



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO REDE DE BIODIVERSIDADE E  
BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA LEGAL-BIONORTE

**ESTUDO DE FÁRMACOS ANTICANCERÍGENOS NITROSUREIAS E  
AVALIAÇÃO *IN SITU* DE SUAS INTERAÇÕES COM DNA UTILIZANDO  
BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS DE DNA**

PAULINA ANDRÉA VIANA DE CARVALHO

São Luís - MA  
Julho/2019

PAULINA ANDRÉA VIANA DE CARVALHO

**ESTUDO DE FÁRMACOS ANTICANCERÍGENOS NITROSUREIAS E  
AVALIAÇÃO *IN SITU* DE SUAS INTERAÇÕES COM DNA UTILIZANDO  
BIOSENSORES ELETROQUÍMICOS DE DNA**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

**Orientador:**

Prof. Dr. Auro Atsushi Tanaka

**Co-orientadora:**

Dr<sup>a</sup>. Ilanna Campelo Lopes

São Luís  
Julho/ 2019

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

Viana de Carvalho, Paulina Andréa.

ESTUDO DE FÁRMACOS ANTICANCERÍGENOS NITROSUREIAS E  
AVALIAÇÃO IN SITU DE SUAS INTERAÇÕES COM DNA UTILIZANDO  
BIOSENSORES ELETROQUÍMICOS DE DNA / Paulina Andréa Viana  
de Carvalho. - 2019.

108 f.

Coorientador(a): Ilanna Campelo Lopes.

Orientador(a): Auro Atsushi Tanaka.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Rede -  
Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia  
Legal/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís,  
2019.

1. Biossensor. 2. Carmustina. 3. Degradação. 4.  
DNA. 5. Lomustina. I. Atsushi Tanaka, Auro. II. Campelo  
Lopes, Ilanna. III. Título.

PAULINA ANDRÉA VIANA DE CARVALHO

**ESTUDO DE FÁRMACOS ANTICANCERÍGENOS NITROSUREIAS E  
AVALIAÇÃO *IN SITU* DE SUAS INTERAÇÕES COM DNA UTILIZANDO  
BIOSENSORES ELETROQUÍMICOS DE DNA**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Auro Atsushi Tanaka

**Co-orientadora:** Dr<sup>a</sup>. Ilanna Campelo Lopes

Em: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

**Banca examinadora**

---

Prof. Dr. Auro Atsushi Tanaka  
Departamento de Química / CCET - UFMA

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Hideko Yamanaka  
Instituto de Química / UNESP- Araraquara

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gilvanda Silva Nunes  
Departamento de Tecnologia Química / CCET- UFMA

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sirlane Aparecida Abreu Santana  
Departamento de Química / CCET- UFMA

---

Prof. Dr. Roberto Batista de Lima  
Departamento de Química / CCET- UFMA

## AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir e me proporcionar, em meio a tribulações, tantas graças. Pela minha existência e por me amparar nas dificuldades. A minha gratidão, ainda, por colocar cada pessoa que agradeço aqui como instrumento para que eu alcançasse mais essa realização pessoal-profissional.

À Universidade Federal do Maranhão, pela oportunidade de mais uma capacitação profissional.

Ao prof. Dr. Auro Tanaka, pela orientação, confiança depositada em mim, compreensão e oportunidade. Meus sinceros agradecimentos.

À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ilanna Lopes pela co-orientação e amizade. Sua colaboração foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho, que mesmo à distância e muitas ocupações, sempre se mostrou disponível.

Aos meus pais, Francisco Batalha e Valdete Ferreira (*in memoriam*), pela luta diária para educar e criar seus filhos. Meus exemplos de força, coragem, simplicidade e humildade. Agradeço por sempre torcerem por mim.

Ao meu esposo Alderley pelo apoio em inúmeros momentos de minha vida, pela compreensão, paciência e incentivo.

À CAPES/ FAPEMA pela bolsa concedida durante 29 meses. Incentivo fundamental que me manteve durante grande parte da pesquisa.

Ao IFMA, campus Zé Doca, pela liberação para a finalização deste trabalho.

À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mayara Lima que disponibilizou as instalações do LABGEM (UFMA) e colaborou nos ensaios de cometa, assim como, os alunos Hugo e Meydson que auxiliaram, incansavelmente, na execução dos experimentos. Agradeço ainda, a todos do LABGEM pela recepção.

Aos professores Drs. Luiza Dantas, Gilvanda Nunes, Cláudia Quitino, Hideko Yamanaka, Sirlane Santana e Roberto Lima pelas valiosas contribuições durante o exame de qualificação e defesa.

À Central Analítica (PPGQuim/ UFMA) pelas análises de espectroscopia de UV-Vis e ao Núcleo de Combustíveis, Catálise e Ambiental pelas análises cromatográficas.

Aos amigos Geyse, Elizaura, Allan e Raynnaria pela troca de experiências durante a execução do trabalho. Agradeço também pela amizade e parceria.

Aos amigos Sakae, Helmara e Cindy pela ajuda no início desta caminhada, pela empatia durante os momentos de dificuldades. Meu muito obrigada.

Aos colegas do LELQ e do Bionanos pelos momentos de descontração e discussões, durante os cafés. Em especial, aos amigos William Veloso, Wemerson, Herbert, Flaudiner, Nayane, Jeovan, Gabriel, Mayara e Welton.

Às amigas Fernanda e Cristiane pela descontração e palavras de motivação, deixando mais leves períodos de tensão.

Às companheiras de trabalho e moradia Karina, Livia e Luzilene pelo apoio, amizade durante a jornada de trabalho e estudo.

