



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO ELETROQUÍMICO E ELETROANALÍTICO DA
FLUORESCÊNCIA E DOS ANTINEOPLÁSICOS
RALTITREXATO E PROCARBAZINA USANDO TÉCNICAS
VOLTAMÉTRICAS E BIOSSENSORES DE DNA**

Nathalia Lopes de Queiroz

Recife
Julho/2017

Nathalia Lopes de Queiroz

**ESTUDO ELETROQUÍMICO E ELETROANALÍTICO DA
FLUORESCÉINA E DOS ANTINEOPLÁSICOS
RALTITREXATO E PROCARBAZINA USANDO TÉCNICAS
VOLTAMÉTRICAS E BIOSSENSORES DE DNA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Orientador: Prof. Dr. Severino Carlos Bezerra de Oliveira

Co-Orientador: Prof. Dr. Valberes Bernardo do Nascimento

Recife

Julho/2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

Q3e

Queiroz, Nathalia Lopes de

Estudo eletroquímico e eletroanalítico da fluoresceína e dos antineoplásicos raltitrexato e procarbazina usando técnicas voltamétricas e biossensores de DNA / Nathalia Lopes de Queiroz. – 2017.

93 f. : il.

Orientador: Severino Carlos Bezerra de Oliveira.

Coorientador: Valberes Bernardo do Nascimento.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Química, Recife, BR-PE, 2017.

Inclui referências e anexo(s).

1. Fluoresceína 2. Antineoplásicos 3. Raltitrexato
4. Procarbazina 5. Oxidação 6. DNA 7. Voltametria 8. Eletrodo de carbono vítreo 9. Biossensores eletroquímicos de DNA I. Oliveira, Severino Carlos Bezerra de, orient. II. Nascimento, Valberes Bernardo do, coorient. III. Título

CDD 540

Nathalia Lopes de Queiroz

**ESTUDO ELETROQUÍMICO E ELETROANALÍTICO DA
FLUORESCÊNCIA E DOS ANTINEOPLÁSICOS
RALTITREXATO E PROCARBAZINA USANDO TÉCNICAS
VOLTAMÉTRICAS E BIOCENSORES DE DNA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada em: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Severino Carlos Bezerra de Oliveira (DQ-UFRPE)

Orientador

Prof. Dr. Valberes Bernardo do Nascimento (DQ-UFRPE)

Co-Orientador

Prof. Dr. Sherlan Guimarães Lemos (DQ-UFPB)

1º Examinador

Prof. Dr. André Augusto Pimentel Liesen Nascimento (DQ-UFRPE)

2º Examinador

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as bênçãos concedidas. Por ter me dado forças para superar os obstáculos e poder concluir mais esta etapa da minha vida.

Agradeço aos meus pais, Samuel Moura e Lucidalva Lopes pela imensa dedicação e carinho.

Aos meus familiares que acreditam e torcem pelo meu sucesso, em especial minha avó, Severina das Mêrces.

Ao meu namorado Jefferson Oliveira pelo seu companheirismo e por estar sempre disposto a ajudar.

Ao meu orientador Prof. Dr. Severino Carlos Bezerra de Oliveira e ao meu co-orientador Prof. Dr. Valberes Bernardo do Nascimento por todos os ensinamentos que contribuíram de forma significativa para minha formação acadêmica.

Aos meus colegas de turma e aos meus amigos do Laboratório de Análise Química, Inorgânica e Sensores (LAQIS), Amanda Jordão, Bianca Costa, Lidiane Lima, Nattany de Paula, Filipe Torres, Carine Lagrange, Renê Gomes, Nayara Cely, Danielle Neves, Gabriella Santana, Jamerson Henrique, Rômulo, Paulo, Arthur Araújo, Estherfânia, Reobe Silva, Gabrielly Simões, Manuele Duarte, em especial à equipe de eletroanalítica: José Ailton, Maysa Lima, Anabel Lourenço, Ingrid Freire, Thaís Mendes e Elaine Cristina por todo apoio e carinho.

Ao CNPq e à FACEPE pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

À CAPES pela bolsa ao longo de todo o mestrado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
<i>CAPÍTULO 1</i>.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Fluoresceína.....	15
1.2. Raltitrexato.....	17
1.2.1. Mecanismo de Ação do Raltitrexato.....	18
1.3. Procarbazina.....	19
1.4. Princípios da Eletroquímica.....	20
1.4.1. Técnicas Voltamétricas.....	21
1.4.1.1. Voltametria Cíclica.....	21
1.4.1.2. Voltametria de Pulso Diferencial.....	22
1.4.1.3. Voltametria de Onda Quadrada.....	23
1.5. Biossensores Eletroquímicos de DNA.....	24
<i>CAPÍTULO 2</i>.....	28
2.2. Objetivos Específicos.....	29
<i>CAPÍTULO 3</i>.....	30
3.2. Parâmetros Voltamétricos e Célula Eletroquímica.....	32
3.3. Aquisição e Apresentação de Dados Voltamétricos.....	33
<i>CAPÍTULO 4</i>.....	34
4.1. Oxidação da Fluoresceína.....	35
4.1.1. Voltametria Cíclica.....	35

4.1.2. Voltametria de Pulso Diferencial.....	38
4.1.3. Voltametria de Onda Quadrada.....	40
4.2. Mecanismo de Oxidação da FLSC.....	42
4.3. Determinação Eletroanalítica da Fluoresceína.....	43
CAPÍTULO 5.....	45
5.1. Oxidação do Raltitrexato.....	46
5.1.1. Voltametria Cíclica.....	46
5.1.2. Voltametria de Pulso Diferencial.....	47
5.1.3. Voltametria de Onda Quadrada.....	49
5.2. Mecanismo de Oxidação do RTX.....	49
5.3. Investigação da Interação RTX-dsDNA Usando um Biossensor Eletroquímico de dsDNA.....	50
CAPÍTULO 6.....	53
6.1. Oxidação da Procarbazina.....	54
6.1.1. Voltametria Cíclica.....	54
6.1.2. Voltametria de Pulso Diferencial.....	56
6.1.3 Voltametria de Onda Quadrada.....	57
6.2. Mecanismo de Oxidação da PCZ.....	58
6.3. Estudo da Degradação Química da PCZ e da Interação PCZ-dsDNA Usando Técnicas Voltamétricas e Biossensores Eletroquímicos de dsDNA.....	60
CAPÍTULO 7.....	66
CAPÍTULO 8.....	69
ANEXOS.....	77
ARTIGO 1: Oxidation Mechanism of Fluorescein at Glassy Carbon Electrode.	78
ARTIGO 2: Electrochemical oxidation mechanism of procarbazine at glassy carbon electrode.....	87

RESUMO

Um estudo eletroquímico e eletroanalítico do biomarcador Fluoresceína (FLSC) e dos antineoplásicos Raltitrexato (RTX) e Procarbazina (PCZ) foi realizado utilizando técnicas voltamétricas e biossensores eletroquímicos de DNA com o objetivo de investigar os mecanismos de oxidação desses compostos e a reatividade/toxicidade do RTX e da PCZ com a molécula de dsDNA. Potencialidades das propriedades redox desses compostos para aplicações eletroanalíticas também foram investigadas.

Os estudos eletroquímicos e eletroanalíticos da FLSC, PCZ e RTX foram realizados em GCE, para uma ampla gama de eletrólitos suporte com diferentes valores de pHs, utilizando voltametria cíclica, de onda quadrada e de pulso diferencial. Os resultados revelaram que a FLSC, o RTX e a PCZ são eletroativos e sofrem eletroxidação irreversível, sendo a eletroxidação da FLSC e do RTX controladas predominantemente por difusão e a eletroxidação da PCZ controlada por adsorção.

A oxidação da FLSC em GCE ocorre em duas etapas consecutivas com formação de um produto eletroativo em meio ácido. Ambas as etapas de oxidação envolvem a transferência de um elétron e um próton, correspondendo à oxidação dos grupos fenólicos com formação de derivados da orto-quinona, a qual pode ser reversivelmente reduzida para formar derivados de catecol, e/ou produtos poliméricos. Um elétron e um próton são retirados do grupo fenólico da posição C6' na primeira etapa de oxidação e na posição C3' na segunda etapa. Um mecanismo da oxidação da FLSC foi proposto. O coeficiente de difusão de FLSC foi determinado em tampão fosfato, pH = 7,0, ($D_{FLSC} = 9,77 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$). Um método voltamétrico de pulso diferencial para a quantificação da FLSC em meio fisiológico foi proposto com um limite de detecção de $0,64 \mu\text{mol L}^{-1}$ e quantificação de $2,13 \mu\text{mol L}^{-1}$.

A oxidação do RTX em GCE ocorre em duas etapas consecutivas irreversíveis de transferência de carga. A primeira etapa de oxidação é independente do pH e ocorre com a retirada de um elétron da amina terciária na posição N10. A segunda etapa é pH-dependente e envolve a retirada de um elétron e um próton do carbono na posição C9. Foi demonstrado a partir dos estudos com biossensores de DNA uma interação via atração eletrostática e/ou intercalação do RTX com a molécula de dsDNA. Por outro lado nenhuma lesão significativa na molécula de dsDNA, como quebra de dupla hélice ou dano oxidativo, foi detectada.

A oxidação da PCZ em GCE ocorre em quatro etapas consecutivas de transferência de carga. As três primeiras etapas são dependentes do pH e ocorrem com a transferência de um elétron e um próton, levando à formação de um produto eletroativo em meio ácido, enquanto a última é independente do pH, envolvendo apenas a transferência de um elétron. Um mecanismo de oxidação para a PCZ é proposto, onde na primeira e na segunda etapa a oxidação ocorre no grupo hidrazina, seguida por isomerização e, após hidrólise, conversão em benzaldeído-procarbazina. A terceira e a quarta etapa estão associadas à oxidação da benzaldeído-procarbazina com a produção do ácido N-isopropiliterftálico. A degradação química da PCZ foi investigada em diferentes meios, ácido, fisiológico e alcalino, por diferentes períodos. Observou-se uma mudança do comportamento anódico da PCZ, em meio fisiológico, atribuída à degradação química da PCZ com formação homogênea de produto(s) de degradação eletroativo(s).

