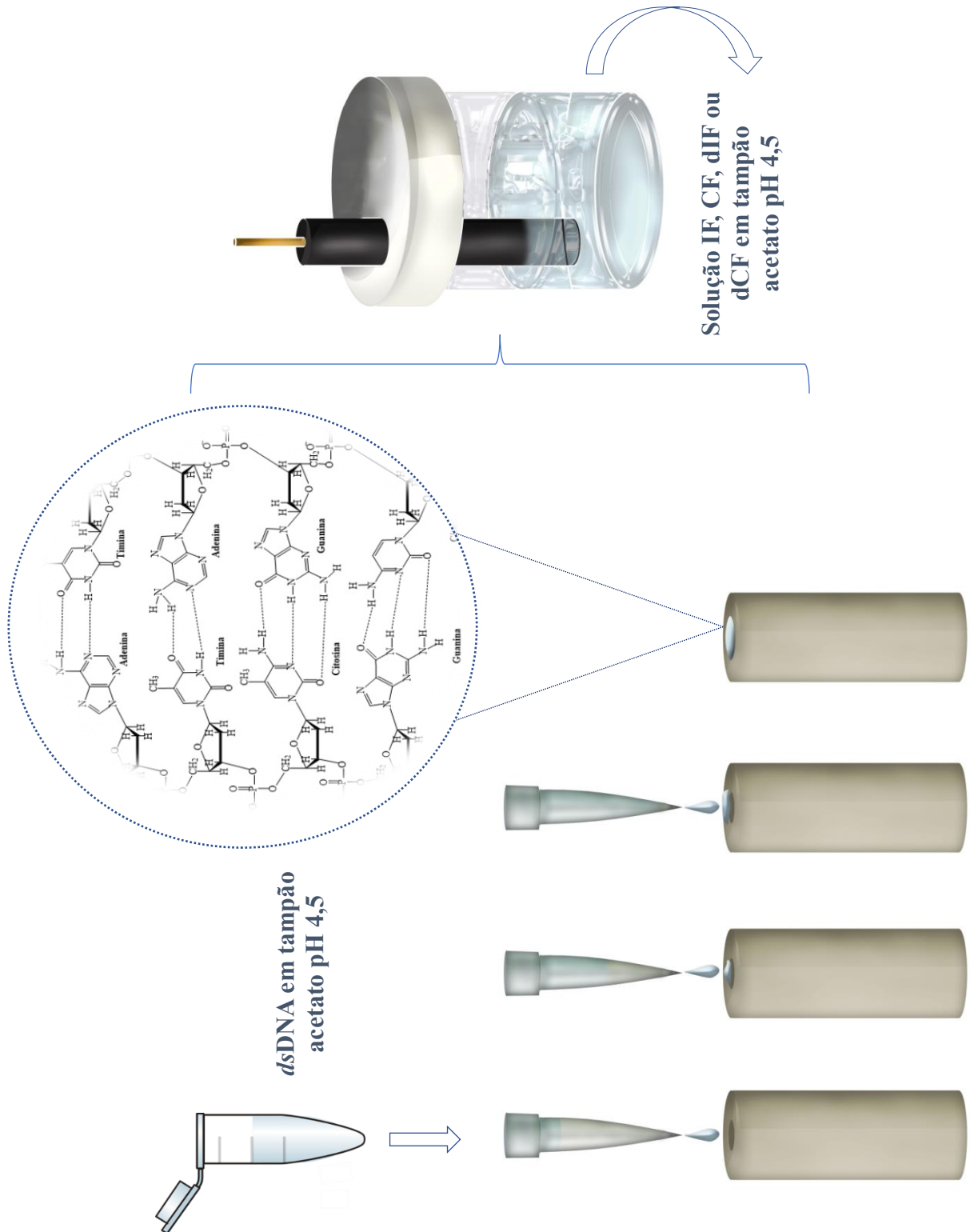
Os efeitos da interação fármaco - *dsDNA* foram avaliados por comparação do perfil dos nucleotídeos dos sinais eletroanalíticos de oxidação *dGuo* (desoxiguanosina) e *dAdo* (desoxiadenosina), na ausência (*dsDNA*) e na presença do fármaco e dos produtos de degradação com *dsDNA*.

4.7.1 Preparação do biossensor eletroquímico de *dsDNA* e procedimentos de incubação

O biossensor eletroquímico de *dsDNA* foi preparado por meio do processo de adsorção, onde o eletrodo de carbono vítreo (ECV) foi modificado pela imobilização de solução de *dsDNA* 100 µg mL⁻¹ na sua superfície, previamente limpa e condicionada em eletrólito suporte (tampão acetato pH 4,5). Tal imobilização foi feita em camadas de alíquotas de 30µL de *dsDNA* cada. Após a secagem da primeira camada, o procedimento foi repetido três vezes. A imobilização de *dsDNA* gerou uma cobertura completa e uniforme da superfície do ECV, de modo que os picos obtidos foram devidos apenas às modificações estruturais do *dsDNA*, e não à adsorção não específica do composto (**Figura 10**).

Após a modificação, o eletrodo foi lavado com água deionizada, a fim de remover as fitas de *dsDNA* não adsorvidas, e em seguida condicionado em potencial de 0,8 V por 30 segundos. Após a etapa de condicionamento, o biossensor foi imerso em solução de IF, CF, dIF e dCF 0,5 mmol L⁻¹ em tampão acetato pH 4,5 e incubadas em diferentes tempos (0 h, 24 h, 48h, 72h e 96h) (**Figura 10**).

Figura 10. Representação esquemática do preparo do biossensor de *dsDNA* e incubação do biossensor com IF, CF, dIF ou dCF $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$.



Fonte: Autores (2018)

Após os tempos de incubação, o eletrodo foi retirado da solução, lavado com água deionizada, para remover as moléculas do composto em estudo (IF, CF, dIF e dCF) não ligadas/adsorvidas, e transferido para a célula eletroquímica contendo apenas solução tampão acetato (pH 4,5), tendo sido os voltamogramas registrados por VPD. Para cada tempo de incubação estudado, um novo biossensor eletroquímico de *dsDNA* era preparado.

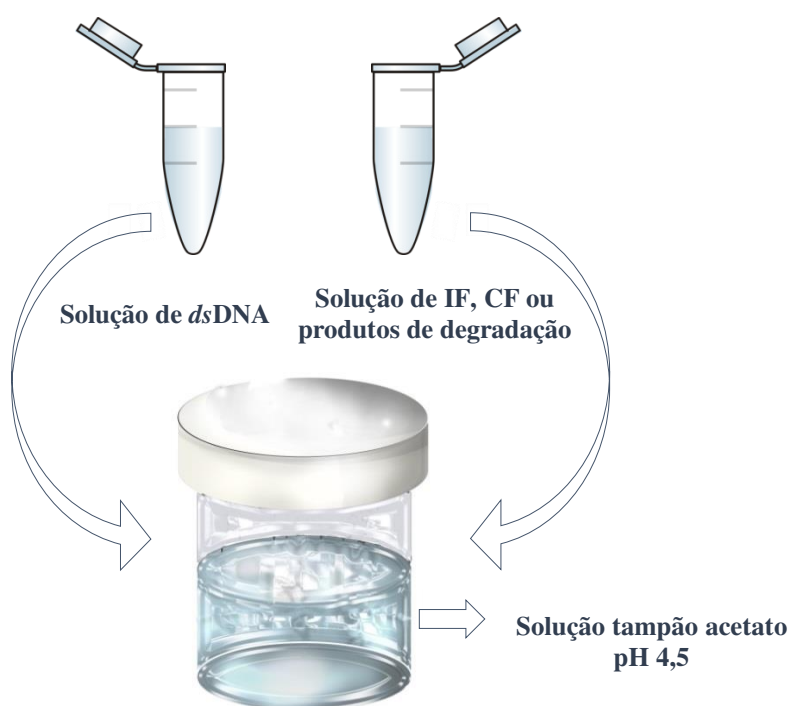
Biossensores de *dsDNA* de controle foram preparados e analisados seguindo as mesmas etapas descritas acima, porém na ausência do analito. Este procedimento foi utilizado para avaliar as interações da IF, CF, dIF e dCF com o *dsDNA* nos intervalos de tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 h.

4.7.2 Incubação do *dsDNA* com IF e CF e seus produtos de degradação em solução

Uma solução contendo *dsDNA* $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e IF/CF $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ foi incubada em tampão acetato pH 4,5 (**Figura 11**), na célula eletroquímica com o ECV limpo imerso na solução, durante diferentes tempos (0, 24, 48, 72 e 96 h).

A cada intervalo de tempo, leituras voltamétricas por VPD foram realizadas, a fim de verificar o processo de interação. O mesmo procedimento foi repetido para a CF.

Figura 11. Esquema da solução contendo *dsDNA* $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e IF/CF/produto seus produtos de degradação $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ incubada em tampão acetato pH 4,5, no tempo compreendido de 0 a 96 horas.



Para a interação dos produtos de degradação gerados por ifosfamida e ciclofosfamida foi adotado o mesmo procedimento, sob as mesmas condições (soluções de *dsDNA* 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e dIF/dCF 0,5 mmol L^{-1} em tampão acetato pH 4,5), durante 0, 24, 48, 72, 96 h, degradadas por 47 dias (1.128 h).

4.7.3 Controle do *dsDNA*

Antes de iniciar cada estudo de interação com o *dsDNA*, medidas de controle da solução e do biossensor de *dsDNA* 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram realizadas para obtenção do perfil eletro-oxidativo dos nucleosídeos guanosina (*dGua*) e adenosina (*dAdo*), e assim poder avaliar o perfil na ausência da IF e CF. Para obter o controle da solução de *dsDNA*, VPD foram realizadas até a estabilização da corrente. Entre cada leitura, a superfície do eletrodo foi polida para obtenção do branco.

O controle do biossensor de *dsDNA* foi obtido após modificações do ECV (imobilização de *dsDNA*). Para cada medida voltamétrica um novo biossensor foi construído. Esse processo foi realizado até obtenção de um perfil estável (reprodução), das bases *dGua* e *dAdo*, para o biossensor de *dsDNA*.

A mesma concentração de *dsDNA* foi usada para ambos os estudos.

4.8 Eletroforese

Todas as corridas eletroforética de *dsDNA* foram obtidas em matriz de gel de agarose. Para visualizar a mobilidade do *dsDNA* e possíveis danos. Neste estudo foram usados blue-green (marcador para corrida), composto assimétrico da cianina, e o gelred (agente intercalante). O blue-green tem propriedades fluorescentes quando se liga na dupla fita do DNA, através da passagem dos íons para a membrana do *dsDNA*. O gelred é um corante fluorescente de ácidos nucleicos ultra-sensível, que intercala nas bases do *dsDNA* [102].

As amostras contendo *dsDNA* 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, IF, CF, dIF e dCF 0,5 mmol L^{-1} , 0,25% de blue-green e 0,25% de red foram carregadas nos poços da matriz de gel de agarose 8%. Este gel carregado com as amostras, foi posteriormente imergido em um tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA), em pH 8,0, na cuba de eletroforese.

No primeiro poço, foi inserido apenas amostra contendo *dsDNA* com red e green, chamada de controle negativo (CN). Nos poços subsequentes, foram inseridas amostras de *dsDNA* com o composto nos tempos de 0, 24, 48 e 72 h.

Após o término da corrida de eletroforese, o gel foi levado a um transiluminador, para visualizar a mobilidade do *dsDNA*.

Todo o processo experimental deste estudo está representado no Apêndice 1.

4.9 Teste Cometa

O Ensaio do Cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas, que podem ser reparadas, e se não reparadas, podem resultar em mutação. Neste trabalho o teste cometa foi feito com o objetivo de observar se IF e CF causavam dano direto ao DNA e assim avaliar o potencial genotóxico, através do estudo de genotoxicidade [103, 104].

Este estudo feito a partir da obtenção de células de doadores voluntários consiste na análise da migração do DNA por meio da eletroforese, em uma lâmina de microscópio com células intercaladas em uma fina camada de agarose, e ao final do estudo, estas lâminas são colocadas em um microscópio de fluorescência para análise da presença ou ausência de fragmentação do DNA nas células estudadas. O teste foi realizado, conforme descrito na literatura [105].

O presente estudo foi realizado no laboratório de genética e biologia molecular – LabGem – e, a participação de doadores voluntários ocorreu mediante o consentimento dos mesmos, com a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice 2).