E a todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para o desenvolvimento deste trabalho. Meu muito obrigada!

CARVALHO, Paulina Andréa Viana de. **Estudo de Fármacos Anticancerígenos Nitrosureias e Avaliação *In Situ* de Interações Com DNA Utilizando Biossensores Eletroquímicos de DNA**. 2019.108 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

### RESUMO

A lomunista (CCNU) e a carmustina (BCNU) pertencem à classe das nitrosureias, que são compostos n-nitrosos capazes de alquilar estruturas do DNA. Elas ainda são lipofílicas conseguindo ultrapassar a barreira hematoencefálica, e por apresentar essas características, elas são utilizadas no tratamento de tumores cerebrais, e outras neoplasias. Para compreender os mecanismos de interação desses compostos com DNA, técnicas voltamétricas e biossensores eletroquímicos à base de DNA foram utilizados. Inicialmente, foi realizado o estudo do comportamento eletroquímico da CCNU e BCNU e de suas degradações em solução aquosa sobre eletrodo de carbono vítreo (ECV), utilizando técnicas voltamétricas. A partir desse estudo, investigou-se a interação *in situ* de ambas com ácido desoxirribonucleico (dsDNA) em soluções incubadas, utilizando biossensores eletroquímicos à base de dsDNA e pelo teste de cometa. Tanto a CCNU quanto a BCNU sofreram redução eletroquímica em dois processos redox irreversíveis, controlados por difusão, dependentes do pH e envolvendo a transferência de dois elétrons e um próton, cada. Não houve formação de produtos de redução eletroativos. Para  $\text{pH} \geq 10$ , o potencial de pico para os dois processos tende a ser independente do pH, envolvendo, portanto, apenas elétrons. Um mecanismo de redução da CCNU e BCNU em meio neutro foi proposto. Além disso, verificou-se que os dois antineoplásicos sofreram degradação espontânea em solução aquosa ao longo do tempo de incubação, sem a formação de produtos de degradação eletroativos. O processo de degradação foi mais acentuado em meio básico para ambos. A interação *in situ* da CCNU e BCNU com o dsDNA mostrou que esses pró-fármacos interagiram com o DNA provocando, inicialmente, a condensação das cadeias de dupla hélice e, posteriormente, o desenrolamento dessas cadeias. Além disso, houve a liberação da guanina livre (Gua) e dano oxidativo causado ao dsDNA por ambos os compostos, visto que a 8-oxoguanina (8-oxoGua) e 2,8-dihidroxiadenina (2,8-DHA) foram detectadas. Esses resultados foram confirmados pelos estudos realizados com os biossensores dos polihomonucleotídeos poly [dA] e poly [dG], os quais evidenciaram os danos oxidativos causados em ambas bases, guanina e adenina, do dsDNA pelo(s) produto(s) de degradação(s) da CCNU. A BCNU provocou dano oxidativo apenas na guanina. O teste de cometa indicou quebras na cadeia simples do DNA, corroborando com os estudos realizados por voltametria de pulso diferencial. Palavras-chave: lomunista, carmustina, degradação, voltametria, biossensor, DNA.

CARVALHO, Paulina Andréa Viana de. **Estudo de Fármacos Anticancerígenos Nitrosureias e Avaliação *In Situ* de Interações Com DNA Utilizando Biossensores Eletroquímicos de DNA**. 2019.108 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2018.

### ABSTRACT

Lomustine (CCNU) and carmustine (BCNU) belong to the class of nitrosureas, which are n-nitro compounds capable of alkylate DNA structures. They are lipophilic and can go through the blood-brain barrier, and due to these characteristics, they are used in the treatment of brain tumors and other neoplasms. To understand the interaction mechanisms of these compounds with DNA, voltammetric techniques and DNA-electrochemical biosensors were used. Firstly, the study of the electrochemical behavior of CCNU and BCNU and their degradation in aqueous solution on a glassy carbon electrode (GCE) was performed using voltammetric techniques. From this study, the *in situ* interaction of both with deoxyribonucleic acid (dsDNA) was investigated in incubated solutions, using dsDNA-electrochemical biosensors and the comet test. Both CCNU and BCNU underwent electrochemical reduction in two irreversible redox processes, diffusion-controlled, pH dependent involving the transfer of two electrons and one proton, each. There was no formation of electroactive reduction products. At  $\text{pH} \geq 10$ , the peak potential for the two processes tends to be pH independent by involving only electrons. A reduction mechanism of the CCNU and BCNU in neutral media was proposed. In addition, both antineoplastics underwent spontaneous degradation in aqueous solution over the incubation time, without the formation of electroactive degradation products. The CCNU and BCNU degradation process was more evident in a basic medium. The *in situ* interaction of CCNU and BCNU with dsDNA showed these pro-drugs interacted with DNA initially causing the condensation of the double helix strands and then the unwinding of these strands. Moreover, free guanine (Gua) was released and oxidative damage caused to dsDNA by both compounds were observed, since 8-oxoguanine (8-oxoGua) and 2,8-dihydroxyadenine (2,8-DHA) were detected. These results were confirmed by the poly (dA)- and poly [dG]-electrochemical biosensors, which demonstrated the oxidative damage caused by dsDNA in both bases, guanine and adenine, by the CCNU degradation product(s). BCNU caused oxidative damage only in the guanine. The comet assay indicated breaks in the single strand of DNA, corroborating with the studies performed by differential pulse voltammetry.

Key- words: Lomustine, Carmustine, degradation, voltammetry, biosensor, DNA.