A interação *in-situ* do DNA com a PCZ e com a PCZ-Cu²⁺ foi investigada utilizando biossensores eletroquímicos de DNA. Foram detectados claramente danos na molécula do dsDNA após incubações dos biossensores em soluções de PCZ-Cu²⁺, que foram associados a alterações na estrutura da dupla hélice e danos oxidativos nas bases purínicas.

O conhecimento dos mecanismos de oxidação da FLSC, RTX e PCZ, bem como os métodos eletroanalíticos desenvolvidos para determinação destas substâncias e os estudos de interação RTX-DNA e PCZ-DNA aqui apresentados se correlacionam entre si e enriquecem a literatura com informações para interpretação da bioquímica molecular destas espécies

Palavras-chave: Fluoresceína, Antineoplásicos, Raltitrexato, Procarbazina, Oxidação, DNA, Voltametria, Eletrodo de Carbono Vítreo, Biossensores Eletroquímicos de DNA.

ABSTRACT

An electrochemical and electroanalytical study of the biomarker Fluorescein (FLSC) and the antineoplastic drugs Raltitrexed (RTX) and Procarbazine (PCZ) was carried out using voltammetric techniques and electrochemical DNA biosensors with the purpose of investigating the oxidation mechanisms of these compounds and the reactivity/toxicity of RTX and PCZ with the dsDNA molecule. Potentialities of redox properties of these compounds for electroanalytical applications were also investigated.

The electrochemical and electroanalytical studies of FLSC, PCZ and RTX were performed at GCE, for a wide range of electrolytes with different pH values, using cyclic, square wave and differential pulse voltammetry. The results showed that FLSC, RTX and PCZ are electroactive and undergo irreversible electrooxidation, in which FLSC and RTX are electrooxidized under diffusion-controlled and pH-dependent processes, while PCZ is irreversibly electrooxidized under an adsorption-controlled and pH-dependent process.

The electrooxidation of FLSC at GCE in acid media occurs in two consecutive steps with the formation of an electroactive product. Both oxidation steps involve the transfer of one electron and one proton, corresponding to the oxidation of the phenolic groups with formation of ortho-quinone derivatives, which are reversibly reduced to form catechol derivatives and/or polymer products. One electron and one proton are removed from the phenolic group at the C6' position in the first oxidation step and at the C3' position in the second step. A FLSC oxidation mechanism is proposed. The diffusion coefficient of FLSC was estimated in pH = 7.0 phosphate buffer ($D_{FLSC} = 9.77 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$). A differential pulse voltammetric method for quantification of FLSC in physiological medium was proposed, with a limit of detection of $0.64 \mu\text{mol L}^{-1}$ and quantification of $2.13 \mu\text{mol L}^{-1}$.

The oxidation of RTX at GCE occurs in two consecutive irreversible steps of charge transfer. The first oxidation step is pH independent and occurs with the withdrawal of one electron from the tertiary amine at the N10 position. The second step is pH dependent and involves the withdrawal of one electron and one proton from the carbon at the C9 position. It was demonstrated from the studies with the DNA biosensors the existence of an interaction via electrostatic attraction and/or intercalation between the RTX and the dsDNA molecules. On the other hand, no significant lesion on the dsDNA molecule, such as double helix breakage or oxidative damage, was detected.

The oxidation of PCZ occurs in four consecutive charge transfer steps. The first, second and third steps are pH-dependent and occur with the transfer of one electron and one proton, leading to the formation of an electroactive product in acid media, while the last one is pH-independent, involving the transfer of one electron. A reaction mechanism for the electrochemical oxidation of PCZ is proposed, where, in the first and second step, the oxidation occurs on the hydrazine group, followed by isomerization and, after hydrolysis, conversion to benzaldehyde-procarbazine. The third and fourth steps are associated with the oxidation of the benzaldehyde-procarbazine with the production of the N-isopropylterephthalic acid. The chemical degradation of PCZ was investigated in different media (acid, physiological and alkaline) for different periods. A change in the anode behavior of PCZ in physiological media was attributed to the chemical degradation of PCZ with homogeneous formation of electroactive degradation product (s).

The *in-situ* interaction of DNA with PCZ and PCZ-Cu²⁺ were investigated using electrochemical DNA biosensors. Damage to the dsDNA molecule was clearly detected after biosensor incubations in PCZ-Cu²⁺ solutions, which were associated with changes in the structure of the double helix and oxidative damage in the purine bases.

The knowledge of the oxidation mechanisms of FLSC, RTX and PCZ as well as the electroanalytical methods developed for the determination of these substances and the RTX-DNA and PCZ-DNA interaction studies presented here correlate with each other and enrich the literature with information for the interpretation of the molecular biochemistry of these species.

Keywords: Fluorescein, Antineoplastics, Raltitrexed, Procarbazine, Oxidation, DNA, Voltammetry, Glassy Carbon Electrode, Electrochemical DNA Biosensors.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Estrutura química da fluoresceína em meio ácido, neutro e alcalino (da esquerda para a direita).....	16
Figura 2. Estrutura química do raltitrexato.....	17
Figura 3. Estrutura química do ácido fólico.....	18
Figura 4. Estrutura química da procarbazina.....	19
Figura 5. CV - (A) CVs obtidos numa solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7$, para diferentes velocidades de varredura $5\text{-}500 \text{ mV s}^{-1}$ (B) I_{pa} vs. $v^{1/2}$	22
Figura 6. DPVs da oxidação do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $500 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ vs. o pH em 3D.....	23
Figura 7. SWV do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 4,5$, I_t – total, I_f – forward (direta) e I_b – backward (reversa).....	24
Figura 8. Esquema de um biossensor eletroquímico de dsDNA e suas respostas voltamétricas (A) biossensor de dsDNA sem interagir com o analito (controle), (B) biossensor de dsDNA após interação com o antineoplásico PCZ.....	26
Figura 9. Imagem do potenciostato.....	32
Figura 10. Imagem da célula eletroquímica e dos eletrodos utilizados.....	33
Figura 11. CVs sucessivos obtidos em solução de FLSC $25 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$: (A) tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 4,5$, (B) tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,0$ e (C) tampão borato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 9,74$, (—) primeira varredura, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$	35
Figura 12. CVs sucessivos obtidos em solução de FLSC $50 \mu\text{mol L}^{-1}$: (A) tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 4,5$, (B) tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,0$ e (C) tampão borato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 9,74$, (—) primeira varredura, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$	37
Figura 13. CVs obtidos numa solução de FLS $25 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,0$ para diferentes velocidades de varredura ($10, 25, 50, 100, 200, 300$ e 500 mV s^{-1}).....	38
Figura 14. DPVs sucessivos (com correção de linha de base) obtidos em soluções de FLSC $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em: (A) tampão de acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 4,5$, (B) tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,0$ e (C) tampão borato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 9,7$, (—) primeira varredura, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$	40
Figura 15. (A) DPVs da oxidação da FLSC $25 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ vs. pH em 3D (com correção de linha de base), (—) $\text{pH} = 3,56$, (—) $\text{pH} = 4,2$, (—) $\text{pH} = 4,5$, (—) $\text{pH} = 5,0$, (—) pH	

- = 6,0, (—) pH = 6,28, (—) pH = 7,0, (—) pH = 7,5, (—) pH = 9,74, (B) E_{pa} vs. pH, (■) E_{p1a} do pico 1a, (□) E_{p2a} do pico 2a, a inclinação da reta é de 59 mV por pH.....41
- Figura 16.** SWVs (com correção da linha de base) de FLSC 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$: (A) varreduras sucessivas em tampão de acetato 0,1 mol L^{-1} , pH = 4,5, (—) primeira varredura, (B) primeira e (C) segunda varredura; I_t – total, I_f – forward e I_b – backward, $v_{\text{efetivo}} = 50 \text{ mV s}^{-1}$42
- Figura 17.** Mecanismo de oxidação proposto para a FLSC.....44
- Figura 18.** (A) DPVs (com correção de linha de base) para FLSC em concentrações crescentes e (B) Curva analítica ($I_{pa}(\text{FLSC}) = -0,72 (\pm 0,46) + 0,28 (\pm 0,01) [\text{FLSC}]$) de FLSC. [Tampão fosfato] = 0,1 mol L^{-1} , pH 7,2; (a) 0,5, (b) 1,0, (c) 2,0, (d) 4,0, (e) 6,0, (f) 8,0 e (g) 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, $v_{\text{efetivo}} = 5 \text{ mV s}^{-1}$45
- Figura 19.** CVs sucessivos obtidos em solução de RTX 105 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em (A) tampão acetato 0,1 mol L^{-1} , pH = 4,5, (B) tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH = 7,0 e (C) tampão borato 0,1 mol L^{-1} , pH = 9,3, (—) primeira varredura.....47
- Figura 20.** DPVs sucessivos (com correção de linha de base) obtidos em soluções de RTX 105 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em: (A) tampão de acetato 0,1 mol L^{-1} , pH = 4,5, (B) tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH = 7,0 e (C) tampão borato 0,1 mol L^{-1} , pH = 9,7, (—) primeira varredura, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$49
- Figura 21.** (A) DPVs da oxidação do RTX 105 $\mu\text{mol L}^{-1}$ vs. pH em 3D (com correção de linha de base), (—) pH = 3,56, (—) pH = 4,5, (—) pH = 5,0, (—) pH = 6,0, (—) pH = 7,0, (—) pH = 8,0, (—) pH = 9,0, (B) Gráfico do E_{pa} vs. pH, (□) E_{p1a} do pico 1a, (■) E_{p2a} do pico 2a.....50
- Figura 22.** SWVs obtidos em solução de RTX 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em (A) tampão acetato 0,1 mol L^{-1} , pH = 4,5; (B) tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH = 7,0 e (C) tampão borato 0,1 mol L^{-1} , pH = 9,3, I_t – total, I_f – forward e I_b – backward.....51
- Figura 23.** Mecanismo de oxidação proposto para o RTX.....52
- Figura 24.** DPVs (com linha de base corrigida) em pH 7: do biossensor de dsDNA controle (—); RTX controle (—); do biossensor de dsDNA: incubado na solução de RTX por: 24 horas (—) e por 72 horas (□□□).....54
- Figura 25.** CVs obtidos numa solução recém preparada de PCZ 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em: (A) tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH = 7, (B-C) tampão acetato 0,1 mol L^{-1} , pH = 4,5, (—) primeira varredura, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$57