4.9.1 Obtenção das amostras celulares para o teste Cometa *in vitro*.

Para obtenção de leucócitos totais (células mononucleares) foram coletadas amostras de 20 mL de sangue periférico de três doadores voluntários saudáveis, em tubos de heparina. Foi acrescentado o mesmo volume de salina. Em um câmara de fluxo laminar, cada amostra foi subdividida em 4 tubos de falcon e acrescentado o mesmo volume de solução salina, tampão PBS pH 10 (NaCl 2,5 mol L^{-1} ; KCl 2,5 mol L^{-1} ; Na_2HPO_4 2,0 mol L^{-1} ; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2,0 mol L^{-1} ; NaOH 4,0 mol L^{-1}), em seguida, foi adicionado ficoll na proporção 3:1 em relação ao sangue. A mistura (salina, ficoll e sangue) foi centrifugada por 20 min com uma rotação de 2000 rpm. O anel de leucócitos formado, após centrifugação, foi removido lavado novamente com salina e centrifugado para remoção total de resíduos celulares ou reagentes utilizados no procedimento. Por fim, acrescentou-se o meio RPMI para diluição das células. Após este tratamento de diluição das células em meio RPMI, foram adicionados soro fetal bovino e

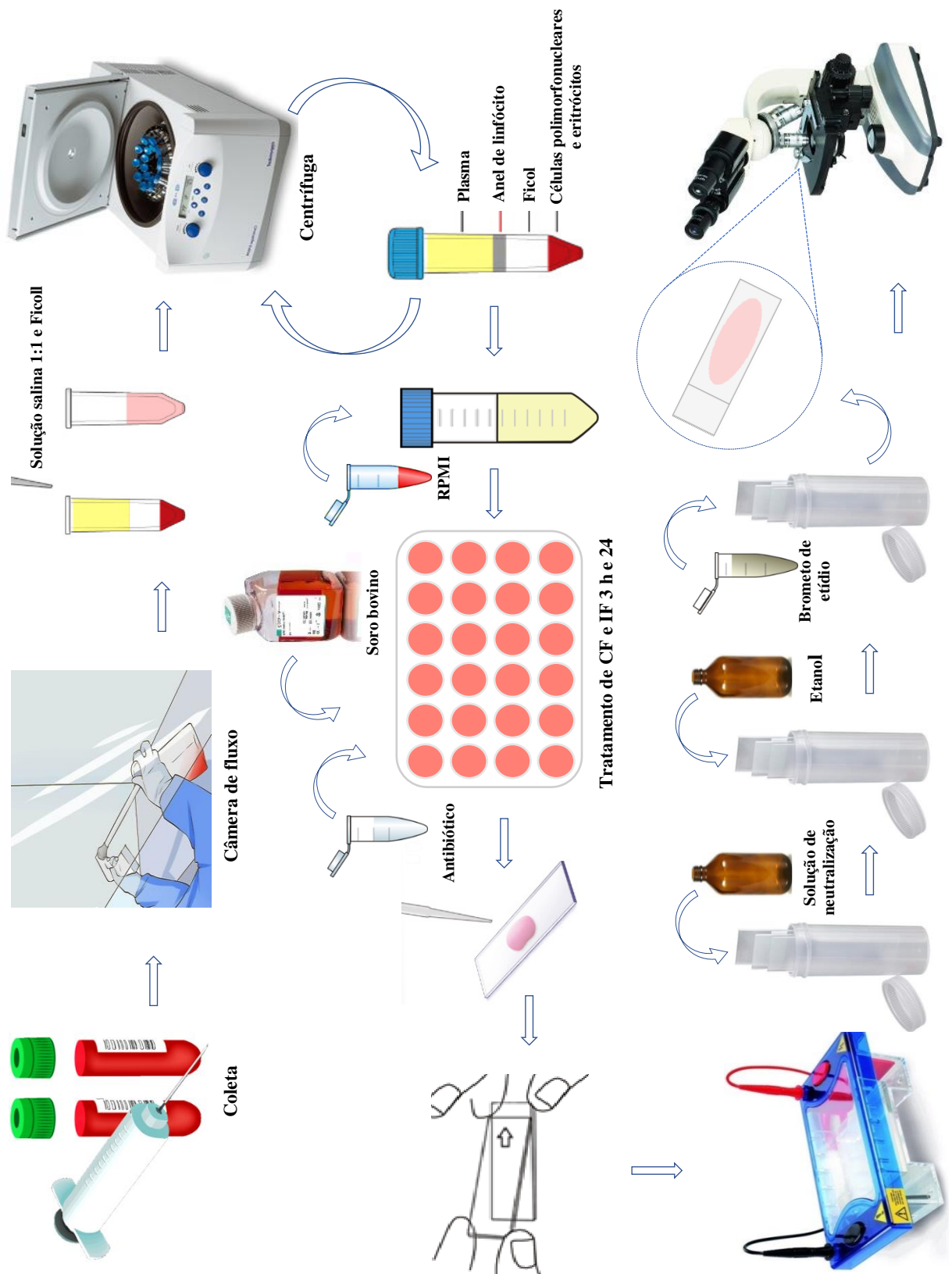
antibiótico, e o meio de cultura foi tratado com os compostos IF e CF $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ a um volume final de 2 mL, por um período de 3 e 24 h.

4.9.2 Procedimento experimental para o teste Cometa *in vitro*.

Após o período de tratamento de 3 e 24 h do meio de cultura descrito no item 4.9.1, iniciou-se o procedimento de preparação das lâminas. Inicialmente, foi preparado o controle positivo, misturando-se 10 μL de H_2O_2 em 500 μL da suspensão celular e deixada agir por 10 min. Em sequência, misturou-se, separadamente, 10 μL das diferentes amostras (controle negativo, controle positivo, e tratamento de IF e CF $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) com 100 μL de agarose com baixo ponto de fusão (0,5%). Uma alíquota de cada uma destas soluções foi retirada e transferida para as lâminas com agarose e as mesmas cobertas com uma lamínula. As lâminas tratadas foram refrigeradas a 4° por 5 min. Após o tempo estimado para a solidificação, a lamínula foi retirada cuidadosamente, tendo sido mergulhadas em solução de lise pH 10,0 (NaCl $2,5 \text{ mol L}^{-1}$, EDTA 100 mmol L^{-1} e Tris 10 mmol L^{-1} , Triton X-100 1% e DMSO 10%) e deixadas na geladeira em *overnith* por 24h. Em seguida, as lâminas foram imersas em uma solução alcalinas, tampão TAE pH 13 (NaOH 10 mol L^{-1} e EDTA $0,2 \text{ mol L}^{-1}$), durante 20 min a 4°C . O material então, foi colocado em uma cuba de eletroforese e submetido à corrida eletroforética por 20 min, 25 V e 300 mA. Após a corrida, transferiu-se as lâminas para uma cuba com solução de neutralização pH 7,5 ($0,4 \text{ mol L}^{-1}$ de Tris e HCl) por 20 min e em seguida as mesmas foram postas pra secar à temperatura ambiente. Para fixar as lâminas, estas foram mergulhadas em solução de etanol puro por 4 min. Por fim, 30 μL de solução de brometo de etídio foram adicionados sobre as lâminas e estas foram analisadas em microscópio de fluorescência. Para a contagem das lâminas, foram escolhidas 100 células aleatórias.

Todo o processo experimental do estudo descrito nos itens 4.9.1 e 4.9.2 são representados na **Figura 12**

Figura 12. Representação esquemática do procedimento experimental do teste cometa *in vitro*.



Fonte: Autores (2018)

4.9.3 Classificação do potencial genotóxico

O potencial genotóxico (lesão genômica) foi conferido através da classificação visual dos nucleoides, variando a classe de 0 a 4, onde “0” representa células sem danos, enquanto as classes de “1 a 4” representam níveis de danos crescentes. Classe 1 - baixo nível de danos (5-20%); Classe 2 - nível moderado de danos (20-40%); Classe 3 - alto nível de danos (40-94%); Classe 4 - dano total (> 95%) (**Figura 13**) [104].

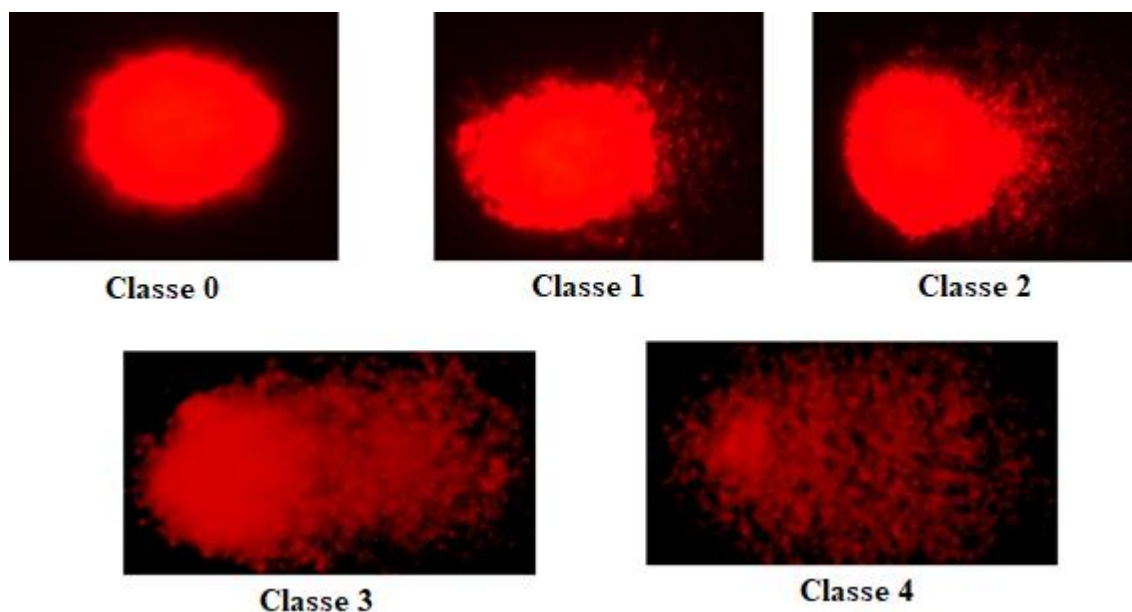
Os núcleos intactos aparecem redondos, enquanto que nas células que sofreram lesões, mostra uma “cauda” de fragmentos, semelhante a um cometa [106, 107].

No teste do cometa estudado neste trabalho, através dos nucleoides (~10.000 células) obtidos dos pacientes voluntários, foram considerados os parâmetros tamanhos e a quantidade de DNA presente na cauda do cometa.

O escore de danos foi obtido através da multiplicação do número de nucleoides em cada classe pelo respectivo valor da classe, usando a equação:

$$\text{Escore} = [(0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)] / \text{total do número de células}$$

Figura 13. Fotomicrografia das diferentes classes de pesquisa por microscopia de fluorescência. Aumento de 400x [108]



4.9.4 Análise estatística dos resultados do teste Cometa

Os dados foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov [104, 109]. Considerando que os dados não possuem distribuição normal, para o ensaio do

cometa foi utilizado um teste equivalente não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn's, comparando dois grupos de maneira simultânea [104, 109].

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, e para a comparação das respostas foi utilizado o software GraphPad Prism 5.0, considerando o nível de probabilidade de 95% ($p < 0,05$).

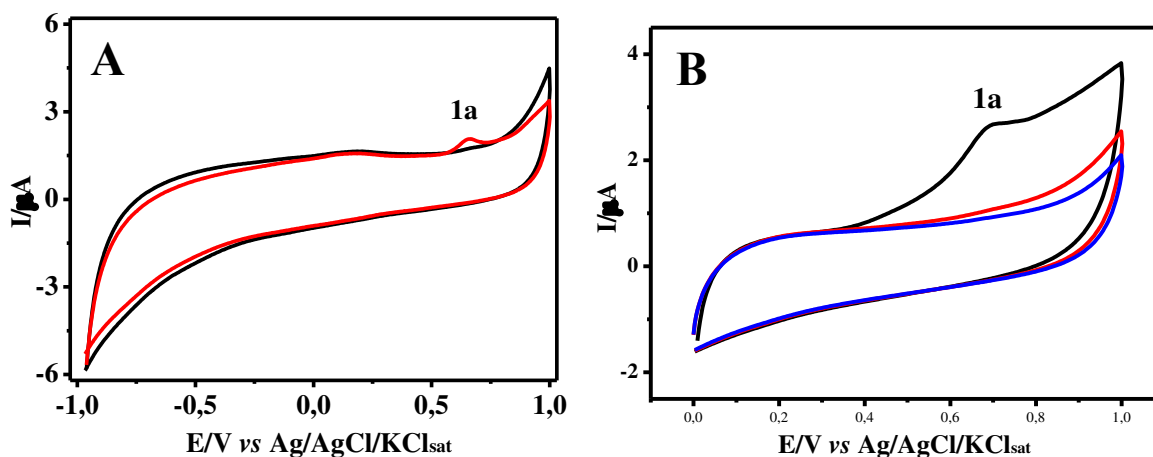
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Investigação das Propriedades redox da Ifosfamida

Inicialmente, o comportamento eletroquímico da ifosfamida (IF) $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ sobre a ECV foi avaliado por VC, nos intervalos de potencial aberto (-1,0 a 1,0 V) e fechado (-0,01 a 1,1V). Os voltamogramas estão ilustrados na **Figura 14.A** e **14.B**, respectivamente.

Na **Figura 14.A**, em intervalo aberto observou-se a formação de um pico anódico 1_a em torno de $0,65 \text{ V vs Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$, este pico é indicativo da provável oxidação da IF. No intervalo fechado foi repetido o estudo, com o objetivo de visualizar se o composto adsorvia na superfície do eletrodo, e verificou-se que o pico 1_a é observado em $0,68 \text{ V vs Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ no primeiro ciclo, e a partir do segundo ciclo, verificou-se que não houve mais o processo de oxidação (**Figura 14.B**), indicando a provável passivação do eletrodo. Estes resultados estão de acordo com o reportado na literatura [65].

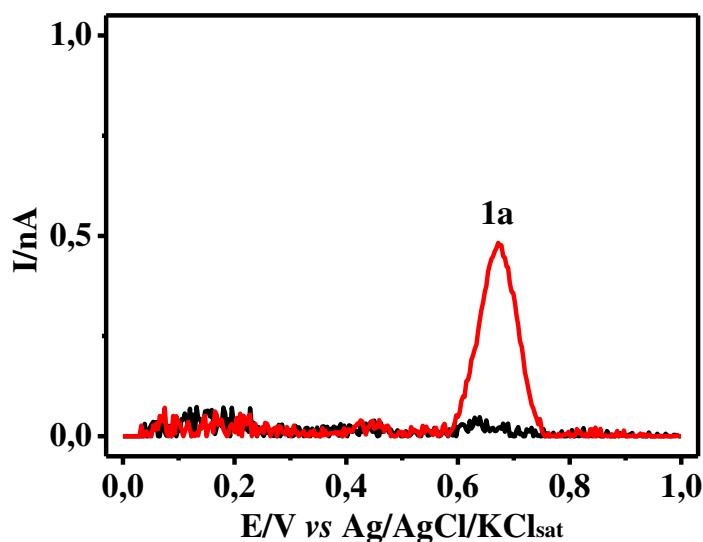
Figura 14 (A) Voltamogramas cíclicos obtidos sobre a superfície do ECV realizados em solução tampão fosfato pH 7,0 (—) na ausência e (—) presença de IF $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, com $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Voltamogramas cíclicos da IF obtidos após o (—)1º, (—) 2º e (—) 3º ciclo; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Destaque para o pico 1_a , equivalente ao pico anódico da IF.



A oxidação da IF também foi avaliada utilizando-se VPD (**Figura 15**). Os voltamogramas foram obtidos em solução tampão fosfato (pH 7,0) na ausência e presença de IF 1 mmol L^{-1} . O pico de oxidação da IF (1_a) foi visualizado em $0,67 \text{ V vs Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$. O estudo em VPD para oxidação da IF também foi realizado em uma faixa de pH entre 3,0 e 12,0,

porém a possível passivação na superfície do eletrodo impossibilitou a obtenção da resposta eletroquímica. Este comportamento redox também está de acordo com a literatura [65].