Figura 26. CVs obtidos numa solução recém preparada de PCZ 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH = 7, para diferentes velocidades de varredura (10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 e 500 mV s^{-1}).....	58
Figura 27. DPV obtido numa solução recém preparada de PCZ 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH = 7, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$	59
Figura 28. SWV obtido numa solução recém preparada de PCZ 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH = 7, I_t – total, I_f – forward e I_b – backward, $v_{\text{efetivo}} = 5 \text{ mV s}^{-1}$	60
Figura 29. Mecanismo de oxidação proposto para a PCZ.....	61
Figura 30. Voltamogramas (A) CV, (B) DPV e (C) SWV de PCZ 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH = 7, incubadas por: (—) 0 h; (—) 48 h; (□□□) 72 h.....	62
Figura 31. DPVs sucessivos (com correção de linha de base) obtidos numa solução de Cu^{2+} 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH = 7.....	64
Figura 32. Voltamogramas de DP (com correção de linha de base) em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH = 7 para: (—) PCZ 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (□□□) Cu^{2+} 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (—) PCZ- Cu^{2+} ambos com 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	65
Figura 33. DPV (com correção de linha de base) do biossensor de dsDNA multicamada em tampão acetato 0,1 mol L^{-1} , pH 4,5.....	65
Figura 34. DPV (com correção de linha de base) em tampão acetato 0,1 mol L^{-1} , pH = 4,5, (—) do biossensor de dsDNA controle; (—) do biossensor de dsDNA incubado por 1 hora em solução de PCZ 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	66
Figura 35. DPV (com correção de linha de base) em tampão acetato 0,1 mol L^{-1} , pH = 4,5 (—) do biossensor de dsDNA controle; (□□□) do biossensor de dsDNA incubado por 1 hora em solução de Cu^{2+} 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (—) do biossensor de dsDNA incubado por 1 hora em solução de PCZ 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ / Cu^{2+} 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	67
Tabela 1. Composição das soluções tampão de eletrólito suporte.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag/AgCl – Eletrodo de referência prata / cloreto de prata

CV – Voltametria cíclica (do inglês “cyclic voltammetry”)

DPV – Voltametria de pulso diferencial (do inglês “differential pulse voltammetry”)

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês “deoxyribonucleic acid”)

dsDNA – DNA dupla fita (do inglês “double stranded”)

EP – Pipeta eletrônica (do inglês “electronic pipette”)

FA – Ácido fólico (do inglês “folic acid”)

FLSC – Fluoresceína

FPGS – Folilpoliglutamato sintase

GCE – Eletrodo de carbono vítreo (do inglês “glassy carbon electrode”)

IARC – Agência internacional para pesquisa sobre o câncer (do inglês “international agency for research on cancer”)

I_b – Corrente reversa (do inglês “backward current”)

I_f – Corrente direta (do inglês “forward current”)

I_t – Corrente total (do inglês “total current”)

PCZ – Procarbazina

Pt – Platina

RNA – Ácido ribonucleico (do inglês “ribonucleic acid”)

RTX – Raltitrexato

SWV – Voltametria de onda quadrada (do inglês “square wave voltammetry”)

TS – Timidilato sintase

TTP – Trifosfato de timidina

Capítulo 1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Fármacos são substâncias químicas que possuem estrutura definida e são capazes de atuar no organismo alterando processos fisiológicos *in-vivo*. Essas substâncias precisam interagir quimicamente com um ou mais constituintes das células do organismo para que se tenha uma ação farmacológica [1,2]. Contudo, se o fármaco, ao entrar em contato com seus alvos moleculares, não estiver na concentração necessária para exercer o efeito terapêutico desejado, será considerado ineficaz. Alguns fatores farmacocinéticos devem ser considerados para que o fármaco tenha efetividade clínica, como a absorção, a distribuição, o metabolismo, a excreção e a toxicidade (geralmente abreviados como ADMET) [3].

Compreender o mecanismo de interação entre o fármaco e seus alvos moleculares, e como essa interação leva uma resposta fisiológica, é o foco principal de pesquisas farmacológicas [1,2]. No estudo da interação entre fármacos e seus respectivos alvos moleculares alguns fatores devem ser considerados, tais como solubilidade, estereoquímica, difusão, metabolismo, atividade da molécula *in vivo* e as reações envolvidas nos processos fisiológicos [4].

Antineoplásicos são fármacos utilizados clinicamente que, em sua grande maioria, apresentam mecanismo de ação ciclo-celular não-específico e também tem o dsDNA como alvo molecular [5]. De maneira geral as lesões no dsDNA resultam dos danos que ocorrem espontaneamente por processos endógenos ou como resultado da ação de vários agentes externos (carcinógenos ou antineoplásicos). Estes danos são complexos e envolvem mecanismos que podem interferir de várias maneiras nas mutações do DNA e, conseqüentemente, na replicação celular [6]. A elucidação dos mecanismos de ação de vários carcinógenos (toxinas, espécies químicas reativas, íons metálicos de transição e mais recentemente, materiais nanoestruturados) e de fármacos antineoplásicos com o dsDNA tem sido fundamental para os avanços nesta área nas últimas duas décadas [6,7].

Técnicas eletroquímicas são atualmente bastante utilizadas em estudos fundamentais de caracterização das propriedades redox de fármacos, como agentes antineoplásicos, utilizando principalmente técnicas voltamétricas e polarográficas com diferentes tipos de substratos eletroquímicos, tais como eletrodos de carbono e eletrodos de mercúrio [8]. Este tipo de investigação é de grande importância para a elucidação do mecanismo redox e da ação antineoplásica a fim de compreender os processos biológicos *in-vivo* desencadeados por essas drogas [6]. Recentemente inúmeros mecanismos redox têm sido postulados a partir de estudos voltamétricos

[4,6, 9-11]. Técnicas voltamétricas de pulso, como, voltametria de onda quadrada e voltametria de pulso diferencial têm sido amplamente utilizadas para o desenvolvimento de metodologias analíticas, tendo em vista a sua sensibilidade decorrente da corrente capacitiva ser minimizada, melhorando a resolução e alcançando limites de detecção da ordem de 10^{-8} mol L⁻¹ [8].

Biossensores eletroquímicos de DNA são adequados para estudos de mecanismo de interação específica do dsDNA com espécies químicas tais como carcinógenos e fármacos antineoplásicos que atuam diretamente no DNA, uma vez que apresentam alta sensibilidade, seletividade e rapidez [6,12]. Interações de várias espécies químicas com o DNA de dupla hélice têm sido estudadas com sucesso recorrendo-se ao uso dos biossensores eletroquímicos de DNA [13-16]. Esses biossensores permitem não só a elucidação de interações específicas de algumas drogas com determinada base na dupla hélice do DNA, mas também fornecem indicações sobre os mecanismos subjacentes a essas interações [12].

O presente trabalho insere-se neste contexto e foi dividido em três etapas. A primeira apresenta a investigação do mecanismo de oxidação do biomarcador fluoresceína usando eletrodo de carbono vítreo e técnicas voltamétricas como voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada e voltametria de pulso diferencial. Um método eletroanalítico para quantificação da fluoresceína foi também proposto [10]. A segunda etapa consistiu na investigação da oxidação do antineoplásico raltetrexato em eletrodo de carbono vítreo e da sua interação *in-vitro* com a molécula do dsDNA. A degradação do raltetrexato foi acompanhada eletroanaliticamente em diferentes meios numa larga janela de pHs. Na última etapa foi investigado o mecanismo de oxidação do antineoplásico procarbazona [11], a sua degradação química em diferentes meios e seu mecanismo de interação com o DNA, utilizando técnicas voltamétricas e biossensores eletroquímicos de DNA.

1.1. Fluoresceína

A fluoresceína (FLSC), 3',6'-dihydroxyspiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one, é um composto orgânico sintético amarelo que possui propriedades de fluorescência. Em soluções ligeiramente ácidas e alcalinas (pH > 5) possui uma fluorescência amarelo-esverdeada [17]. A absorção e as propriedades de fluorescência da FLSC são altamente dependentes do pH, considerando que em

soluções aquosas a FLSC pode existir em sua forma neutra, na forma de cátion e também em forma de ânion, **Fig. 1** [18].

Figura 1. Estrutura química da fluoresceína em meio ácido, neutro e alcalino.

A FLSC possui muitas aplicações em diversas áreas [17,19-27]. Na medicina a FLSC é utilizada para detecção de lesões oftalmológicas [17], detecção de DNA [19], como antibiótico [20] e como rótulo fluorescente em imunoenaios [21-23]. Além disso, podem ser encontradas inúmeras aplicações da FLSC em diferentes tipos sensores, tais como sensores modificados com filmes híbridos fluorescentes [24], sensor utilizado na detecção e quantificação de radicais hidroxílicos [25], nanosensor para detecção de ácido ascórbico [26] e como sonda para detecção de sulfito em soluções aquosas [27].

A FLSC é, provavelmente, a sonda fluorescente mais utilizada atualmente, por possuir um grande rendimento quântico de fluorescência, uma alta absorbância molar e uma alta fotoestabilidade, o que a torna um marcador muito útil e sensível. A FLSC pode ser encontrada comercialmente na forma de derivados, como por exemplo, o isotiocianato de fluoresceína que pode se ligar de maneira covalente à macromoléculas e aminoácidos [28,29].

Na literatura são encontrados diversos estudos onde a redução da FLSC é investigada em diferentes substratos eletroquímicos [30-33]. O estudo de redução eletroquímica da FLSC em eletrodos de mercúrio em meio alcalino foi investigado na ausência/presença de ultrassom e demonstrou que a FLSC é reduzida em duas etapas com a transferência de um elétron em cada etapa formando o radical semi-FLSC e leuco-FLSC. Na presença de ultrassom, os radicais de FLSC são reoxidados por radicais hidroxílicos formados no meio aquoso através da decomposição sonoquímica [30-33]. O mecanismo de eletroquimioluminiscência da

FLSC foi estudado em eletrodo de ouro em uma larga janela de potencial, mas apenas em condições específicas (solução alcalina) e usando voltametria cíclica [34]. A eletrodegradação da FLSC em eletrodo de Pt e de diamante dopado com boro em função de vários parâmetros, tais como pH, corrente e natureza do eletrólito, tem sido investigado para o desenvolvimento de um protocolo de degradação para o tratamento de águas residuais poluídas [35].

Considerando as diferentes aplicações da FLSC, é de grande importância a determinação do seu mecanismo redox bem como sua quantificação em diferentes matrizes. Entretanto, nenhum estudo anódico com o objetivo de estabelecer seu mecanismo de oxidação havia sido realizado como também nenhum método eletroanalítico para sua quantificação havia sido proposto até este momento.

1.2. Raltitrexato

O Raltitrexato (RTX), **Fig. 2**, (2S)-2-[[5-[methyl-[(2-methyl-4-oxo-1H-quinazolin-6-yl)methyl]amino]thiophene-2-carbonyl]amino] pentanedioic acid, é um antimetabólito que possui atividade antineoplásica para vários tipos de tumores sólidos, como o câncer gástrico [36], câncer de cabeça e pescoço [37], mesotelioma maligno [38], câncer de pâncreas [39] sendo utilizado em vários países, principalmente no tratamento de câncer colorretal avançado [40,41].

Figura 2. Estrutura química do raltitrexato.

Os antimetabólitos são substâncias utilizadas no tratamento de câncer, pois inibem a biossíntese de componentes essenciais do DNA e do RNA, impedindo a divisão celular e o crescimento de tumores [42]. Os quimioterápicos 6-mercaptopurina e 6-tioguanina atuam na inibição da biossíntese das purinas, enquanto o 5-fluoracil inibe a produção de ácido timidílico [43]. O metotrexato atua na inibição da enzima dehidrofolato redutase [42]. No caso do raltitrexato, ocorre a inibição da enzima timidilato sintase (TS) [44].

O RTX é um análogo do ácido fólico (FA), (2S)-2-[[4-[(2-amino-4-oxo-1H-pteridin-6-yl)methylamino]benzoyl]amino]pentanedioic acid, **Fig. 3**, que é uma vitamina da família do complexo B, mais especificamente vitamina B9. O ácido fólico é uma das vitaminas mais importantes para a função metabólica humana normal [45-47], pois ajuda o nosso corpo a produzir e manter células saudáveis [48]. Ele evita alteração na estrutura do DNA e, quando combinado com a vitamina B12, acelera o crescimento [49]. A deficiência de ácido fólico pode levar a vários riscos para a saúde, como anemia megaloblástica, defeitos no tubo neural no desenvolvimento de fetos [50], câncer e doenças cardíacas [51].

Figura 3. Estrutura química do ácido fólico

1.2.1. Mecanismo de Ação do Raltitrexato

O mecanismo de ação do RTX ocorre através de uma potente atividade inibitória da enzima timidilato sintase (TS). Essa enzima é responsável pela síntese do trifosfato de timidina (TTP), que é um nucleotídeo necessário exclusivamente para a síntese do DNA. Portanto, a inibição da TS irá resultar na fragmentação de DNA e, conseqüentemente, a morte celular [44].

O RTX é levado para dentro das células através de um transportador de folato reduzido. Em seguida, é metabolizado para uma série de poliglutamatos pela enzima folilpoliglutamato sintase (FPGS). Esses poliglutamatos são retidos nas células e são inibidores ainda mais potentes da TS. A poliglutamação do RTX aumenta a potência inibitória sobre a TS e a duração da inibição de TS nas células, as quais podem melhorar sua atividade antitumoral. A poliglutamação também pode contribuir para aumentar a toxicidade, em virtude da retenção da droga nos tecidos normais [52]. Entretanto o mecanismo de oxidação do RTX e sua interação com a molécula do dsDNA ainda não foram investigados na literatura.

Na literatura são encontrados estudos analíticos do RTX utilizando diferentes técnicas, como cromatografia líquida de alta resolução com espectrometria de

massa [53,54]. O mecanismo de fotodegradação do RTX foi estudado e verificou-se que a formação da maioria dos fotoprodutos gerados é referente a um processo de oxidação de um elétron envolvendo a porção amino tiofenato e transferência de energia [53]. Um ensaio foi desenvolvido para determinação do RTX em plasma humano e aplicado com sucesso para determinar as concentrações plasmáticas de RTX em pacientes com câncer colorretal [54].

Nenhum estudo anódico com o objetivo de estabelecer o mecanismo de oxidação do RTX *in-vivo* foi realizado como também não existe nenhum estudo da interação RTX-DNA na literatura. Por ser um fármaco antineoplásico, amplamente utilizado no tratamento de diversos tipos de tumores, é de grande importância a proposição de um mecanismo de oxidação para o RTX, bem como o estudo de sua interação com DNA, para melhor compreensão de sua toxicidade.

1.3. Procarbazina

A Procarbazina (PCZ), **Fig. 4**, 4-[(2-methylhydrazinyl)methyl]-N-propan-2-ylbenzamide, é um derivado de hidrazina com atividade anti-tumoral eficaz na doença de Hodgkin (tumor do sistema linfático), tumores do pulmão e cerebral, melanoma maligno e tumores de pele [55-58].

Figura 4. Estrutura química da procarbazina

A PCZ, assim como outros antineoplásicos, pode apresentar reações tóxicas e cancerígenas. Em ratos, a PCZ é cancerígena e causa tumores pulmonares, leucemia [59] e adenocarcinoma mamário [60]. Em primatas não humanos, por sua vez, induz a leucemia mielóide e neoplasias malignas [61]. Em seres humanos, a PCZ é classificada pela Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC) como possível carcinogênico, seu uso causa depressão na medula óssea e depressão no sistema nervoso central [57,58]. Entretanto o mecanismo de ação antineoplásica da PCZ ainda não está totalmente compreendido e resultados divergentes são encontrados na literatura [57-63].

A interação PCZ-DNA tem sido investigada nos últimos anos para determinar o seu mecanismo de ação antineoplásica bem como sua carcinogênese. Há muitas hipóteses relatadas na literatura. Dentre elas encontram-se a oxidação da PCZ catalisada por diferentes enzimas e metais, incluindo peroxidase de rábano, citocromo P450 e Cu^{2+} , com formação de radicais livres e/ou azóxi derivados que em contato com a molécula do dsDNA provocam diferentes tipos de lesões, tais como alquilação e danos oxidativos [57-63].

1.4. Princípios da Eletroquímica

A eletroquímica estuda fenômenos de transferência de cargas em solução (processo homogêneo) ou na superfície de eletrodos (processo heterogêneo) [8]. Esta transferência de cargas, geralmente está relacionada à transferência de elétrons, representada por:



A espécie oxidada “O” recebe n elétrons para se transformar na espécie reduzida “R”. O potencial do eletrodo está relacionado com a energia do par O | R, denominada energia redox, E_{redox} [67]. A dupla seta indica o processo reverso, em que a espécie reduzida “R” fornece n elétrons para se transformar na espécie oxidada “O”.

As reações heterogêneas de transferência de carga ocorrem em eletrodos distintos, imersos em solução numa célula eletroquímica. O **eletrodo de trabalho**, também conhecido como eletrodo indicador, é o eletrodo onde ocorre a reação de transferência de elétrons do analito de interesse. O potencial deste eletrodo é controlado a partir do eletrodo de referência. O **eletrodo de referência** utilizado numa experiência eletroquímica deve possuir uma impedância elevada não permitindo passagem significativa de corrente por si próprio. Um **eletrodo auxiliar**, onde ocorre a reação complementar de transferência de elétrons, assegura que a corrente elétrica relativa ao processo redox como um todo migre entre ele e o eletrodo de trabalho, evitando que ocorram quaisquer mudanças no eletrodo de referência para que este mantenha seu potencial constante o tempo todo. Assim, nos estudos eletroquímicos dois componentes são de extrema importância, os eletrodos e o eletrólito suporte [68].

O eletrólito é uma substância que, ao se dissolver-se em um dado solvente, produz uma solução com uma alta condutividade elétrica e extremamente maior que

a condutividade do solvente. Em sistemas eletroquímicos é comum usar a denominação eletrólito suporte, o qual deve possuir uma concentração pelo menos cem vezes maior que a da espécie eletroativa [69].

1.4.1. Técnicas Voltamétricas

A voltametria tem por objetivo medir a corrente (sinal de resposta) que flui através do eletrodo de trabalho em função do potencial aplicado (sinal de excitação), onde ambos variam com o tempo. A aplicação de um potencial dá origem a uma corrente faradaica e uma capacitiva [67].

$$I_t = I_c + I_f$$

A curva registrada durante a voltametria é denominada voltamograma ou onda voltamétrica. As duas técnicas voltamétricas mais usadas são: *método de varrimento cíclico de potencial*, também denominada de voltametria cíclica, no qual é aplicado um potencial que varia linearmente entre um valor máximo e um valor mínimo (ciclicamente) com o tempo; e *método de degrau e pulso*, no qual é aplicado um pulso de potencial e as correntes são medidas em vários instantes durante o tempo de vida dos pulsos que altera instantaneamente o sistema eletroquímico e inclui a voltametria de pulso diferencial e onda quadrada [67].