Figura 15. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida sobre ECV realizados em solução tampão fosfato pH 7,0 (—) na ausência e (—) presença de IF 1,0 mmol/L 1_a . $\Delta E_s = 2$ mV, $\Delta E_t = 70$ ms e $v = 5$ mV s⁻¹. Destaque para o pico 1_a , equivalente ao pico anódico da IF.



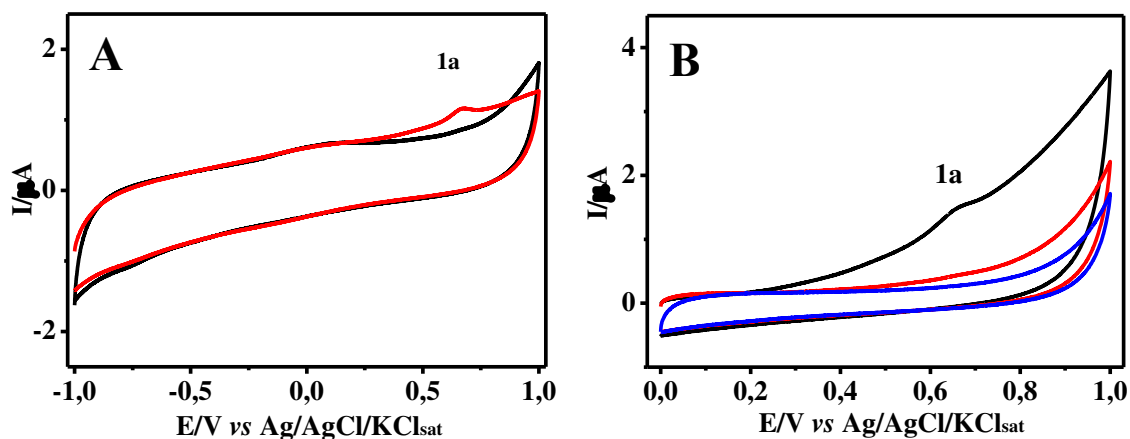
Desta forma, a IF não teve respostas significativas, havendo a possibilidade deste composto não ser eletroativo na superfície do eletrodo liso, ECV.

5.2 Investigação das Propriedades redox da Ciclofosfamida

Medidas eletroquímicas por VC foram realizadas a fim de investigar o comportamento eletroquímico da CF 1 mmol L⁻¹ na superfície do eletrodo ECV. Os voltamogramas foram obtidos no intervalo de potencial aberto (-1,0 a 1,0V) e fechado (0,0 a 1,0V), e estão demonstrados na **Figura 16.A e 16.B**, respectivamente.

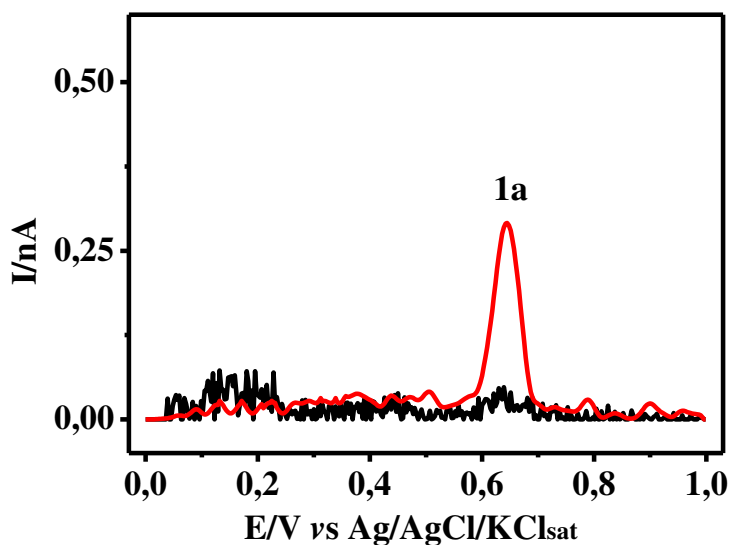
Na **Figura 16.A**, observou-se a formação de um pico anódico 1_a com intensidade de corrente muito pequena em $E_p = 0,65$ V, correspondendo à CF. No intervalo de potencial fechado, nas mesmas condições experimentais, foi observado somente no primeiro ciclo o pico 1_a em 0,65V; a partir dos ciclos subsequentes, não foi observado mais o processo de oxidação, indicando a provável passivação do eletrodo (**Figura 16.B**). Este resultado segue o mesmo perfil observado anteriormente pela IF, estando, portanto, em concordância com o reportado na literatura [65].

Figura 16 (A) Voltamogramas cíclicos obtidos sobre a superfície do ECV realizados em solução tampão fosfato pH 7,0 (—) na ausência e (—) presença de CF 1 mmol L⁻¹, com $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Voltamogramas cíclicos da CF obtidos após o (—) 1º, (—) 2º e (—) 3º ciclo; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Destaque para o pico 1_a, equivalente ao pico anódico da CF.



O comportamento eletroquímico da CF também foi estudado por VPD (**Figura 17**), com o objetivo de obter melhores valores de corrente. Os voltamogramas foram obtidos em solução tampão fosfato pH 7,0 na ausência e na presença de CF 1 mmol L⁻¹, obtendo um pico de oxidação 1_a em 0,64V vs Ag/AgCl/KCl_{sat}, correspondente a CF (**Figura 17**).

Figura 17. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida sobre ECV realizados em solução tampão fosfato pH 7,0 (—) na ausência e (—) presença de CF 1,0 mmol/L 1_a. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. Destaque para o pico 1_a, equivalente ao pico anódico da CF.



Como os compostos IF e CF são isômeros, eles apresentam comportamentos eletroquímicos semelhantes. A literatura [65] reporta que CF passiva a área ativa do sensor não modificado, impossibilitando o avanço do estudo eletroquímico. No entanto, como o objetivo deste trabalho foi a interação dos pró-fármacos com o *dsDNA*, o estudo eletroquímico inicial foi

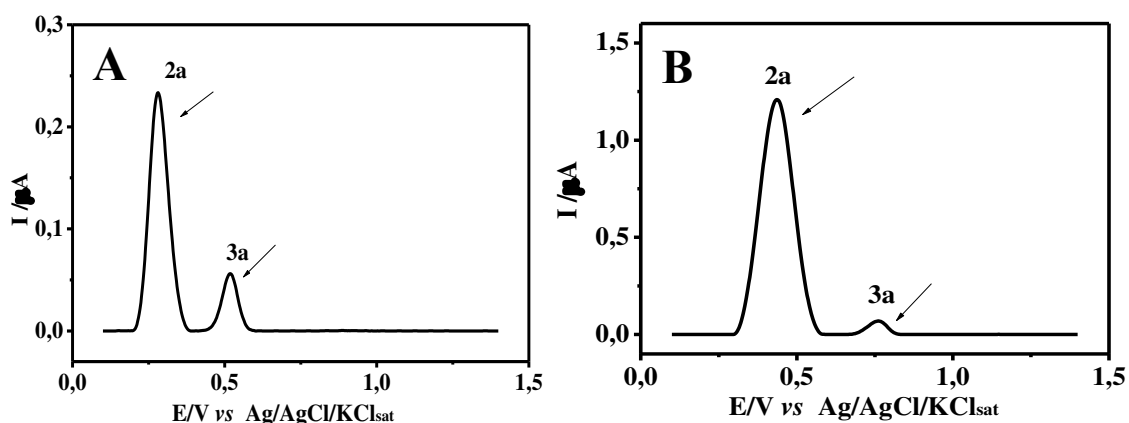
feito com o objetivo de saber se os compostos intercalam nas bases do DNA, a partir da comparação dos potenciais obtidos por VC e VPD da IF e CF com o estudo de interação do *dsDNA*.

5.3 Comportamento Eletroquímico da IF e CF Degradada

O comportamento eletroquímico de soluções 1 mmol L^{-1} de ifosfamida degradada (dIF) e ciclofosfamida degradada (dCF) por 47 dias sob ECV, foram avaliados por VPD no intervalo de potencial de 0,1 a 1,4 V.

Neste estudo, houve formação de dois picos anódicos para dIF e dCF. O processo de oxidação para dIF com formação dos picos anódicos 2_a e 3_a , foram observados em 0,27 e 0,51. Na dCF, os picos de oxidação 2_a e 3_a , foram observados em 0,43 e 0,51 V. Os voltamogramas de dIF e dCF estão ilustrados na **Figura 18.A** e **18.B**, respectivamente.

Figura 18 (A) Voltamograma de pulso diferencial com linha de base corrigida da dIF 1 mmol L^{-1} (degradada por 47 dias) obtido sobre a superfície do ECV em tampão fosfato pH 7,0.(B) Voltamograma de pulso diferencial com linha de base corrigida da dCF 1 mmol L^{-1} (degradada por 47 dias) obtido sobre a superfície do ECV em tampão fosfato pH 7,0. Destaque para os picos anódicos 2_a e 3_a , referentes à hidroxilação da IF e CF, respectivamente.



Estes resultados podem ser explicados em função da hidroxilação dos átomos de carbono, levando à liberação e formação espontâneas de dois produtos de degradação, acroleína e mostarda ifosforamida [44, 46].

O objetivo do estudo eletroquímico dos compostos dIF e dCF foi verificar se os compostos degradados, ao interagirem com o *dsDNA*, sofrem processo de intercalação nas bases do *dsDNA*, tanto da oxidação da IF e CF quanto dos seus produtos de degradação à

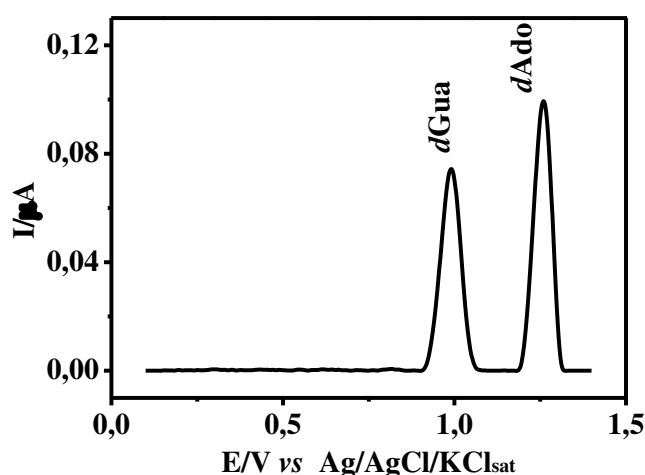
superfície do eletrodo. Estes resultados podem contribuir de forma direta no estudo de interação, através das respostas eletroquímicas de IF, CF, dIF e dCF, estudadas inicialmente.

5.4 Interação da Ifosfamida e ciclofosfamida com o DNA

O DNA vem sofrendo alterações através de diversos fatores de riscos, de forma direta ou indireta, encontrados no ambiente, no uso dos quimioterápicos, ou de forma hereditária, ocasionando a mutação celular e dando origem ao câncer.

O DNA é considerado o alvo principal na interação com uma molécula. Neste trabalho, a interação com o *dsDNA* foi estudada eletroquimicamente por meio comparativo da oxidação dos ribonucleótidos de desoxiguanosina (*dGua*) e desoxiadenosina (*dAdo*). O perfil obtido somente com *dsDNA* (**Figura 19**), *dGua* e *dAdo* é utilizado para comparar com os perfis obtidos na presença dos antineoplásicos (IF, CF, dIF e dCF), a fim de observar a mudança conformacional na dupla hélice do *dsDNA* e o aparecimento de novos produtos de oxidação oriundo do ataque das bases do *dsDNA*. Os biossensores a base de DNA e as soluções com DNA foram utilizados com o objetivo de estudar a interação do *dsDNA* com IF e CF e seus produtos de degradação e, propor um sistema eletroquímico simples e sensível.

Figura 19. Voltamograma de pulso diferencial com linha de base corrigida de uma solução de *dsDNA* 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em tampão acetato pH 4,5 sobre o ECV, na ausência do fármaco, utilizado como controle. Destaque para os picos anódicos de desoxiguanosina (*dGua*) e desoxiadenina (*dAdo*).



Os voltamogramas utilizados como controle foram realizados em tampão acetato (pH 4,5) [68], apresentando potenciais da *dGua* e *dAdo* em torno de $E_{p1} = +1,05 \text{ V}$ e $E_{p2} = +1,33 \text{ V}$, respectivamente, conforme representado na (**Figura 19**) [30].

Durante o processo de interação com o antineoplásico, as bases do DNA podem ser modificadas gerando produtos intercalados na dupla hélice do DNA, como a 8-oxoguanina (8-

oxoGua) e 2,8-dihidroxiadenina (2,8-dhA), os quais são mutagênicos, causando danos oxidativos nas bases do DNA [110-112]. A mutação que requer mais atenção é a que produz 8-oxoGua, gerada do produto de oxidação da guanina [67, 111, 113].

O estudo da interação da IF e CF e dos seus produtos de degradação com o DNA teve como objetivo comprovar os possíveis danos oxidativos nas bases do *dsDNA*, além de verificar as mudanças conformacionais na dupla hélice do *dsDNA* e a clivagem nas ligações de hidrogênio.

Todo o estudo de interação fármaco-*dsDNA* foi estudado por comparação dos sinais eletroanalíticos dos nucleotídeos *dGua* e *dAdo*.

5.4.1 Estudo da interação da IF-*dsDNA* e dIF-*dsDNA* em solução.

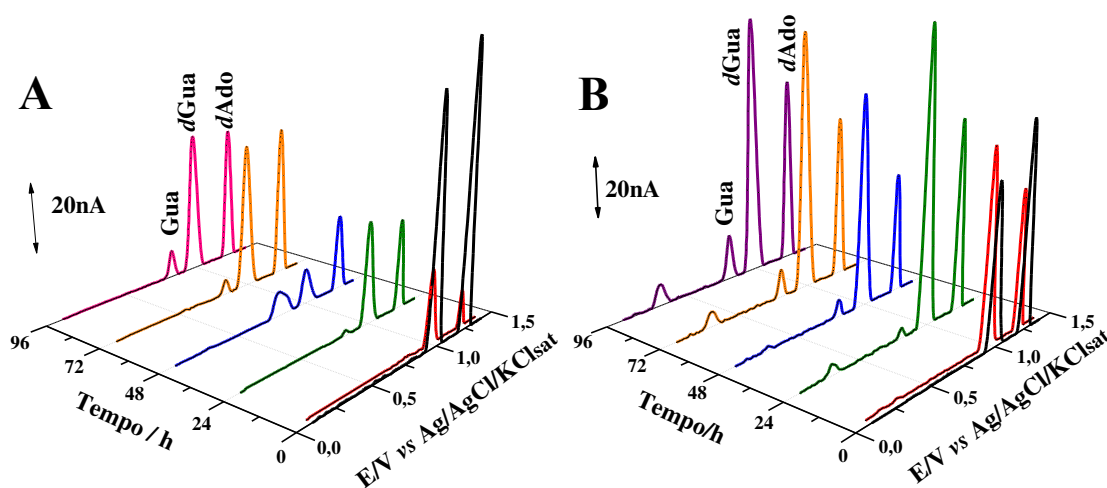
Os estudos de interação da IF e dIF com o *dsDNA* em solução, entre um tempo e outro de incubação foram realizados por VPD, conforme apresentado na **Figura 20.A e 20.B**, respectivamente.