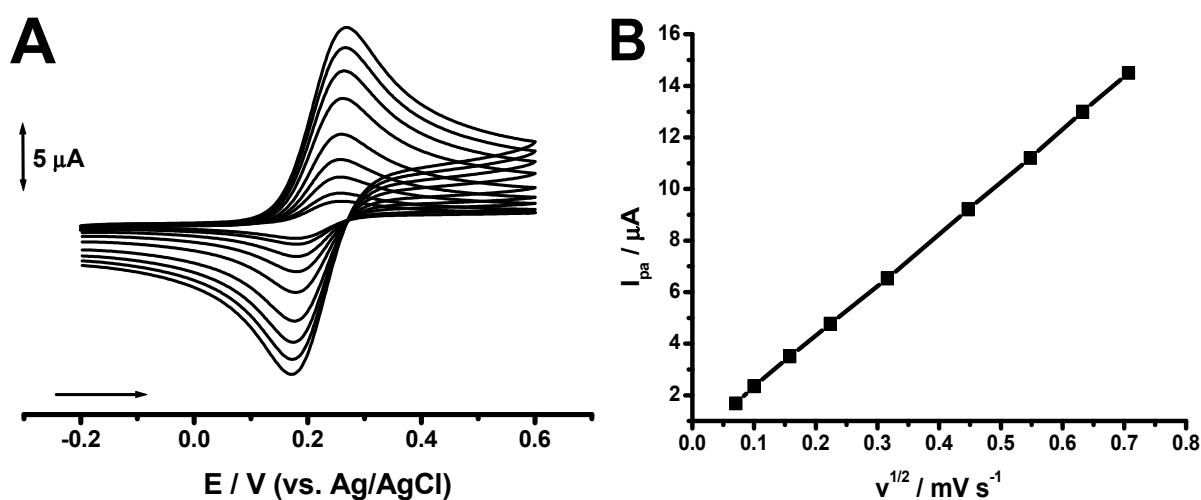
1.4.1.1. Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica é uma técnica muito utilizada para desenvolvimento de métodos analíticos qualitativos e quantitativos. Por outro lado é também bastante usada para determinar mecanismos de reações redox, uma vez que possibilita a determinação de intermediários de reação e o acompanhamento dos produtos formados na superfície dos eletrodos [8,67].

No exemplo do comportamento redox do par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, **Fig. 5A**, utilizando como eletrodo de trabalho o GCE, o potencial varia ciclicamente de -0,2 V até 0,6 V *versus* um eletrodo de referência Ag/AgCl. No início da varredura nenhuma corrente é observada considerando-se que não há espécie possível de ser oxidada ou reduzida nessa faixa de potencial. Em aproximadamente 0,2 V é detectada uma corrente anódica correspondente à oxidação do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ a $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. A inversão na direção da varredura dá origem a uma corrente cátodica correspondente à redução do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ formado na varredura direta a $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$.

É possível observar ainda que a intensidade de corrente de pico anódico aumenta linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, indicando que o transporte de massa do íon $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ à superfície do eletrodo é controlado predominantemente por difusão [8], **Fig. 5B**.

Figura 5. CV - **(A)** CVs de uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1,0 mmol L⁻¹, em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH = 7, em diferentes velocidades de varredura 5-500 mV s⁻¹ **(B)** I_{pa} vs. $v^{1/2}$.



As correntes de pico têm uma relação de proporcionalidade com a velocidade da reação de transferência de carga e com a concentração em solução da espécie que sofre essa reação [8,67].

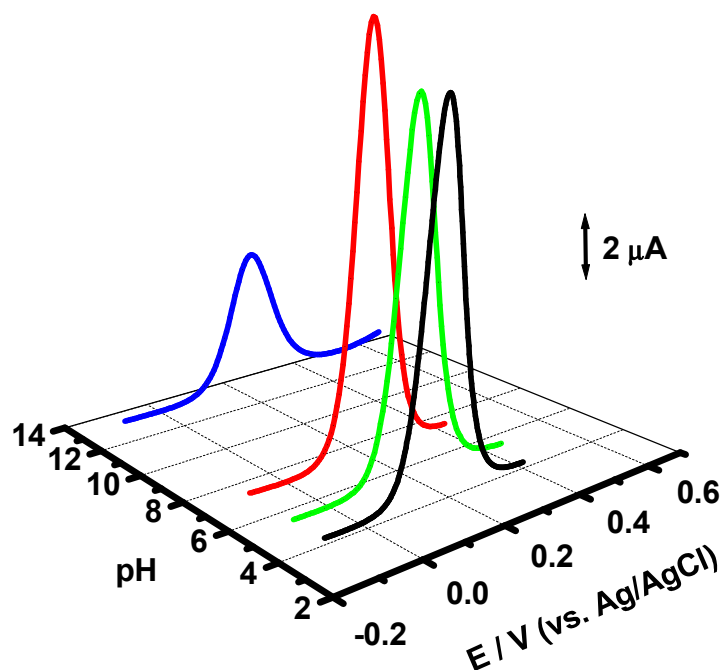
1.4.1.2. Voltametria de Pulso Diferencial

Com o desenvolvimento das técnicas de pulso, principalmente a de pulso diferencial, houve um grande melhora instrumental na discriminação entre a corrente faradaica e capacitiva. Nesta técnica, a aplicação de pulsos de potencial e a medida de corrente são realizadas em intervalos de tempo muito pequenos [70].

Em voltametria de pulso diferencial são aplicados ao eletrodo de trabalho pulsos de potencial ΔE_p sucessivos e temporários durante intervalos periódicos de tempo (τ). Os pulsos são fixos e sobrepostos a uma rampa de potencial crescente/decrescente, com degrau de potencial ΔE_s . A corrente é amostrada um pouco antes da aplicação e no finalzinho da vida do pulso. A diferença entre essas duas corrente é plotada *versus* o potencial aplicado [68], resultando em uma curva

diferencial, **Fig. 6**, onde a altura dessa curva é diretamente proporcional à concentração da espécie química investigada.

Figura 6. DPVs da oxidação do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ vs. o pH em 3D.



O tempo τ' define a largura do pulso. Já o tempo τ multiplicado ao ΔE s define a velocidade de varredura (v). Através da largura à meia altura $W_{1/2}$ é possível determinar o mecanismo da reação de transferência de carga, tendo em vista que, para pequenas amplitudes de pulso, $W_{1/2}$ é inversamente proporcional ao número de elétrons transferidos ($W_{1/2} = 90/n$). I_p é proporcional a concentração do analito e depende da velocidade da reação eletroquímica. A corrente observada (ΔI) é resultante da diferença de duas correntes $\Delta I = I_2 - I_1$, **Fig. 6** [8,67].

1.4.1.3. Voltametria de Onda Quadrada

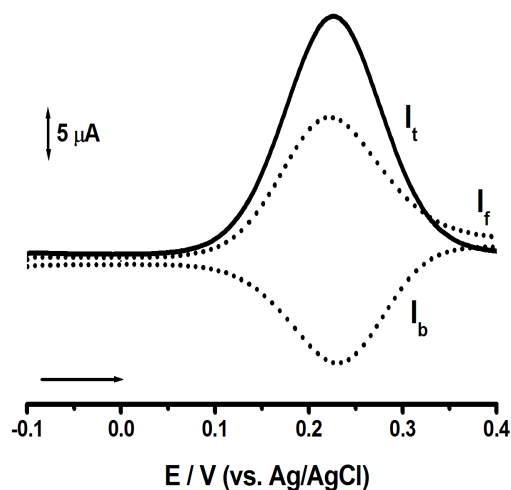
A voltametria de onda quadrada pode ser utilizada para realizar experimentos com mais rapidez que a técnica de pulso diferencial e com sensibilidade semelhante ou um pouco melhor [70].

A voltametria de onda quadrada é resultado da adição de uma onda quadrada de amplitude de pulso ΔE_p a uma escada de potencial com degraus de amplitude

ΔE_s , e com um período τ . Durante cada ciclo de frequência $f = \tau^{-1}$, um pulso de potencial positivo é aplicado ao eletrodo durante metade do ciclo a que se segue, na metade restante, ocorre a aplicação de um pulso de potencial negativo. A corrente é medida antes do fim de ambos os pulsos em cada ciclo, o que diminui a contribuição da corrente capacitiva sobre a corrente total medida [8,67].

Assim, como mostrado na **Fig. 7**, o pulso de potencial no sentido direto produz uma corrente anódica também denominada de corrente direta (I_f), enquanto que o pulso no sentido inverso produz uma corrente catódica denominada corrente reversa (I_b). O cálculo para determinar a corrente total, ΔI (I_t) que será registrada, é realizado através da subtração da corrente $I(1)$ registrada no final do pulso de potencial direto, pela corrente $I(2)$ registrada no final do pulso inverso, portanto $I(2)$ possui sinal contrário a $I(1)$. Logo, para sistemas reversíveis $\Delta I = I(1) - I(2)$ é maior do que $I(1)$ [8,67].

Figura 7. SWV do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1,0 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH = 7,0, I_t – total, I_f – forward (direta) e I_b – backward (reversa).



1.5. Biossensores Eletroquímicos de DNA

Moléculas de DNA naturais ou sintéticas podem interagir com a superfície do eletrodo, ocorrendo adsorção. Os conhecimentos desta adsorção na superfície do eletrodo levaram ao desenvolvimento de eletrodos modificados com DNA, também conhecidos como biossensores eletroquímicos de DNA [6,12].