Na **Figura 20.A**, observou-se a queda na corrente de oxidação, de *dGua* e *dAdo*, em todos os tempos, quando comparado ao voltamograma de controle. Esses resultados mostram que houve compactamento da cadeia da dupla hélice do *dsDNA*. No entanto, nos tempos de 0 e 24 h houve a inversão dos picos de *dAdo* e *dGua*, este comportamento pode ser oriundo da dificuldade das bases nitrogenadas em oxidar-se sobre a superfície do eletrodo, devido à forte interação IF-*dsDNA*. A guanina foi liberada através da oxidação da *dGua* a partir de 24 h de incubação, $E_p = 0,85$ V [112]. No intervalo compreendido entre 0 e 96 h, não foi observada oxidação da 8-oxoGua (Apêndice 3), mas segundo a literatura [6], a IF só tem atividade após ser metabolizado na enzima hepática, para que seus metabolitos possam exercer o efeito alquilante no *dsDNA*. Justificando a inatividade *in vitro* [6].

A interação da dIF com o *dsDNA* também foi investigada nas mesmas condições experimentais da IF. Foi possível observar, na **Figura 20.B**, que após a interação dIF-*dsDNA*, os picos de oxidação *dGua* e *dAdo* das bases do *dsDNA* se inverteram, comparado ao voltamograma do controle. Esta inversão, pode ter ocorrido devido a uma mudança na conformação do *dsDNA* com o desenrolamento das cadeias helicoidais. Além disso, foi observado que o pico de oxidação da *dGua* aumentou, quando comparado ao do controle, havendo um indício de abertura de uma das hélices da cadeia. Já o pico de oxidação da *dAdo* diminuiu; esse comportamento está relacionado com a condensação da hélice do *dsDNA*, que se compacta ao interagir com o quimioterápico dificultado o seu aparecimento na superfície do

eletrodo. Também foi observado, nos tempos compreendidos entre 24 e 96 h para dIF, a formação de um novo pico em torno de $E_p = +0,86$ V correspondente à oxidação da guanina livre (Gua). A intensidade da corrente deste novo pico aumentou com o aumento do tempo de incubação. Um pico de oxidação em torno de $E_p = 0,27$ V foi observado em todos os tempos de incubação com dIF, podendo ser decorrente de um dos produtos de degradação da IF (Apêndice 3). Este resultado, mostra que o metabólito, além de ter forte interação dIF-*dsDNA*, ainda intercala nas bases do *dsDNA*.

Figura 20 (A) Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida em uma solução contendo *dsDNA* $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e IF $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão acetato (pH 4,5), sobre o ECV, com *dsDNA* antes – controle – (—) e após diferentes tempos de incubação 0 (—), 24 (—), 48 (—), 72 (—) e 96h (—). (B) dIF $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, degradada por 47 dias, com *dsDNA* antes – controle (—) e após diferentes tempos de incubação: 1h (—); 24h (—); 48h (—); 72h (—) e 96h (—). Destaque para os picos anódicos da guanina (Gua), desoxiguanosina (*dGua*) e desoxiadenina (*dAdo*).



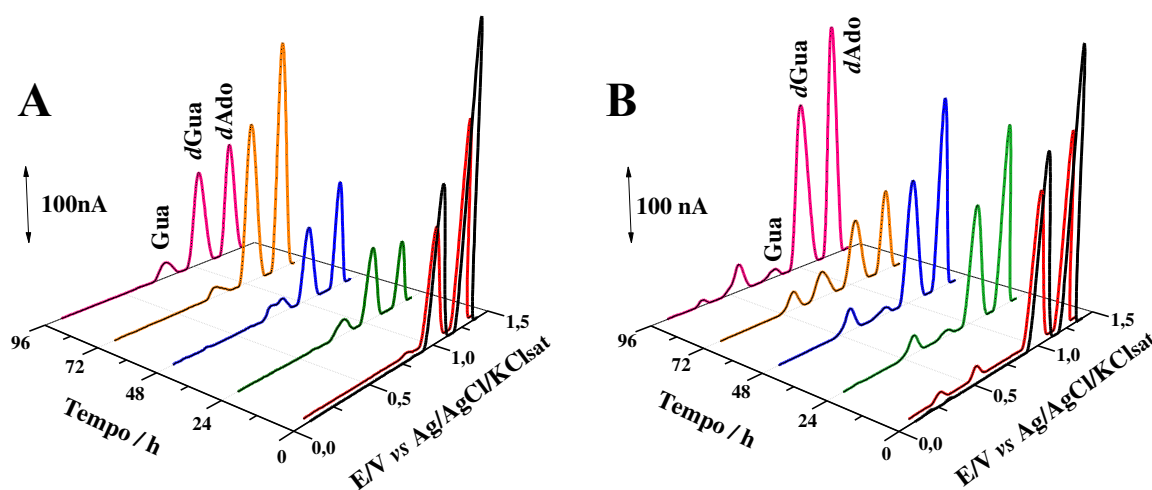
No entanto, observou-se que mesmo com a ausência da oxidação da 8-oxiGua, houve interação de IF e dIF com o *dsDNA*, resultando na compactação da cadeia de dupla hélice das bases *dGua* e *dAdo*. Esse comportamento pode ser visualizado por meio da queda nas correntes de pico da *dGua* e *dAdo*, além de ter possibilitado a saída da guanina da estrutura do *dsDNA* para ser oxidada na superfície do eletrodo, indicando que tanto a IF quanto a dIF possuem mais afinidade com a *dGua* do que com *dAdo*.

5.4.2 Estudo da interação da IF-*dsDNA* e dIF-*dsDNA* utilizando biossensores de *dsDNA*

Neste estudo, a interação fármaco-*dsDNA*, foi realizada por meio de biossensores modificados com *dsDNA* e incubados em soluções de IF e dIF $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ é representada pelos voltamogramas obtidos na **Figura 21.A** e **21.B**, respectivamente.

Na **Figura 21.A** foi possível observar um decaimento na corrente de oxidação das bases dos nucleotídeos, *dGua* e *dAdo*, nos tempos compreendidos entre 0 e 48 h. Este comportamento foi referente à condensação da dupla hélice do *dsDNA*, que se compacta ao interagir com o quimioterápico, demonstrando intensa interação da IF com o *dsDNA*, dificultando a oxidação das bases do *dsDNA* sobre a superfície do eletrodo [68]. Observou-se também um aumento na intensidade dos picos nas bases nitrogenadas nos tempos de 48 e 72 h, podendo ser um indício da abertura da cadeia da dupla hélice do *dsDNA*, no entanto, no tempo de 96 h a corrente do pico de oxidação dessas bases diminuiu, voltando a condensar a cadeia. A liberação da Gua foi observada em torno de $E_p = 0,84$ V em todos os tempos de incubação. Com aumento do tempo de interação, a intensidade da corrente do pico de oxidação da Gua aumentou (Apêndice 3). Não foram observados danos irreparáveis da 8-oxoGua em nenhum dos tempos

Figura 21.(A) Voltamograma de pulso diferencial com linha de base corrigida para um biossensor de DNA $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de controle em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5 sobre o eletrodo de carbono vítreo ECV antes (—) e após diferentes tempos de incubação em solução de IF $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, 0 (—), 24 (—), 48 (—), 72 (—), 96h (—) **(B)** dIF $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ após 47 dias de degradação, com *dsDNA* antes – controle (—) e após diferentes tempos de incubação: 0 (—), 24 (—), 48 (—), 72 (—), 96h (—). Destaque para os picos anódicos da guanina (Gua), desoxiguanosina (*dGua*) e desoxiadenina (*dAdo*).



Para o estudo do dIF-*dsDNA*, foi adotado o mesmo procedimento utilizado para o IF-*dsDNA*. Porém, ao se comparar os voltamogramas supracitados, nota-se que a interação foi mais acentuada com os produtos de oxidação da dIF, quando observada a queda na corrente dos nucleosídeos do *dsDNA* (**Figura 21.B**). Portanto, os produtos de degradação levam mais facilmente ao condensamento da cadeia de *dsDNA* comparada com a interação com a IF não

degradada. No voltamograma da **Figura 21.B** observou-se um pico em torno de $E_p = 0,85$ V a partir de 24 h de incubação, indicando que houve liberação da guanina, devido à interação do fármaco com o *dsDNA* (Apêndice 3). No biossensor de *dsDNA* interagindo com dIF, a intensidade da interação foi mais acentuada comparada com IF não degradada, com valores de correntes mais altos. O produto de degradação oxidado primeiro na superfície do eletrodo em torno de $E_{p1} = 0,26$ V só aparece nos tempos de 0h e 96h, já o segundo pico proveniente também do produto de degradação da IF foi oxidado em torno de $E_{p2} = 0,56$ V e intercalou em todos os tempos de incubação, com a corrente aumentando com o tempo de incubação.

Este estudo mostrou que tanto IF quanto a dIF interagiram com o *dsDNA*, e melhores resultados foram obtidos com a interação dos produtos de degradação (dIF) oriundos da IF, mostrando que estes interagiram de forma mais acentuada, alquilando o *dsDNA*.

Comparado ao estudo somente em solução, os biossensores forneceram melhores valores de correntes e melhores respostas na oxidação dos picos de interação do composto e seus produtos de degradação o *dsDNA*, com a queda na corrente dos nucleosídeos do *dsDNA*. No biossensor, a interferência no processo de adsorção do analito estudado foi menor, pois as camadas de *dsDNA* fixadas na superfície do eletrodo garantiram que a resposta voltamétrica foi decorrente apenas da oxidação dos nucleotídeos do *dsDNA*, a *dGua* e *dAde* (Apêndice 3).

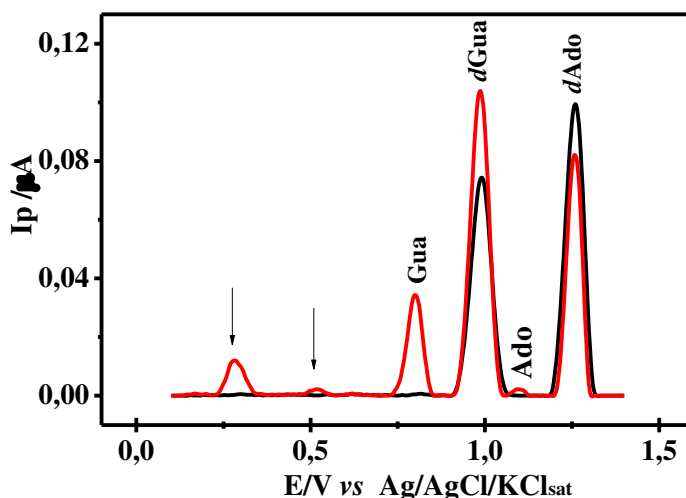
5.4.3 Estudo da interação da IF com *dsDNA* quando o composto começa a degradar

O biossensor de *dsDNA* $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ incubado em solução de IF $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 4,5 por 196 h, visa verificar o início de degradação da IF e o começo da intercalação deste metabólito na dupla fita do *dsDNA*.

Na **Figura 22** observa-se mudança na conformação *dsDNA* com o desenrolamento das cadeias helicoidais. O pico de oxidação da guanina livre teve um aumento acentuado com o tempo de incubação. Observou-se um pico oxidativo em torno de $E_p = 1,17$ V, característico da adenina [67]. O aparecimento de novos picos com $E_p = 0,3$ V e $E_p = 0,5$ V podem ser atribuídos aos produtos de degradação oriundos da degradação da ifosfamida, já que o quimioterápico oxidou primeiro na superfície do eletrodo.

Estes resultados confirmam que os produtos de degradação estudados no item 5.3, intercalam no *dsDNA*, oxidando em $\sim E_{p1} = 0,27$ V e $E_{p2} = 0,56$ V.

Figura 22. Voltamogramas de pulso diferencial realizado em solução tampão acetato pH 4,5 sobre o ECV com linha de base corrigida de uma solução contendo *dsDNA* $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (—) e da mistura de *dsDNA* $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ + IF $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ após 196h de incubação (—). Destaque para os picos anódicos da guanina (Gua), da adenina (Ado), desoxiguanosina (*dGua*) e desoxiadenina (*dAdo*).



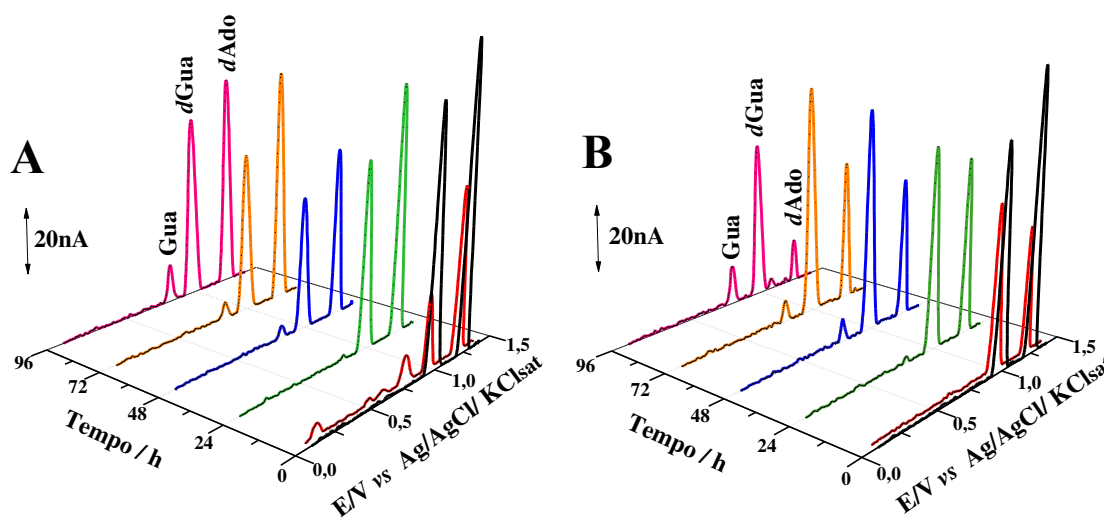
5.4.4 Estudo da interação da CF-*dsDNA* e dCF-*dsDNA* em solução.