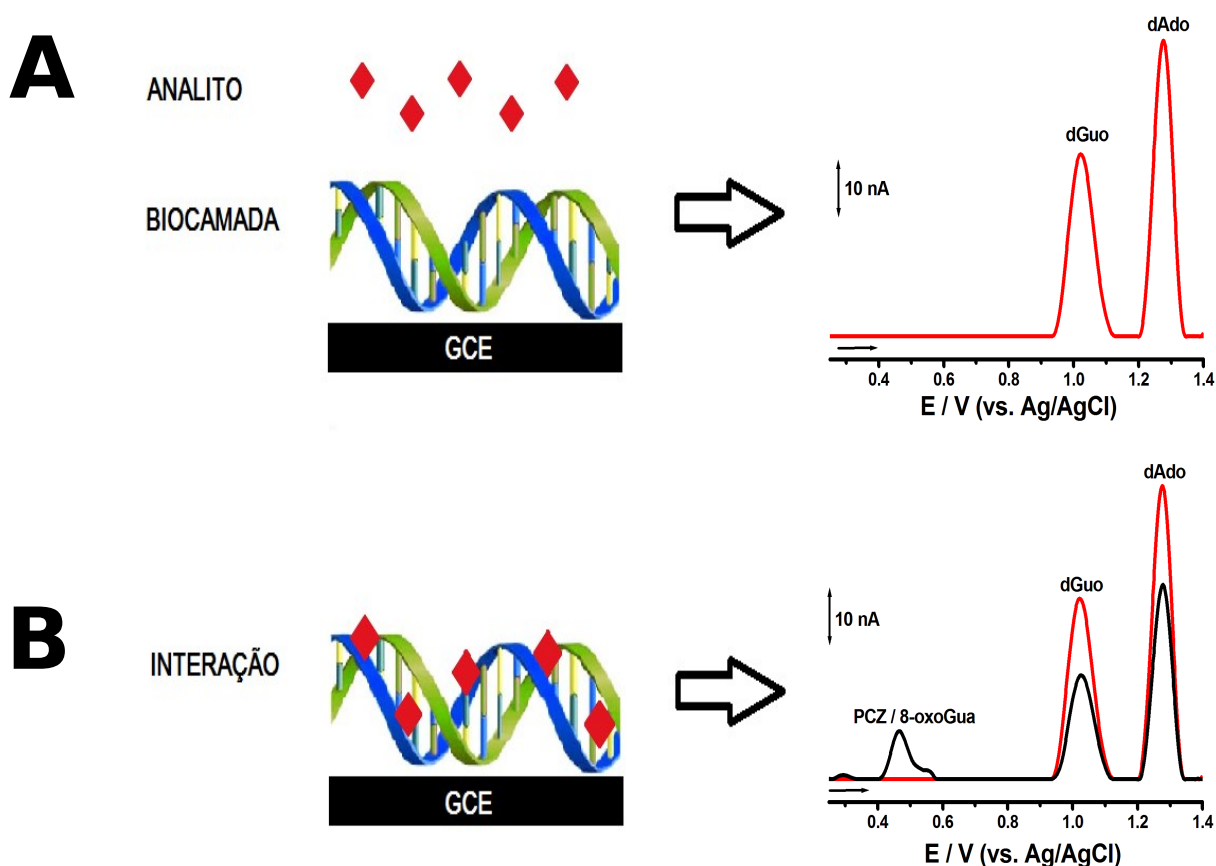
A diversificação dos transdutores estendeu de forma significativa o campo de aplicação dos biossensores eletroquímicos com DNA. Eletrodos de carbono, como o carbono vítreo, fibras de carbono, pasta de carbono e, mais recentemente, diamante dopado com boro [6,71-73], possuem normalmente um intervalo de potencial útil bastante largo, em especial para os valores de potencial positivo, que permite a detecção dos danos causados ao DNA através da análise dos efeitos que estes danos acarretam aos picos de corrente de eletroxidação dos componentes do DNA e do próprio DNA, seja em dupla ou simples hélice [6,71-73]. Ressalte-se que processos de eletroxidação do DNA e dos seus componentes ocorrem nas bases purínicas e pirimidínicas, uma vez que os açúcares e os grupos fosfatos não são eletroativos em eletrodos de carbono em meio aquoso [6,71-73].

Um biossensor eletroquímico de DNA é um dispositivo transdutor que utiliza o DNA como elemento de reconhecimento molecular para medir os processos de ligação específica com o DNA, utilizando transdução eletroquímica [12]. Estes biossensores possibilitam a elucidação de interações redox entre drogas e agentes cancerígenos com o DNA, assim como fornecem indicações sobre os mecanismos subjacentes a essas interações [74,75].

Os biossensores eletroquímicos de DNA apresentam algumas propriedades importantes como fácil preparação, alta sensibilidade e seletividade, frequência analítica rápida, custo baixo, possibilidade de geração, *in-situ*, de intermediários altamente reativos e interação desses com o próprio DNA. Os sinais de oxidação no substrato de carbono dos componentes do DNA, tais como os nucleosídeos, os nucleotídeos, as bases purínicas e pirimidínicas, podem também ser empregados como moléculas de reconhecimento para a determinação de interações mais específicas [6].

Assim como mostrado na **Fig. 8**, os biossensores eletroquímicos de DNA possuem uma biocamada, que utiliza o DNA como bioreceptor, e um transdutor eletroquímico, que neste caso é o GCE. A eletroxidação do DNA, em pH = 4,5, dá origem a dois picos anódicos bem separados e definidos, facilmente detectados por DPV. Um primeiro pico, de menor potencial, está associado à eletroxidação de resíduos da desoxiguanosina, em +1,0 V, enquanto um segundo pico é devido à eletroxidação dos resíduos da desoxiadenosina em +1,25 V, **Fig. 8A**.

Figura 8. Esquema de um biossensor eletroquímico de dsDNA e suas respostas voltamétricas **(A)** biossensor de dsDNA sem interagir com o analito (controle), **(B)** biossensor de dsDNA após interação com o antineoplásico PCZ.



Ao interagir com o DNA, o analito pode provocar lesões na molécula do DNA que resultam em mudanças no voltamograma do biossensor de DNA, **Fig. 8B**. Assim, estas lesões podem ser monitoradas medindo-se:

1. As mudanças na resposta voltamétrica dos biossensores eletroquímicos de DNA após incubação durante diferentes períodos de tempo com os compostos promotores das lesões no DNA;
2. A mudança do potencial formal do composto promotor de lesões no DNA, causado pela ligação ao DNA;
3. A ocorrência de novos picos anódicos associados a componentes do DNA, tais como nucleótidos, nucleosídeos, bases livres, produtos de oxidação tais como os biomarcadores 8-oxoguanina (8-oxoGua) e 2,8-diidroxiadenina (2,8-DHA) [6].

O desempenho, sensibilidade e confiabilidade de resposta dos biossensores eletroquímicos de DNA são relacionadas com o procedimento escolhido para a sua confecção e dependem de fatores como, por exemplo, características e as

condições de pré-tratamento do eletrodo, o método de imobilização utilizado, o tempo de adsorção, a sequência e o comprimento da cadeia da molécula de DNA, a concentração, o pH da solução de DNA utilizada, a composição e a força iônica do eletrólito suporte [6].

Geralmente três diferentes procedimentos experimentais têm sido utilizados para confecção de biossensores eletroquímicos de DNA, os quais são relacionados à aplicação requerida [6].

1- Biossensor de dsDNA de camada fina: preparado por imersão do GCE ($d = 1,5 \text{ mm}$) numa solução de dsDNA $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ durante 10 min com aplicação de um potencial de $+ 0,30 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl). Depois o biossensor é incubado com a substância de interesse

2- Biossensor de dsDNA multicamada: preparado pela cobertura camada por camada do GCE ($d = 1,5 \text{ mm}$) com três gotas sucessivas de $5 \mu\text{L}$ de uma solução de dsDNA $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Entre cada gota adicionada, a superfície do eletrodo é secada em atmosfera inerte. Depois de completamente seco o biossensor é incubado com a substância de interesse.

3- Biossensor de dsDNA de camada espessa: preparado pela cobertura do eletrodo de carbono vítreo ($d = 1,5 \text{ mm}$) com uma gota de $10 \mu\text{L}$ de uma solução de dsDNA 35 mg mL^{-1} . Depois o biossensor é seco em atmosfera normal durante aproximadamente 24 h e por último novamente hidratado na solução tampão $\text{pH} = 4,5$ por volta de 30 minutos. Depois de completamente hidratado o biossensor é incubado com a substância de interesse.

Capítulo 2

Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Investigar o comportamento eletroquímico e eletroanalítico da FLSC utilizando técnicas voltamétricas, bem como, estudar o comportamento eletroquímico e eletroanalítico dos antineoplásicos RTX e PCZ e suas interações com o dsDNA utilizando técnicas voltamétricas e biossensores eletroquímicos de DNA.

2.2. Objetivos Específicos

- Investigar o comportamento anódico da FLSC utilizando técnicas voltamétricas, como CV, DPV e SWV;
- Propor um mecanismo de oxidação para a FLSC;
- Propor um método eletroanalítico para detecção e quantificação da FLSC;
- Investigar o comportamento anódico dos antineoplásicos RTX e PCZ utilizando as técnicas voltamétricas, como CV, DPV e SWV;
- Propor um mecanismo de oxidação para o RTX;
- Investigar a interação RTX-dsDNA utilizando biossensores eletroquímicos de DNA;
- Propor um mecanismo de oxidação para o PCZ;
- Propor uma metodologia eletroanalítica para investigar a degradação química do PCZ em diferentes meios e por diferentes períodos de tempo;
- Investigar a interação PCZ-Cu²⁺ utilizando técnicas voltamétricas;
- Investigar a interação PCZ-dsDNA utilizando técnicas voltamétricas e biossensores eletroquímicos de DNA.

Capítulo 3

Experimental

3.1. Reagentes, Materiais e Metodologia

FLSC, RTX, PCZ e $K_4[Fe(CN)_6]$ foram obtidos da Sigma e usados sem qualquer tipo de purificação. Soluções estoque de FLSC $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, RTX $210 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $K_4[Fe(CN)_6]$ 100 mmol L^{-1} foram preparadas em água deionizada e armazenadas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. A solução estoque da PCZ $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi preparada em água deionizada previamente desaerada e posteriormente armazenada a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. As concentrações específicas utilizadas nas medidas voltamétricas foram obtidas por diluição das respectivas soluções estoque no eletrólito suporte desejado, diretamente na célula eletroquímica.

O dsDNA, proveniente do timo de vitela (calf thymus) tipo II (“altamente polimerizado” 62% de Na/13% de água e comprimento de 10,000-15,000 bp), foi obtido da Sigma. Soluções estoque foram preparadas em água deionizada e a concentração foi determinada por espectrofotometria: $1\text{uA (260 nm)} = 50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA.

As soluções dos eletrólitos suporte com diferentes valores de pH, **Tabela 1**, foram preparadas usando reagentes de grau analítico e água purificada de um sistema Millipore Milli-Q (condutividade $\leq 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$) de acordo com a literatura [76].

Tabela 1. Composição das soluções de eletrólito suporte.