Esse estudo foi realizado por VPD em soluções de *dsDNA* e a interação foi comparado por sinais eletroanalíticos referente a *dGua* e *dAdo* na ausência (controle) e na presença da CF e dCF em solução. Os voltamogramas referentes a este estudo estão representados nas **Figura 23.A e 23.B**. O estudo comparativo foi descrito no item 5.4

Na **Figura 23.A**, observou-se uma inversão dos picos nas bases do *dsDNA* em todos os tempos de incubação; provavelmente pode ter ocorrido uma mudança na conformação do *dsDNA* com o desenrolamento das cadeias helicoidais. No entanto, a intensidade dos picos foi menor frente ao controle; tal comportamento pode está relacionado à condensação da hélice do *dsDNA*, que se compacta ao interagir com CF, dificultado a oxidação das bases na superfície do eletrodo. Observou-se que, nos tempos compreendidos entre 24 e 96 h, houve a formação de um novo pico em torno de $E_p = +0,83 \text{ V}$, correspondente à oxidação da guanina livre (Gua), aumentando a intensidade da corrente com o aumento do tempo de incubação (Apêndice 3). Tal aumento corresponde à concentração de Gua livre em solução.

Para os estudos com a solução quimicamente degradada de CF (dCF), foi observado um comportamento semelhante, porém com maior interação, onde a condensação do *dsDNA* foi imediata, visto que ocorreu a diminuição do pico de oxidação da *dGua* e *dAdo* (**Figura 23.B**). Observou-se a formação de Gua livre em todos os tempos de incubação, no qual os tempos de 24 e 96 h apresentaram picos maiores e mais definidos da oxidação da Gua (Apêndice 3).

Figura 23. (A) Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida de uma solução de *dsDNA* $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e CF $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 4,5 sobre o ECV. Com *dsDNA* $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ sendo controle (—); em solução nos tempos de 1 (—); 24 (—); 48 (—); 72 (—) e 96h (—) de incubação. (B) dCF $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, degradada por 47 dias, com *dsDNA* antes – controle (—) e após diferentes tempos de incubação: 1h (—); 24h (—); 48h (—); 72h (—) e 96h (—). Destaque para os picos anódicos da guanina (Gua), desoxiguanosina (*dGua*) e desoxiadenina (*dAdo*).



Portanto, os estudos mostraram que ocorre interação entre o *dsDNA* e CF em solução e que a solução degradada apresentou resultados de interação em menor tempo.

5.4.5 Estudo da interação da CF e dCF com *dsDNA* utilizando biossensores de *dsDNA*

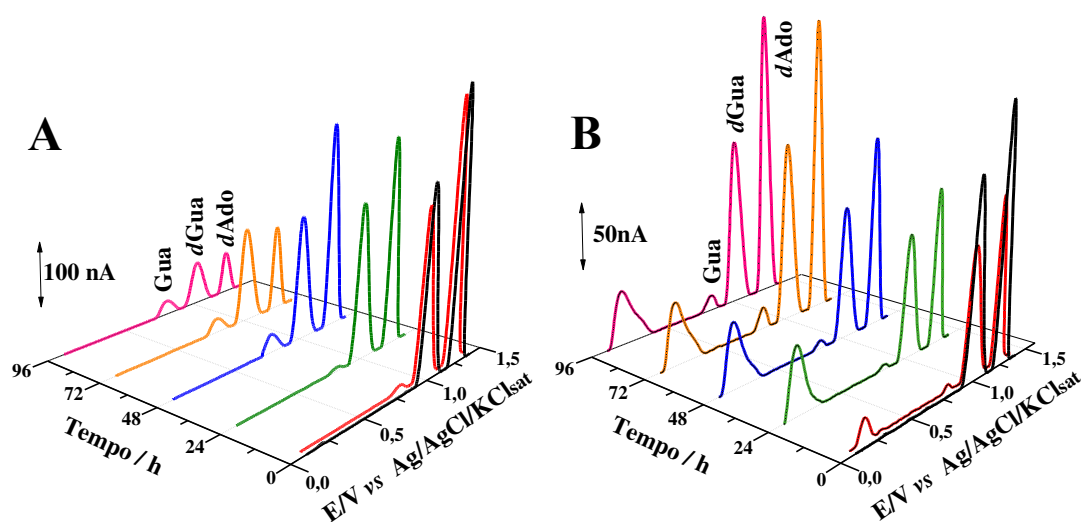
O estudo da interação fármaco-*dsDNA* foi realizado por meio de biossensores modificados com *dsDNA*, incubado-os em soluções de CF e dCF $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Os voltamogramas foram obtidos em diferentes tempos de incubação, conforme visto nas **Figura 24.A** e **24.B**, respectivamente.

Na **Figura 24.A** observou-se que a intensidade da corrente dos picos de oxidação da *dGua* e *dAdo* foram decrescendo, quando comparados ao controle somente com *dsDNA*. Tal comportamento indica que houve forte interação do composto nas bases do *dsDNA*, que se compactam ao interagir com CF, dificultado a oxidação das bases na superfície do eletrodo. A guanina, $E_p = +0,83\text{V}$, oxidou em todos os tempos de incubação, aumentando a intensidade da corrente com o aumento do tempo de incubação (Apêndice 3). Este resultado foi explicado pela forte interação da CF com a base *dGua*, que diminui com o aumento da oxidação da guanina.

Na **Figura 24.B** referente a interação do biossensor de *dsDNA* com o composto degradado, observou-se uma diminuição na corrente de oxidação das bases dos nucleotídeos, *dGua* e *dAdo*, nos tempos compreendidos entre 0 a 48 h. Tal comportamento foi referente à

condensação da dupla hélice do *dsDNA*, que se compacta ao interagir com o quimioterápico, demonstrando intensa interação dCF – *dsDNA*. Porém, houve um aumento na intensidade dos picos da *dGua* e *dAdo* nos tempos de 72 e 96h, podendo ser um indício da abertura da cadeia da dupla hélice do *dsDNA*. Houve também a liberação da Gua com potencial em torno de $E_p = 0,85$ V em todos os tempos de incubação. Também observou-se a existência da possível intercalação do produto de degradação advindo da CF sobre a fita dupla de *dsDNA*, oxidado primeiro na superfície do eletrodo em torno de $E_p = 0,19$ V e aumento da corrente com o aumento do tempo de incubação (Apêndice 3). A oxidação deste produto de degradação intercalado nas bases do *dsDNA* confirmou o estudo da seção 5.3.

Figura 24 (A) Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida para um biossensor de *dsDNA* $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de controle (—) em tampão acetato pH 4,5 sobre o eletrodo de carbono vítreo ECV e após diferentes tempos de incubação em solução de CF $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ após 47 dias de degradação, 0h (—), 24h (—), 48h (—), 72h (—), 96h (—). (B) dCF $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ após 47 dias de degradação, com *dsDNA* antes – controle (—) e após diferentes tempos de incubação: 0 (—), 24 (—), 48 (—), 72 (—), 96h (—). Destaque para os picos anódicos da guanina (Gua), desoxiguanosina (*dGua*) e desoxiadenina (*dAdo*).

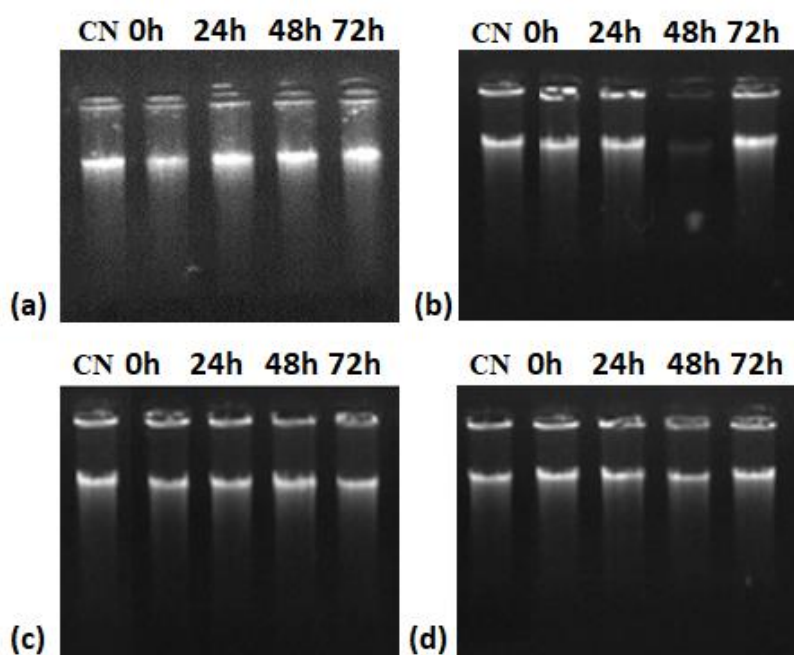


Utilizando-se o biossensor de *dsDNA*, foram obtidos melhores respostas, com valores de corrente mais elevados comparado ao estudo apresentado no item 5.4.4, pois garantiu que a resposta visualizada por VPD fosse derivada apenas da oxidação das bases *dGua* e *dAdo* do *dsDNA*. Portanto, o biossensor proporcionou sensibilidade e seletividade em suas respostas eletroquímicas.

5.5 Eletroforese da IF, dIF, CF e dCF com o *dsDNA*

O estudo de eletroforese em gel foi realizado para comparar o perfil de migração do *dsDNA* [114], a fim de detectar alterações conformacionais provocadas por possíveis danos no *dsDNA*, após a interação das soluções IF, dIF, CF, dCF. A **Figura 25** apresentou os perfis de migração eletroforéticos das amostras incubadas de *dsDNA* $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ com solução $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de IF, dIF, CF, dCF nos tempos crescentes de 0 a 72h.

Figura 25. Eletroforese em gel de agarose, em DNA $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de controle negativo (CN), em solução aquosa de (a)IF, (b) dIF, (c) CF e (d) dCF $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ nos tempos de 0, 24, 48 e 72h.



A presença de uma banda única indica que o *dsDNA* está íntegro, ou seja, não houve fragmentação da molécula, após tratamento com IF, dIF, CF, dCF quando comparado com o controle negativo (**Figura 25**). A ausência de diferença significativa nas bandas (“arrasto de DNA”) indica que, nas condições estudadas, não houve alquilação no *dsDNA* pela IF, dIF, CF e dCF.

Os resultados deste estudo eletroforético, portanto, confirmam parte dos resultados obtidos por VPD, os quais não evidenciam dano direto no *dsDNA*. Isso indicou que, na ausência de uma enzima hepática, estes compostos não são metabolizados *in vitro* e por consequência, o *dsDNA* possivelmente não sofreu danos.

5.6 Teste do Cometa *in vitro*

Para confirmar os resultados obtidos no estudo eletroquímico e na análise do gel de *dsDNA*, avaliou-se o potencial genotóxico (lesões diretas ao DNA pré-mutagênicas) dos compostos IF e CF nos tempos de 3 e 24 h, utilizando o teste cometa que detecta lesões ao DNA diretamente nas células humanas, em um modelo *in vitro*. Segundo a literatura [104], este ensaio não só detecta as lesões como identifica e repara quebra na fita simples e dupla da cadeia do DNA, de acordo com o meio trabalhado (neutro ou alcalino)

Para os parâmetros reprodutivos, após o tratamento de 3 h, os resultados mostraram que não houve distribuição homogênea entre os grupos, sem diferenças significativas na quantidade de danos ao *dsDNA* (medida pelo escores de danos), entre o grupo tratado comparado ao controle negativo (CN), para ambos os compostos (IF e CF). Já entre os grupos CN e CP (controles negativo e positivo), as diferenças foram significativas ($p < 0,05$). Os mesmos resultados foram encontrados para o tempo de exposição de 24h, demonstrando que, considerando um tempo de exposição de até 24 h os compostos IF e CF não causam danos genotóxicos ao *dsDNA* (**Figura 26**) (**Tabela 2**).

Os dados obtidos nos estudos de interação com *dsDNA* demonstraram que ambos os compostos não fragmentam o *dsDNA* (**Figura 26**), não causam lesões diretas nem efeitos genotóxicos no DNA presente em células sanguíneas humanas (**Figura 26**), sustentando, desta forma, os resultados obtidos nos estudos eletroquímicos.

Para elucidar como IF e CF interagiriam com o DNA, seria necessário a utilização de um teste de cometa modificado com enzimas específicas que reconhecem diferentes tipos de danos oxidativos [104, 109, 115]. As enzimas bacteriais formamidopirimidina-DNA, glicosilase (Fpg) e endonuclease III (Endo III) são específicas para identificar a abertura do anel de bases purinas e pirimidinas. O Fpg é específico para purinas oxidadas, incluindo a 8-oxoGua [109, 116]. Isso pode ser melhor estudado posteriormente.

Figura 26. Escores de dano de DNA e frequência de classes presentes nos nucleoides de leucócitos de sangue periférico (PBMC) em indivíduos saudáveis após 3h e 24h de exposição com solução de 0,5 mol L⁻¹ IF e CF. Destaque para CN- controle negativo; CP- controle positivo; IF- ifosfamida, CF- ciclofosfamida, C0- classe 0; C1- classe 1; C2- classe 2; C3- classe 3 e C4- classe 4. ns- diferenças estatisticamente não significativas; * p<0,05%

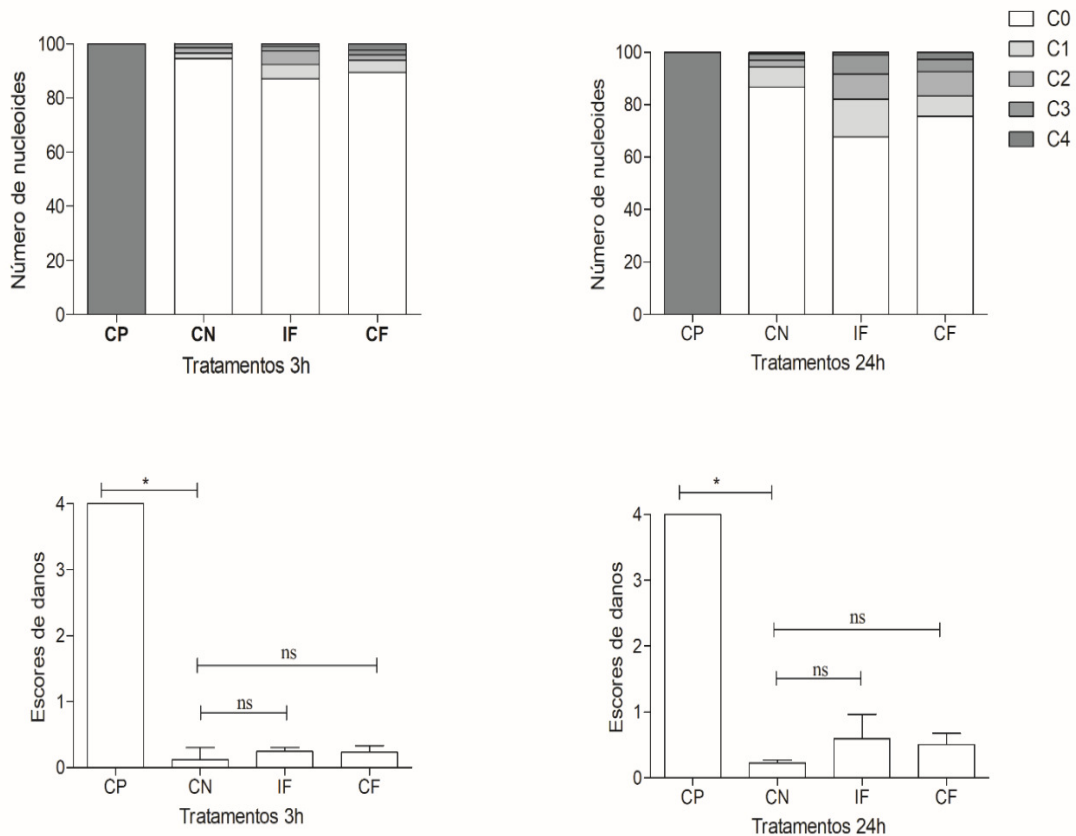


Tabela 2. Escores de danos no DNA e frequência de classes observadas pelo teste do COMETA em sangue periférico (PBMC) de indivíduos saudáveis após 3 e 24 horas de exposição a IF e CF 0,5 mol L⁻¹ durante 3 e 24 horas.

Tratamento	CLASSES (%)					ESCORE
	0	1	2	3	4	Média ± DP
3 h						
CP	0,0	0,0	0,0	0,0	100	4,00 ± 0,00
CN	94,7	1,3	2,0	1,3	0,7	0,12 ± 0,18
IF	87,0	5,3	5,0	1,7	1,0	0,24 ± 0,06
CF	89,3	4,7	2,0	1,7	2,3	0,23 ± 0,18
24 h						
CP	0,0	0,0	0,0	0,0	100	4,00 ± 0,00
CN	86,7	7,7	2,7	2,3	0,7	0,23 ± 0,08
IF	67,7	14,3	9,7	7,3	1,0	0,60 ± 0,24
CF	75,7	7,7	9,3	4,7	2,7	0,51 ± 0,29

Os dados não apresentaram distribuição normal e submetidos ao teste Kruskal-Wallis seguido de Dunn's, com p<0,05. CP (peróxido de hidrogênio 3%); CN: RPMI.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, foram desenvolvidos biossensores à base de *dsDNA* para investigar o processo de interação do DNA com os pró-fármacos IF e CF e seus produtos de degradação (dIF e dCF), *in vitro*, levando em consideração as características e variáveis, pH e temperatura, que se assemelhassem ao processo intracelular (*in vivo*). O mecanismo de interação do *dsDNA* foi estudado inicialmente por dois processos distintos, em solução e por adsorção à superfície do eletrodo (biossensor). Os resultados mostraram que tanto em solução quanto no biossensor houve forte interação do composto com o *dsDNA*, mas o que diferiu esses dois estudos foi a intensidade da corrente dos picos oxidados na superfície do sensor, obtendo melhores valores de corrente no biossensor. Isso porque, nesse estudo, a interferência no processo de adsorção do analito foi bem menor, já que a modificação na superfície do eletrodo com *dsDNA* garantiu que a oxidação fosse somente dos nucleosídeos, *dGua* e *dAdo*. Isso resultou na sensibilidade e seletividade do biossensor desenvolvido.

As interações *in situ* entre IF-*dsDNA*, dIF-*dsDNA* e CF-*dsDNA*, dCF-*dsDNA* foram estudadas por VPD, e também mostraram que tanto a IF e CF quanto os seus produtos de degradação interagiram com o *dsDNA*, condensando a cadeia polinucleotídica. A guanina foi liberada em ambos os estudos. Os resultados do estudo com o biossensor apresentaram indícios de que a IF e CF provavelmente intercalam na fita dupla de *dsDNA*. Foi feito um breve estudo eletroquímico, avaliando-se as respostas eletroquímicas dos potenciais de IF e CF, dIF e dCF.

O biomarcador 8-oxoGua não foi encontrado, pois os compostos precisavam ser metabolizados primeiro em uma enzima hepática para que seus metabólitos possam ter efeito citotóxico e genotóxico. Portanto, nas condições estudadas, *in vitro*, não houve danos oxidativos no *dsDNA*.

O estudo de interação com IF-*dsDNA*, dIF-*dsDNA* e CF-*dsDNA*, dCF-*dsDNA*, foi realizado por eletroforese e a técnica do cometa, tendo como resultados ausência de fragmentação no *dsDNA* e nas das células mononucleares de sangue periférico, respectivamente, nas condições estudadas, *in vitro*. Isso confirmou os resultados obtidos nos testes de interação, por meio da técnica eletroquímica, VPD.

Pelo exposto, pode se afirmar que o biossensor desenvolvido apresenta-se como um novo estudo de interação do *dsDNA* com IF e CF, como um método sensível, seletivo e de fácil reprodução. Podendo, portanto, ser aplicado em estudos com outros quimioterápicos.

A proposta de interação do pró-fármaco com o *dsDNA* desse trabalho pode ser utilizada de forma positiva para outras pesquisas, na busca do tratamento contra o câncer e no desenvolvimento de novos quimioterápicos.

TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Estudar o comportamento eletroquímico dos produtos de degradação da IF e CF em solução aquosa, utilizando as técnicas de voltametria cíclica (VC), voltametria de pulso diferencial (VPD) e voltametria de onda quadrada (VOQ), em diferentes pH;
- ✓ Propor um mecanismo redox dos produtos de degradação de IF e CF em solução aquosa;
- ✓ Considerando que o ensaio cometa detecta lesões genômicas, e que a literatura discorre que a ciclofosfamida possui efeito clastogênicos (a quebra dos cromossomos) sobre as células do DNA, *in vitro* e *in vivo*, seria importante realizar um teste de micronúcleo para determinar se essas lesões primárias causadas por dano oxidativo da IF e CF, e propor um mecanismo de reparo ao DNA [117].

REFERÊNCIAS

1. ZHAO, R. et al. Nanomaterial-Based Organelles Protect Normal Cells against Chemotherapy-Induced Cytotoxicity. **Advanced Materials**, v. 30, p. 1-8, 2018.
2. ABOTALEB, M. et al. Chemotherapeutic agents for the treatment of metastatic breast cancer: An update. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 101, p. 458-477, 2018.
3. ALESSANDRA M.WELKER, A. M. et al. Changes in tumor cell heterogeneity after chemotherapy treatment in a xenograft model of glioblastoma. **Neuroscience**, v. 356, p. 35-43, 2017.
4. LUQMANI, Y. A. Mechanisms of Drug Resistance in Cancer Chemotherapy. **Medical principles and Practice**, v. 14, p. 35-48, 2005.
5. LUISI, A. V. et al. Contribution to the Treatment of Nausea and Emesis Induced by Chemotherapy in Children and Adolescents With Osteosarcoma. **Medical Journal**, v. 124, p. 61-65, 2006.
6. ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular não específico que interagem com o DNA: Uma Introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.
7. RUSSO, C. et al. Evaluation of acute and chronic ecotoxicity of cyclophosphamide, ifosfamide, their metabolites/transformation products and UV treated samples. **Environmental Pollution**, v. 233, p. 356-363, 2018.
8. SINGH, R. K.; KUMAR, P. S. D. N.; BHARDWAJ, T. R. Therapeutic journey of nitrogen mustard as alkylating anticancer agents: Historic to future perspectives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 151, p. 401-433.
9. DIMOPOULOS, M. A. et al. Melphalan-induced DNA damage in vitro as a predictor for clinical outcome in multiple myeloma. **Haematologica**, v. 92, p. 1505-1512, 2007.
10. QUIMIOTERAPIA. **INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER**, 11 jul. 2017. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101>.
11. ZHANG, J.; QUAN, T.; ZHOU, S. Clinical Pharmacology of Cyclophosphamide and Ifosfamide. **Current Drug Therapy**, v. 1, p. 55-84, 2006.
12. YANG, H. et al. Benefit from ifosfamide treatment in small-cell lung cancer. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 3, p. 420-424, 2015.
13. SKARBEEK, C. et al. Poly-isoprenylated ifosfamide analogs: Preactivated antitumor agents as free formulation or nanoassemblies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 532, p. 748-756, 2017.

14. BESSE, J. P.; LATOUR, J. F.; GARRIC, J. Anticancer drugs in surface waters: What can we say about the occurrence and environmental significance of cytotoxic, cytostatic and endocrine therapy drugs? **Environment International**, v. 39, p. 73-86, 2012.
15. LAAUSER, C.; HABEKOST, G.; HABEKOST, A. Mass Spectrometric Detection and Reductive Degradation of the Anti-cancer Drugs Ifosfamide and Cyclophosphamide. **Applied Ecology and Environmental Sciences**, v. 6, p. 15-22, 2018.
16. PRASAD, B. B.; KUMAR, A.; SINGH, R. Synthesis of novel monomeric graphene quantum dots and corresponding nanocomposite with molecularly imprinted polymer for electrochemical detection of an anticancerous ifosfamide drug. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 94, p. 1-9, 2017.
17. HOBBS, D. J. et al. Severe paediatric systemic lupus erythematosus nephritis—a single-centre experience. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 25, p. 457-463, 2010.
18. LEHMAN, T. J. A. et al. Prolonged improvement of childhood onset systemic lupus erythematosus following systematic administration of rituximab and cyclophosphamide. **Pediatric Rheumatology**, v. 12, p. 1-4, 2014.
19. JEELANI, R. et al. Cyclophosphamide and its metabolite impact on fertilization through mitochondrial dysfunction. **Fertility and Sterility**, v. 107, p. 1-4, 2017.
20. FONSECA, T. G. et al. Environmental relevant levels of the cytotoxic drug cyclophosphamide produce harmful effects in the polychaete *Nereis diversicolor*. **Science of The Total Environment**, v. 636, p. 798-809, 2018.
21. TELES, K. A. et al. Cyclophosphamide administration routine in autoimmune rheumatic diseases: a review. **REVISTA BRASILEIRA DEREUMATOLOGIA**, v. 57, p. 596-604, 2017.
22. MCCUNE, J. S. et al. Population Pharmacokinetics of Cyclophosphamide and Metabolites in Children With Neuroblastoma: A Report From the Children's Oncology Group. **American College of Clinical Pharmacology**, v. 49, p. 88-102, 2009.
23. TRIPATHI, D. N.; JENA, G. B. Astaxanthin intervention ameliorates cyclophosphamide-induced oxidative stress, DNA damage and early hepatocarcinogenesis in rat: Role of Nrf2, p53, p38 and phase-II enzymes. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 696, p. 69-80, 2010.
24. KIM, S. Y. et al. Electrochemical detection of 17 beta-estradiol using DNA aptamer immobilized gold electrode chip. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 2525- 2531, 2007.
25. LIU, Q. et al. Comparative study on the interaction of DNA with three different kinds of surfactants and the formation of multilayer films. **Bioelectrochemistry**, v. 70, p. 301- 307, Maio 2007.

26. JIANG, Y.; FANG, X.; BAI, C. Signaling Aptamer/Protein Binding by a Molecular Light Switch Complex. **Analytical Chemistry**, v. 76, p. 5230–5235, 2004.
27. RUPCICH, N. et al. Entrapment of Fluorescent Signaling DNA Aptamers in Sol–Gel-Derived Silica. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 4300–4307, 2005.
28. MOUSAVISANI, S. Z. et al. Label-free DNA sensor based on diazonium immobilisation for detection of DNA damage in breast cancer 1 gene. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 264, p. 59-66, 2018.
29. BLAŠKOVIČOVÁ, S. et al. Detection of ROS Generated by UV-C Irradiation of CdS Quantum Dots and their Effect on Damage to Chromosomal and Plasmid DNA. **Electroanalysis**, v. 30, p. 698-704, 2017.
30. OLIVEIRA, S. C.; CORDUNEANU, O.; OLIVEIRA-BRETT, A. In situ evaluation of heavy metal-DNA interactions using an electrochemical DNA biosensor. **Bioelectrochemistry**, v. 72, p. 53-58, 2008.
31. KALANUR, S. S.; SEETHARAMAPPA, J.; PRASHANTH, S. N. Interaction of an antidepressant bupropion with DNA immobilized on the glassy carbon electrode. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, p. 438–442, 2011.
32. SHEPHERD, G. M. Hypersensitivity reactions to chemotherapeutic drugs. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 24, p. 253-262, 2003.
33. ALMEIDA, J. R. C. **FARMACÊUTICO EM ONCOLOGIA: Uma Nova Realidade**. [S.l.]: Atheneu, 2006. 358 p.
34. ORIYAMA, T. et al. Evaluation of the permeation of antineoplastic agents through medical gloves of varying materials and thickness and with varying surface treatments. **Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences**, v. 3, p. 1-8, 2017.
35. PROVENCHER, P. A.; LOVE, J. A. Synthesis and Performance of a Biomimetic Indicator for Alkylating Agents. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 80, p. 9603–9609, 2015.
36. SILVA, P. **farmacologia**. 8. ed. [S.l.]: Guanabara Koogan S.A., 2010.
37. MINOIA, C.; PERBELLINI, L. Monitoraggio ambientale e biologico dell'esposizione professionale a xenobiotici. **Chemoterapici Antitumorali**, v. 3, p. 265, 2000.
38. DE VITA, V. T.; KELLMAN, S.; ROSEMBERG, S. A. Cancer principles and practice of oncology, p. 2714-2755, 1994.
39. RANG, H. P. et al. **Rang & Dale: Farmacologia**. 8. ed. [S.l.]: Elsevier, 2016. 717 p.
40. ZHANG, J.; QUAN, T.; ZHOU, S. Clinical Pharmacology of Cyclophosphamide and Ifosfamide. **Current Drug Therapy**, v. 1, p. 55-84, 2006.