Eletrólitos suporte (diluições para 100 mL)	pH
$0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl (25 mL)} + 0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl (6,5 mL)}$	2,0
$0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOAc (3,7 mL)} + 0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ HAcO (46,3 mL)}$	3,4
$1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOAc (7,2 mL)} + 1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HAcO (12,5 mL)}$	4,5
$0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOAc (41,2 mL)} + 0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ HAcO (8,8 mL)}$	5,4
$0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4 \text{ (6,15 mL)} + 0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4 \text{ (43,85 mL)}$	6,1
$0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4 \text{ (30,5 mL)} + 0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4 \text{ (19,5 mL)}$	7,0
$0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4 \text{ (47,35 mL)} + 0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4 \text{ (2,65 mL)}$	8,0
$0,025 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O (50 mL)} + 0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH (3,0mL)}$	9,2

0,2 mol L ⁻¹ KCl (25 mL) + 0,2 mol L ⁻¹ NaOH (6,0 mL)	12,0
---	------

A interação dos antineoplásicos com o dsDNA foi investigada utilizando o biossensor eletroquímico de dsDNA multicamada. O biossensor de dsDNA multicamada foi preparado pela cobertura, camada por camada, do GCE com gotas sucessivas de uma solução de dsDNA 50 µg mL⁻¹. Entre cada gota adicionada, a superfície do eletrodo foi secada sob um fluxo constante de nitrogênio. Para cada tempo de incubação investigado um novo biossensor foi confeccionado.

Microvolumes foram medidos usando pipetas eletrônicas (EP), EP-10 µmol L⁻¹ e EP-100 µmol L⁻¹ Plus Motorizada (Rainin Instrument Co. Inc., Woburn, EUA). As medições de pH foram realizadas em um pH-metro Metrohm Herisau (Suíça) utilizando um eletrodo de vidro combinado Scott Gerate. Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente, T = 25 ± 1 °C.

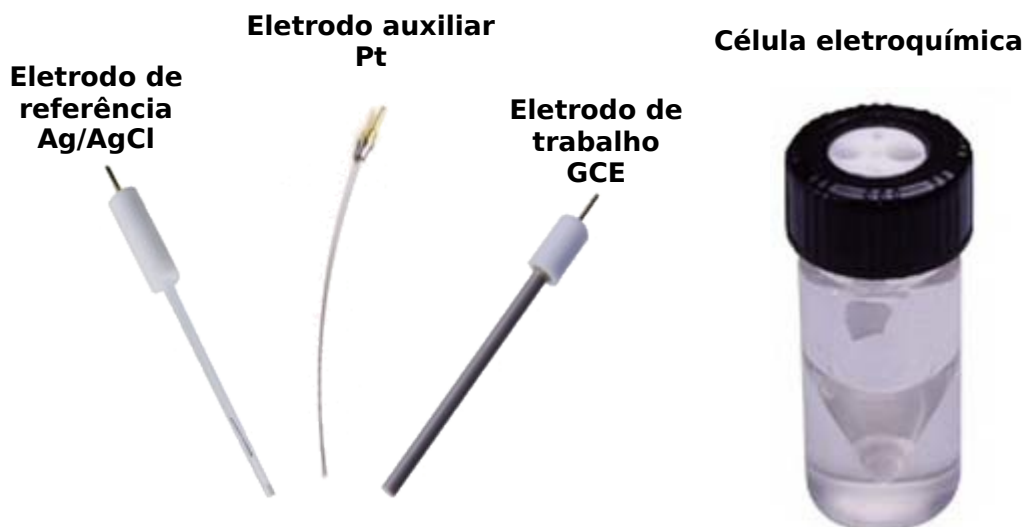
3.2. Parâmetros Voltamétricos e Célula Eletroquímica

Os experimentos voltamétricos foram realizados utilizando um potenciostato (Metrohm, PGSTAT 302N), **Fig. 9**, com o software GPES 4.9, Metrohm / Autolab, Utrecht, Holanda. As medições foram realizadas utilizando um eletrodo de trabalho GCE (d = 1,6 mm), um eletrodo auxiliar de fio de Pt e um Ag/AgCl (3 mol L⁻¹ KCl) como eletrodo de referência, numa célula eletroquímica de compartimento único de 5 mL, **Fig. 10**. As condições experimentais para a DPV foram: amplitude de pulso de 50 mV, largura de pulso de 70 ms e velocidade de varredura de 5 mV s⁻¹. Para a SWV as condições experimentais foram: amplitude de pulso de 50 mV, frequência de 10 Hz e incremento potencial de 5 mV, correspondendo a uma velocidade de varredura efetiva de 50 mV s⁻¹.

Figura 9. Imagem do potenciostato.



Figura 10. Imagem da célula eletroquímica e dos eletrodos utilizados.



O GCE foi polido utilizando spray de diamante (tamanho de partícula 1 μm , Kement, Kent, UK) antes de cada ensaio eletroquímico. Após polimento, o eletrodo foi cuidadosamente enxaguado com água deionizada. Após este tratamento mecânico, o GCE foi colocado no eletrólito suporte e vários voltamogramas foram registrados até que um voltamograma de linha de base de estado estável fosse obtido. Este procedimento assegurou resultados experimentais reproduzíveis.

3.3. Aquisição e Apresentação de Dados Voltamétricos

Todos os voltamogramas DP apresentados foram corrigidos na linha de base pela aplicação de média móvel com uma janela de step de 2 mV incluída no software GPES versão 4.9. Este tratamento matemático melhora a visualização e identificação de picos sobre a linha de base, embora a corrente de pico seja em alguns casos reduzida (<10%) em relação à curva não tratada. No entanto, este tratamento matemático dos voltamogramas originais de pulso diferencial foi utilizado na apresentação de todos os voltamogramas experimentais de DPV para uma melhor e mais clara identificação dos picos. Os valores de corrente de pico apresentados em todos os gráficos foram determinados a partir dos voltamogramas originais não tratados após subtração da linha de base.

Capítulo 4

Fluoresceína: Mecanismo de oxidação e determinação eletroanalítica

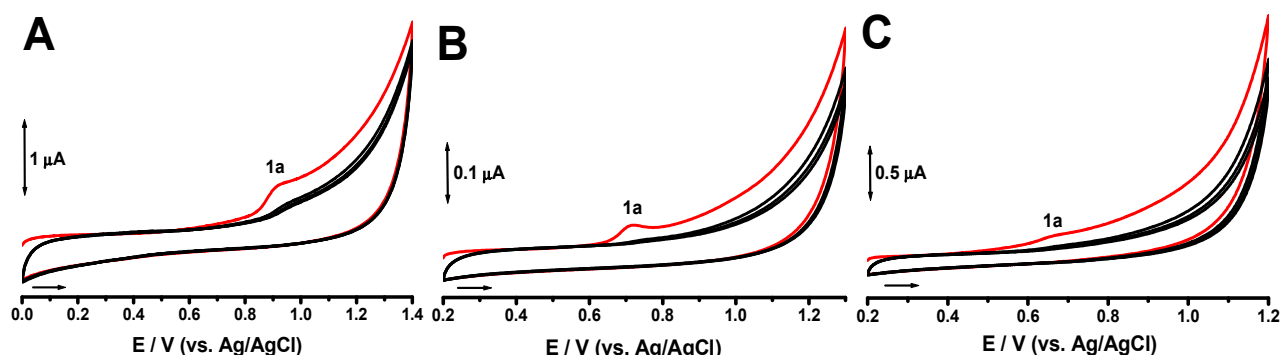
4.1. Oxidação da Fluoresceína

4.1.1. Voltametria Cíclica

Primeiramente, o estudo do comportamento anódico da FLSC foi investigado por CV a uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , numa solução de FLSC $25 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ recém preparada em tampão acetato, $\text{pH} = 4,5$, **Fig. 11A**, em tampão fosfato, $\text{pH} = 7,0$, **Fig. 11B** e em tampão borato, $\text{pH} = 9,7$, **Fig. 11C**. Um pico anódico 1a, associado à oxidação do grupo fenólico na posição C6' do anel aromático da molécula, foi detectado.

O valor de potencial do pico 1a sofre uma variação com o pH. Em meio ácido, $\text{pH} = 4,5$, $E_{p1a} = + 0,91 \text{ V}$, em meio fisiológico, $\text{pH} = 7,0$, $E_{p1a} = 0,71 \text{ V}$ e em meio alcalino, $\text{pH} = 9,7$, $E_{p1a} = + 0,65 \text{ V}$, demonstrando que a oxidação da FLSC é dependente do pH do meio. É possível concluir que o processo de oxidação do pico 1a é irreversível, uma vez que não foi observado nenhum pico catódico durante a varredura de potencial reverso. Na segunda varredura pode ser observada em meio ácido uma diminuição significativa da corrente do pico 1a, **Fig. 11A**, enquanto que em meio fisiológico e em meio alcalino a corrente do pico 1a desaparece completamente, **Figs. 11B e 11C**, devido à adsorção de produtos de oxidação da FLSC na superfície do GCE.

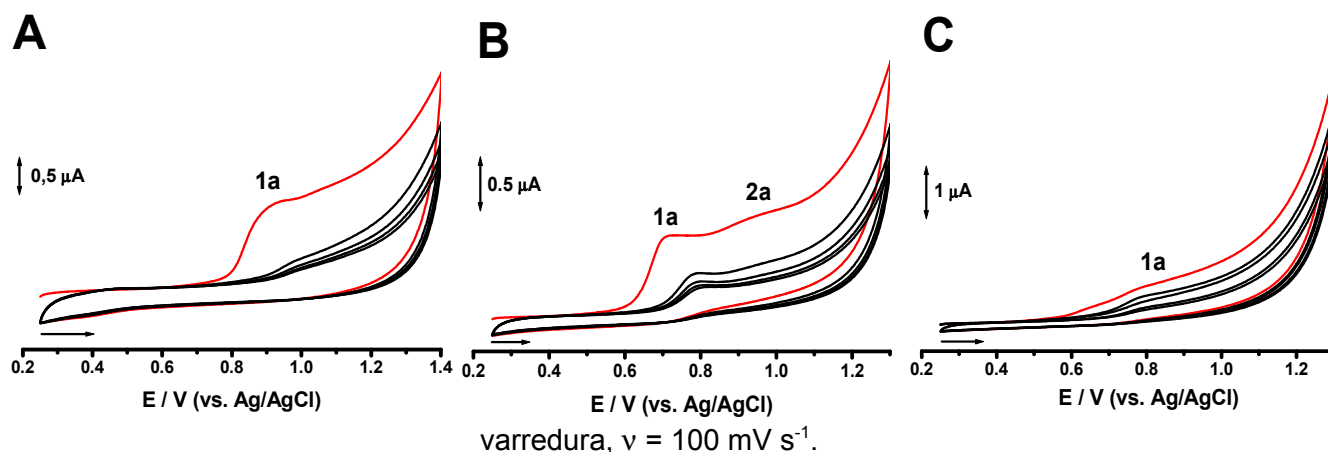
Figura 11. CVs sucessivos obtidos em solução de FLSC $25 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$: **(A)** tampão acetato, $\text{pH} = 4,5$, **(B)** tampão fosfato, $\text{pH} = 7,0$ e **(C)** tampão borato, $\text{pH} = 9,74$, (—) primeira varredura, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.