41. LOUREIRO, A. P. M.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M. H. G. Formação de Adutos Exocíclico com bases de DNA: Implicação em Mutagênese e Cancinogênese. **Química Nova**, v. 25, p. 777-793, 2002.
42. MATZA, E. L.; HSIEHBC, M. H. Revisão de Avanços em Agentes Uroprotectores para Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida e Ifosfamida. **Urology**, v. 100, p. 16-19, 2017.
43. CHABNER, B. A.; LONGO, D. L. **Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice**. [S.l.]: Lippincott Williams and Wilkins, 2011.
44. BROCK, N. **The history of the oxazaphosphorine cytostatics**. [S.l.]: Cancer, v. 78, 1996. 542-547 p.
45. WANG, D.; WANG, H. Oxazaphosphorine bioactivation and detoxification The role of xenobiotic receptors. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 2, p. 1-21, 2012.
46. CALINSKI, D. M. et al. Hydroxylation and N-Dechloroethylation of Ifosfamide and Deuterated Ifosfamide by the Human Cytochrome P450s and Their Commonly Occurring Polymorphisms. **Drug Metabolism & Disposition**, v. 43, p. 1084–1090, 2015.
47. FURLANUT, M.; FRANCESCHI, L. Pharmacology of ifosfamide. **Oncology**, v. 65, p. 2-6, 2003.
48. ALI, S. A. et al. Comparison of uroprotective activity of reduced glutathione with Mesna in Ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 46, p. 105-108, 2014.
49. ALEXANDROVA, E. M.; XU, S.; MOLL, U. M. Ganetespib synergizes with cyclophosphamide to improve survival of mice with autochthonous tumors in a mutant p53-dependent manner. **Cell Death Differentiation**, v. 8, p. 1-7, 2017.
50. WŁODARCZYK, M. et al. Effect of Cyclophosphamide Treatment on Central and Effector Memory T Cells in Mice. **International Journal of Toxicology**, v. 20, p. 1-10, 2018.
51. ANDERSON, D. et al. Cyclophosphamide: Review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. **Mutation Research**, v. 330, p. 115-181, 1995.
52. FERGUSON, L. R.; PEARSON, A. E. The clinical use of mutagenic anticancer drugs. **Mutation Research**, v. 355, p. 1-12, 1996.
53. KUMMERER, K. et al. Biodegradability of antineoplastic compounds in screening. **Chemosphere**, v. 40, p. 767-773, 2000.
54. LLEWELLYNA, N. et al. Determination of cyclophosphamide and ifosfamide in sewage effluent by stable isotope-dilution liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 8519-8528, 2011.

55. BUERGE, I. J. et al. Occurrence and Fate of the Cytostatic Drugs Cyclophosphamide and Ifosfamide in Wastewater and Surface Waters. **Environmental Science & Technology**, v. 40, p. 7242-7250, 2006.
56. ČESEN, M. et al. Occurrence of cyclophosphamide and ifosfamide in aqueous environment and their removal by biological and abiotic wastewater treatment processes. **Science of The Total Environment**, v. 15, p. 465-473, 2015.
57. FERRANDO-CLIMENT, L.; RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D. Development of a UPLC-MS/MS method for the determination of ten anticancer drugs in hospital and urban wastewaters, and its application for the screening of human metabolites assisted by information-dependent acquisition tool (IDA) in sewage samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 5937–5952, 2013.
58. SILVA, C. B. et al. UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of cyclophosphamide, docetaxel, doxorubicin and 5-fluorouracil in surface samples. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 82, p. 68-73, 2016.
59. SIDDAPPA, K.; HANAMSHETTY, P. C. Application of Charge Transfer Reactions for the Quantitative Spectrophotometric. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 11, p. 131-138, 2015.
60. KERBUSCH, T. et al. Determination of ifosfamide, 2- and 3-dechloroethyifosfamide using gas chromatography with nitrogen-phosphorus or mass spectrometry detection. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 22, p. 613-620, 2000.
61. LEKSKULCHAI, V. Quantitation of anticancer drugs - Cyclophosphamide and ifosfamide in urine and water sewage samples by gas chromatography-mass spectrometry. **Occupational Medicine and Environmental**, v. 29, p. 815-822, 2016.
62. KERBUSCH, T.; HUITEMA, A. D. R.; M-J. J. JEUKEN, J. D. M. M. T. J. H. B. Simultaneous determination of ifosfamide and its metabolite ifosforamide mustard in human plasma by high performance liquid chromatography. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 23, p. 2991-3010, 2000.
63. HASSAN, S. S. et al. Microcoated wire sensors for the determination of anticancer drugs cyclophosphamide and ifosfamide in the presence of their degradates. **Talanta**, v. 46, p. 1395-403, 1998.
64. HUANG, B. et al. Electrochemical sensing platform based on molecularly imprinted polymer decorated N,S co-doped activated graphene for ultrasensitive and selective determination of cyclophosphamide. **Talanta**, v. 164, p. 601-607, 2017.
65. FABIAŃSKA, A. et al. Electrodegradation of ifosfamide and cyclophosphamide at BDD electrode: Decomposition pathway and its kinetics. **Chemical Engineering Journal**, v. 276, p. 274-282, 2015.
66. PALASKA, P.; ARITZOGLOU, E.; GIROUSI, S. Sensitive detection of cyclophosphamide using DNA-modified carbon paste, pencil graphite and hanging

- mercury drop electrodes. **Talanta**, v. 72, p. 1199–1206, 2007.
67. REHMAN, S. et al. Studying non-covalent drug–DNA interactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 576, p. 49-60, 2015.
68. DISCULESCU, V. C.; PAQUIM, A. M. C.; A.M.O, B. Electrochemical DNA Sensors for determination of DNA Damagem. **Sensors**, v. 5, p. 377-393, 2005.
69. BRETT, A. M. O.; SERRANO, S. H. P. The electrochemical oxidation of DNA. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 6, p. 97-100, 1995.
70. BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal**: as bases moleculares da ação dos fármacos. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015. 59-61 p.
71. SENGIZ, C. et al. Multiwalled Carbon Nanotubes-Chitosan Modified Single-Use Biosensors for Electrochemical Monitoring of Drug-DNA Interactions. **Electroanalysis**, v. 27, p. 1855 - 1863, 2015.
72. MA, D. L. et al. Molecular modeling of drugeDNA interactions: Virtual screening to structure-based design. **Biochimie**, v. 93, p. 1252 - 1266, 2011.
73. GHOSAL, G.; CHEN, J. DNA damage tolerance: a double-edged sword guarding the. **NIH Public Access**, v. 2, p. 107–129, 2013.
74. BI, X. Mechanism of DNA damage tolerance. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 6, p. 48-56, 2015.
75. LA-SCALEA, M. A.; SERRANO, S. H. P.; GUTZ, I. G. R. Eletrodos modificados com: UMA NOVA ALTERNATIVA EM ELETROANÁLISE. **Química Nova**, v. 22, p. 417-424, 1999.
76. OLIVEIRA, S. C. B.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. In situ evaluation of chromium-DNA damage using a DNA-electrochemical biosensor. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, p. 1633-1641 , 2010.
77. CHU, E.; SARTORELLI, A. C. **Quimioterapia do câncer**. Tradução de B.G. KATSUNG; S.B. MASTER e A.J. TREVOR. 12. ed. [S.l.]: Farmacologia básica e clínica, 2014.
78. NI, Y.; WANG, P.; KOKOT, S. Voltammetric investigation of DNA damage induced by nitrofurazone and short-lived nitro-radicals with the use of an electrochemical DNA biosensor. **Biosens Bioelectron**, v. 38, p. 245-51, 2012.
79. BRETT, A. M. O.; DICULESCU, V.; PIEDADE, J. A. P. Electrochemical oxidation mechanism of guanine and adenine using a glassy carbon microelectrode. **Bioelectrochemistry**, v. 55, p. 61-62, 2002.
80. FERAPONTOVA, E. E. Electrochemistry of guanine and 8-oxoguanine at gold electrodes.

- Electrochimica Acta**, v. 49, p. 1751–1759, 2004.
81. SUN, W. E. A. Direct electrochemistry of single-stranded DNA on an ionic liquid modified carbon paste electrode. **Electrochemistry Communications**, v. 10, p. 298-301, 2008.
 82. PING, J. E. A. Direct electrochemistry of double strand DNA on ionic liquid modified screen-printed graphite electrode. **Electrochimica Acta**, v. 56, p. 4154-5158, 2011.
 83. PALECEK, E.; BARTOSIK, M. Electrochemistry of Nucleic Acids. **Chemical Reviews**, v. 112, p. 3427–3481, 2012.
 84. KIM, H. J.; JEONG, H.; LEE, S. J. Synthetic biology for microbial heavy metal biosensors. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, p. 1191–1203, 2018.
 85. WEI, B. et al. Engineering Biosensors with Dual Programmable Dynamic Ranges. **Analytical Chemistry**, v. 90, p. 1506–1510, 2018.
 86. THOUAND, D. Microbial biosensors for analytical applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, p. 1189–1190, 2018.
 87. PATHAK, P.; KATIYAR, V. K.; GIRI, S. Cancer Research - Nanoparticles, Nanobiosensors and Their Use in Cancer Research. **Zojono Journal of**, v. 3, 2007.
 88. COFFEL, J.; NUXOLL, E. BioMEMS for biosensors and closed-loop drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 544, p. 335-349, 2018.
 89. DRUMMOND, T. G.; HILL, M. G.; BARTON, J. K. Electrochemical DNA sensors. **Nature biotechnology**, v. 21, p. 1192-1199, 2003.
 90. DE-LOS-SANTOS-ALVAREZ, P. et al. Current strategies for electrochemical detection of DNA with solid electrodes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, p. 104–118, 2004.
 91. WANG, J. From DNA Biosensors to Gene Chips. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 3011-3016, 2000.
 92. NAWAZ, H. et al. Electrochemical DNA biosensor for the study of ciprofloxacin-DNA interaction. **Analytical Biochemistry**, v. 354, p. 28-34, 2006.
 93. SILVA, L. L.; DONNICI, C. L.; LOPES, J. C. D. Investigação Eletroquímica e Calorimétrica da Interação de Novos Agentes Antitumorais Biscatiônicos com DNA. **Química Nova**, v. 35, p. 1318-1324, 2012.
 94. MEHDINIA, A. et al. Electrochemical studies of DNA immobilization onto the azide-terminated monolayers and its interaction with taxol. **Analytical Biochemistry**, v. 375, p. 331-338, 15 Abril 2008.

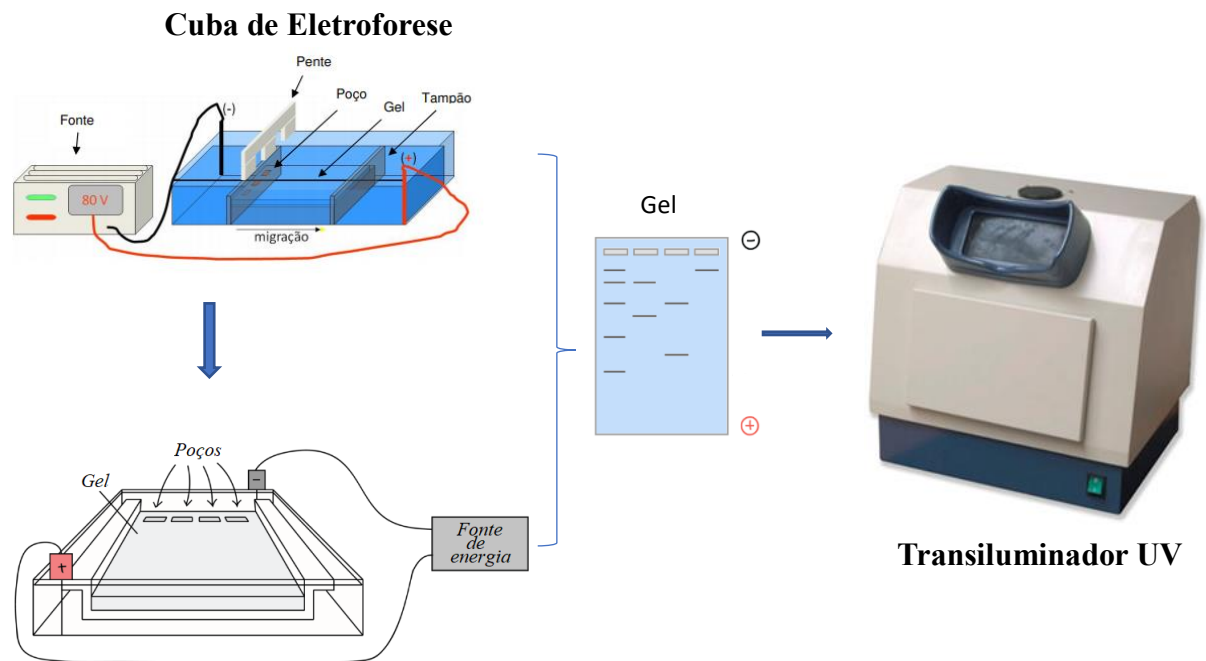
95. CONGUR, G.; ERDEM, A.; MESE, F. Electrochemical investigation of the interaction between topotecan and DNA at disposable graphite electrodes. **Bioelectrochemistry**, v. 102, p. 21-28, 2015.
96. ZEYBEKA, D. K. et al. A sensitive electrochemical DNA biosensor for antineoplastic drug 5-fluorouracil based on glassy carbon electrode modified with poly(bromocresol purple). **Talanta**, v. 144, p. 793-800, 2015.
97. ERDEM, A. et al. Graphene oxide integrated sensor for electrochemical monitoring of mitomycin C–DNA interaction. **Analyst**, v. 137, p. 2129-35, 2012.
98. HAJIAN, R.; TAYEBI, Z.; SHAMS, N. Fabrication of an electrochemical sensor for determination of doxorubicin in human plasma and its interaction with DNA. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 7, p. 27-33, 2017.
99. HAJIAN, R. et al. Fabrication of an electrochemical sensor based on carbon nanotubes modified with gold nanoparticles for determination of valrubicin as a chemotherapy drug: Valrubicin–DNA interaction. **Materials Science and Engineering: C**, v. 49, p. 769-775, 2015.
100. ERDEM, A.; CONGUR, G. Impedimetric detection of in situ interaction between anti-cancer drug bleomycin and DNA. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 61, p. 295-301, 2013.
101. KHALID, M. et al. Electrochemical DNA biosensor for the study of ciprofloxacin–DNA interaction. **Analytical Biochemistry**, v. 354, p. 28-34, 2006.
102. FASMAN, G. D. **Handbook of Biochemistry and Molecular Biology**. 3^a. ed. Cleveland, OH: CRC Press, 1975.
103. SANDBERG, A. S. et al. Use of Time-Resolved Fluorescence To Improve Sensitivity and Dynamic Range of Gel-Based Proteomics. **Analytical Chemistry**, v. 88, p. 3067–3074, 2016.
104. COLLINS, A. R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, p. 249-261, 2004.
105. AFANASIEVA, K.; SIVOLOB, A. Physical principles and new applications of comet assay. **Biophysical Chemistry**, v. 238, p. 1-7, 2018.
106. RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. 1^a. ed. Canoá: ULBRA, 2003.
107. COLLINS, A. R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249-261, 2004.
108. COLLINS, A. R. et al. The comet assay: Topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, p. 143–151, 2008.

109. KOBAYASHI, H. et al. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the cell gell electrophoresis. **MMS Comm**, v. 3, p. 103-115, 1995.
110. MØLLER, P. et al. Searching for assay controls for the Fpg- and hOGG1-modified comet assay. **Mutagenesis**, v. 33, p. 9–19, 2018.
111. BARRY, H.; JOHN, M. C. G. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. ed. [S.l.]: Oxford University Press, 2007.
112. DISCULESCU, V. C.; PIEDADE, J. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Electrochemical behaviour of 2,8-dihydroxyadenine at a glassy carbon electrode. **Bioelectrochemistry**, v. 70, p. 141-146, 2007.
113. OLIVEIRA-BRETT, A. M. et al. Voltammetric Determination of all DNA Nucleotides. **Analytical Biochemistry**, v. 332, p. 321-329, 2004.
114. BRETT, A. M. O.; PIEDADE, J. A. P.; SERRANO, S. H. P. Electrochemical Oxidation of 8-Oxoguanine. **Electroanalysis**, v. 12, p. 969-973, 2000.
115. LOPES, I.; OLIVEIRA, C. B.; BRETT, A. M. O. In situ electrochemical evaluation of anticancer drug temozolomide and its metabolites–DNA interaction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 3783–3790, 2013.
116. AFANASIEVA, K.; SIVOLOB, A. Physical principles and new applications of comet assay. **Biophysical Chemistry**, v. 238, p. 1-7, 2018.
117. PU, X.; WANG, Z.; KLAUNIG, J. E. Cryopreservation of human blood for alkaline and Fpg-modified comet assay. **Toxicology Mechanisms And Methods**, v. 26, p. 196–201, 2016.
118. MOREIRA, V. R. et al. Antimoniato de meglumina (Glucantime) causa dano ao DNA oxidativo causado por estresse em camundongos BALB / c infectados por Leishmania (Leishmania) infantum. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, 2017.
119. GOMES-CARNEIRO, M. R. et al. Inhibition of cyclophosphamide-induced teratogenesis by b-ionone. **Toxicology Letters**, v. 138, 2003.

APÊNDICES

Apêndice 1

Representação esquemática dos equipamentos necessários para a realização da eletroforese em sistema horizontal.



Fonte: Autores (2018)

Apêndice 2

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO – UFMA
Av. dos Portugueses, 1966 - Vila Bacanga, São Luís - MA, 65080-805
Fone: (98)3272-8000

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: ESTUDO DA INTERAÇÃO DOS QUIMIOTERÁPICOS ANTINEOPLÁSICOS IFOSFAMIDA E CICLOFOSFAMIDA COM O DNA, UTILIZANDO BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: RAYNNARIA COSTA DOS SANTOS

Prezado (a) doador (a),

O câncer é uma doença que afeta um grande número de pessoas no mundo inteiro, sendo que a sua principal característica é a multiplicação de forma descontrolada das células de qualquer tecido do organismo, causando diferenciações biológicas e estruturas anormais, levando a ausência da função celular, cujo aumento compromete o funcionamento adequado do órgão afetado. Neste trabalho queremos investigar quais os efeitos citotóxicos e genotóxicos causados pela interação dos antineoplásicos ifosfamida e ciclofosfamida.

Este tipo de estudo nos ajuda a compreender melhor os danos causados no DNA, resultando nesta doença tão complicada e, no futuro, junto com informações de outras pesquisas, poderá contribuir para a melhora do tratamento, a cura e/ou a prevenção da doença.

Para a realização desta pesquisa, é necessária a participação de pessoas que não apresentem a doença, para observarmos os efeitos que os quimioterápicos causam no DNA. Caso concorde em participar da pesquisa, serão coletados cerca de 20 mL do seu sangue, não precisando de uma quantidade maior que esta. Você não terá que realizar nenhum gasto para fazer a doação e também não será remunerado (a) pela contribuição. A coleta será feita por um técnico de enfermagem do LabGem, de modo que você receberá a assistência adequada durante a coleta.

Você pode pedir esclarecimentos sobre como o material está sendo utilizado sempre que achar necessário. Nós asseguramos que a sua identificação será considerada confidencial, não sendo identificada em nenhum trabalho científico. Você não é, de modo algum, obrigado a colaborar com esta pesquisa e, mesmo que concordar agora, poderá retirar seu consentimento a qualquer momento que desejar.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Eu, _____, portador do CPF _____, abaixo assinado, tendo recebido as informações acima e ciente dos meus direitos, abaixo relacionados, concordo em participar da pesquisa.

Serão preservados os direitos do doador, conforme seguem:

- 1) A garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos e benefícios e outros relacionados com a pesquisa;
- 2) A liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isso traga algum prejuízo ou constrangimento;
- 3) A segurança de não ser identificado e que a participação terá o caráter confidencial;
- 4) Receber informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade de continuar participando;
- 5) Não haverá a necessidade de conceder remuneração ou ressarcimento aos participantes, mas em casos excepcionais, caso o paciente se sinta lesado com o procedimento da coleta de sangue, este poderá requerer os seus direitos de acordo com as leis vigentes no país;
- 6) Caso haja algum gasto adicional, este ocorrerá por conta do pesquisador.

Tendo ciência do exposto acima, assino abaixo.

São Luís, _____ de _____ de _____.

Assinatura do doador

Apêndice 3

Tabelas dos valores de correntes do estudo de interação *dsDNA* com IF, CF e seus produtos de degradação.

(vide **Figura 20.A**)

Tempo \ I	Gua	<i>d</i> Gua	<i>d</i> Ado
Controle	–	$7,03 \times 10^{-8}$	$8,21 \times 10^{-8}$
0	$8,38 \times 10^{-10}$	$2,15 \times 10^{-8}$	$1,07 \times 10^{-8}$
24	$1,74 \times 10^{-9}$	$3,01 \times 10^{-8}$	$2,67 \times 10^{-8}$
48	$7,27 \times 10^{-9}$	$1,05 \times 10^{-8}$	$2,28 \times 10^{-8}$
72	$4,48 \times 10^{-9}$	$4,42 \times 10^{-8}$	$4,60 \times 10^{-8}$
96	$8,35 \times 10^{-9}$	$4,33 \times 10^{-8}$	$4,20 \times 10^{-8}$

(vide **Figura 20.B**)

Tempo \ I	Pico 2a	Gua	<i>d</i> Gua	<i>d</i> Ado
Controle	-	-	$5,81 \times 10^{-8}$	$7,40 \times 10^{-8}$
0	$1,21 \times 10^{-9}$	$8,20 \times 10^{-10}$	$6,90 \times 10^{-8}$	$5,00 \times 10^{-8}$
24	$3,95 \times 10^{-9}$	$4,36 \times 10^{-9}$	$1,05 \times 10^{-8}$	$6,95 \times 10^{-8}$
48	$1,84 \times 10^{-9}$	$6,20 \times 10^{-9}$	$7,80 \times 10^{-8}$	$4,41 \times 10^{-8}$
72	$5,83 \times 10^{-9}$	$1,07 \times 10^{-9}$	$9,36 \times 10^{-8}$	$6,14 \times 10^{-8}$
96	$8,79 \times 10^{-9}$	$1,72 \times 10^{-9}$	$9,83 \times 10^{-8}$	$7,18 \times 10^{-8}$

(vide **Figura 21.A**)

Tempo \ I	Gua	<i>d</i> Gua	<i>d</i> Ado
Controle	-	$2,26 \times 10^{-7}$	$4,35 \times 10^{-7}$
0	$5,18 \times 10^{-9}$	$1,63 \times 10^{-7}$	$3,00 \times 10^{-7}$
24	$2,28 \times 10^{-8}$	$1,08 \times 10^{-7}$	$9,75 \times 10^{-8}$
48	$2,15 \times 10^{-8}$	$1,14 \times 10^{-7}$	$1,66 \times 10^{-7}$
72	$1,54 \times 10^{-8}$	$2,52 \times 10^{-7}$	$3,65 \times 10^{-7}$
96	$2,49 \times 10^{-8}$	$1,53 \times 10^{-7}$	$1,85 \times 10^{-7}$

(vide **Figura 21.B**)

Tempo \ I	Pico 3a	Gua	dGua	dAdo
Controle	-	-	$2,13 \times 10^{-7}$	$3,13 \times 10^{-7}$
0	$1,35 \times 10^{-8}$	$1,70 \times 10^{-10}$	$1,69 \times 10^{-7}$	$2,22 \times 10^{-7}$
24	$2,10 \times 10^{-8}$	$7,59 \times 10^{-9}$	$1,35 \times 10^{-7}$	$2,14 \times 10^{-7}$
48	$2,59 \times 10^{-8}$	$9,13 \times 10^{-9}$	$1,46 \times 10^{-7}$	$2,32 \times 10^{-7}$
72	$2,21 \times 10^{-8}$	$3,19 \times 10^{-9}$	$7,90 \times 10^{-8}$	$1,02 \times 10^{-8}$
96	$3,35 \times 10^{-8}$	$8,88 \times 10^{-9}$	$2,09 \times 10^{-7}$	$2,96 \times 10^{-7}$

(vide **Figura 23.A**)

Tempo \ I	Gua	dGua	dAdo
Controle	-	$7,69 \times 10^{-8}$	$8,99 \times 10^{-8}$
0	-	$5,20 \times 10^{-8}$	$4,05 \times 10^{-8}$
24	$2,37 \times 10^{-9}$	$6,49 \times 10^{-8}$	$5,83 \times 10^{-8}$
48	$7,69 \times 10^{-9}$	$7,29 \times 10^{-8}$	$4,67 \times 10^{-8}$
72	$7,66 \times 10^{-9}$	$7,68 \times 10^{-8}$	$4,81 \times 10^{-8}$
96	$1,36 \times 10^{-8}$	$5,35 \times 10^{-8}$	$1,48 \times 10^{-8}$

(vide **Figura 23.B**)

Tempo \ I	Pico 3a	Gua	dGua	dAdo
Controle	-	-	$5,77 \times 10^{-8}$	$6,89 \times 10^{-8}$
0	$2,68 \times 10^{-9}$	$6,14 \times 10^{-10}$	$1,66 \times 10^{-8}$	$3,76 \times 10^{-8}$
24	-	$1,41 \times 10^{-9}$	$4,25 \times 10^{-8}$	$5,73 \times 10^{-8}$
48	-	$2,97 \times 10^{-9}$	$3,14 \times 10^{-8}$	$3,99 \times 10^{-8}$
72	-	$9,60 \times 10^{-9}$	$4,40 \times 10^{-8}$	$5,22 \times 10^{-8}$
96	-	$9,49 \times 10^{-9}$	$4,39 \times 10^{-8}$	$5,19 \times 10^{-8}$

(vide **Figura 24.A**)

Tempo \ I	Gua	dGua	dAdo
Controle	-	$3,18 \times 10^{-7}$	$4,54 \times 10^{-7}$
0	$1,23 \times 10^{-8}$	$2,77 \times 10^{-7}$	$4,32 \times 10^{-7}$
24	$8,31 \times 10^{-9}$	$2,62 \times 10^{-7}$	$3,53 \times 10^{-7}$
48	$3,15 \times 10^{-8}$	$2,12 \times 10^{-7}$	$3,55 \times 10^{-7}$
72	$2,47 \times 10^{-8}$	$1,65 \times 10^{-7}$	$1,52 \times 10^{-7}$
96	$2,50 \times 10^{-8}$	$7,68 \times 10^{-8}$	$7,63 \times 10^{-8}$

(vide **Figura 24.B**)

Tempo \ I	Pico 2a	Gua	dGua	dAdos
Controle	-	-	$1,53 \times 10^{-7}$	$1,98 \times 10^{-7}$
0	$1,77 \times 10^{-8}$	$5,28 \times 10^{-9}$	$1,00 \times 10^{-7}$	$1,29 \times 10^{-7}$
24	$5,22 \times 10^{-8}$	$4,12 \times 10^{-9}$	$9,64 \times 10^{-7}$	$1,24 \times 10^{-7}$
48	$5,14 \times 10^{-8}$	$6,45 \times 10^{-9}$	$1,06 \times 10^{-7}$	$1,53 \times 10^{-7}$
72	$5,03 \times 10^{-8}$	$1,88 \times 10^{-8}$	$1,45 \times 10^{-7}$	$2,38 \times 10^{-7}$
96	$4,42 \times 10^{-8}$	$1,35 \times 10^{-8}$	$1,38 \times 10^{-7}$	$2,39 \times 10^{-7}$