O mesmo estudo também foi realizado utilizando uma concentração maior da solução de FLSC. CVs foram obtidos para uma solução de FLSC $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em meio ácido, fisiológico e alcalino, **Fig. 12**. No tampão acetato, $\text{pH} = 4,5$, **Fig. 12A**, foi

detectado um único pico anódico 1a, $E_{p1a} = 0,91$ V, que diminuiu significativamente na segunda varredura. Em tampão fosfato, pH = 7,0, **Fig. 12B**, foram detectados dois picos de oxidação consecutivos, pico 1a, $E_{p1a} = + 0,71$ V, e pico 2a, $E_{p2a} = + 0,96$ V, enquanto que em tampão borato, pH = 9,7, **Fig. 12C**, foi detectado apenas um único pico anódico de baixa corrente, em $E_{p1a} = + 0,77$ V.

Figura 12. CVs sucessivos obtidos em solução de FLSC $50 \mu\text{mol L}^{-1}$: **(A)** tampão acetato, pH = 4,5, **(B)** tampão fosfato, pH = 7,0 e **(C)** tampão borato, pH = 9,74, (—) primeira



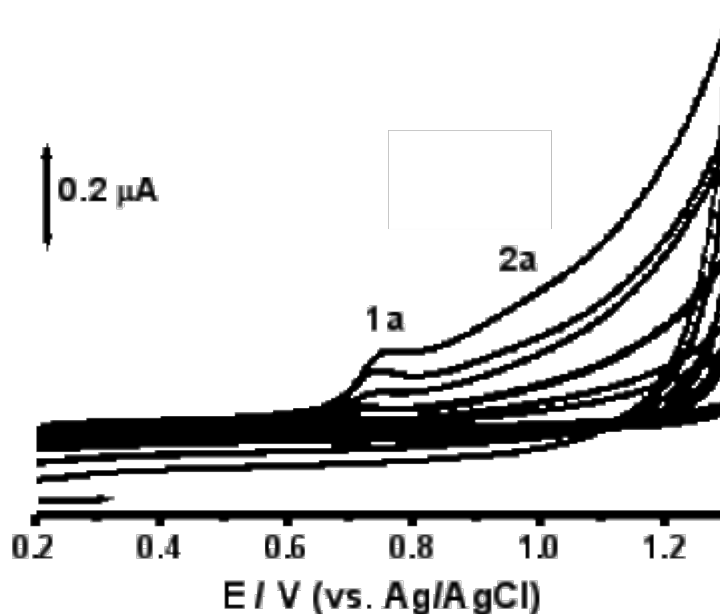
Os picos anódicos 1a e 2a de FLSC estão associados com a oxidação do grupo fenólico na posição C6 'e C3', respectivamente, em anéis aromáticos da molécula, **Fig.1**. Em todas os valores de pH investigados, uma diminuição das correntes de pico para ambos os picos 1a e 2a na segunda varredura dos CVs sucessivos foram observados, **Figs. 12A, 12B e 12C**, o que é atribuído à adsorção de produtos de oxidação FLSC na superfície GCE. No entanto, a superfície do GCE não está completamente bloqueada, uma vez que os picos de oxidação nunca desaparecem completamente nestas condições experimentais. Na varredura reversa de potencial, na direção catódica, não foram detectados picos, demonstrando que os processos de oxidação são todos irreversíveis.

Com o intuito de compreender como ocorre o transporte de massa da FLSC $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a superfície do GCE foram realizados CVs para diferentes velocidades de varredura entre 10 e 500 mV s^{-1} em tampão fosfato, pH = 7,0, **Fig. 13**. A superfície do GCE foi sempre limpa entre cada medida voltamétrica para evitar

possíveis problemas resultantes da adsorção de produtos de oxidação da FLSC na superfície do eletrodo.

Uma mudança ligeiramente positiva no potencial foi observada para o pico 1a, **Fig. 13**. Além disso, a corrente do pico 1a aumenta linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura. Este tipo de comportamento é específico de processos de oxidação controlados pela difusão das espécies à superfície do eletrodo [8,77-79] e está de acordo com o caráter altamente hidrofílico de FLSC em meio fisiológico, pH = 7,0 [10,29].

Figura 13. CVs obtidos numa solução de FLSC $25 \mu\text{mol L}^{-1}$, em tampão fosfato, pH = 7,0, para diferentes velocidades de varredura (10, 25, 50, 100, 200, 300 e 500 mV s^{-1}).



Sabendo-se que esse processo de oxidação é difusional, foi possível calcular o coeficiente de difusão para a FLSC [10]. Para realizar este cálculo, primeiramente é preciso calcular a área eletroativa do eletrodo e o coeficiente de transferência de carga α_c .

A área eletroativa de GCE foi determinada pela equação de Randles-Sevcik para um sistema reversível, **Equação 1**, plotando o gráfico de I_{p1a} vs. $v^{1/2}$, usando uma

solução de 62,5 mmol L⁻¹ de hexacianoferrato e considerando o valor do coeficiente de difusão de hexacianoferrato em tampão fosfato de $D_O = 7,35 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [80]. Assim, foi estimada uma área eletroativa de 0,011 cm².

$$I_{pa} \text{ (A)} = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A [O]_{\infty} D_O^{1/2} v^{1/2} \text{ (Equação 1)}$$

Para o cálculo do α_c , a diferença entre o potencial de pico E_{p1a} e o potencial a meia altura do pico $E_{p1a/2}$ foi calculada e determinada como $\sim 35 \text{ mV}$. Dado que para um sistema irreversível controlado por difusão, $|E_{p1a} - E_{p1a/2}| = 47.7 / (\alpha_c + n')$, onde α_c é o coeficiente de transferência de carga e n' o número de elétrons na etapa determinante [8,77-79], pode-se calcular que $(\alpha_c + n') = 1.36$.

A partir desses dados, o coeficiente de difusão da FLSC foi calculado pela equação de Randles-Sevcik para sistemas irreversíveis controlados por difusão [8,77-79], **Equação 2**.

$$I_{p1a} \text{ (A)} = 2.99 \times 10^5 n (\alpha_c + n')^{1/2} A [O]_{\infty} D_O^{1/2} v^{1/2} \text{ (Equação 2)}$$

Onde n é o número de elétrons transferidos durante a oxidação da FLSC ($n = 1$, seção 4.1.2.), A é a área eletroativa de GCE em cm², D_O é o coeficiente de difusão em cm² s⁻¹, $[O]_{\infty}$ é a concentração da FLSC em mol cm⁻³ e v é a velocidade de varredura em V s⁻¹. Assim, o valor de D_{FLSC} da FLSC foi estimado pela equação de Randles-Sevcik por plotagem do gráfico de I_{p1a} vs. $v^{1/2}$ em tampão fosfato, pH = 7,0, como $D_{FLSC} = 9,77 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

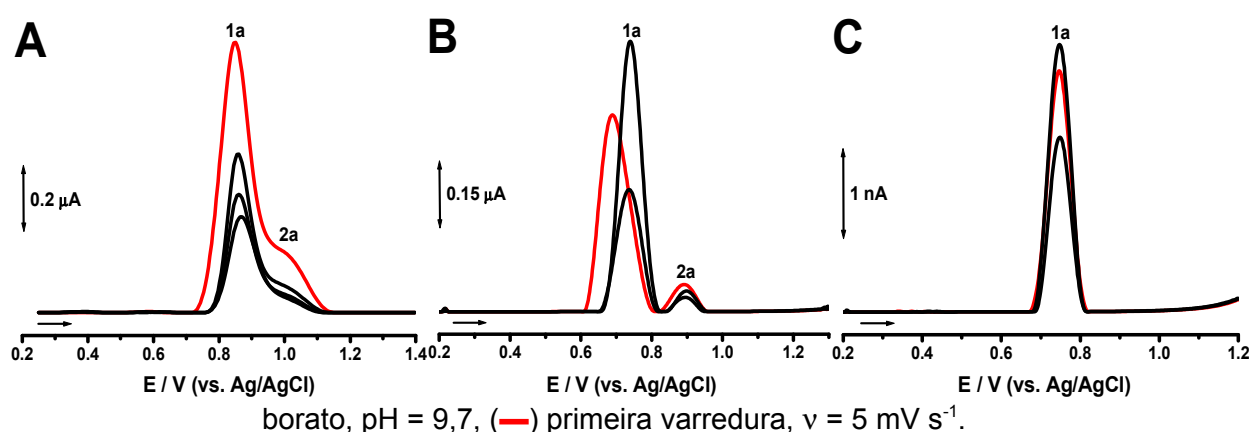
4.1.2. Voltametria de Pulso Diferencial

O influência do pH sobre a oxidação de FLSC foi investigada através da DPV, um método com alta resolução e sensibilidade que permite boa separação de picos, permitindo melhor caracterização de etapas subseqüentes [8,77,79].

Por ser uma técnica sensível, a DPV permite a utilização de concentrações menores sem que haja perda do sinal eletroativo. Portanto, foram realizados DPVs sucessivos em solução de FLSC 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ recém-preparada em tampão acetato, pH = 4,5, em tampão fosfato, pH = 7,0 e tampão borato, pH = 9,7, **Fig. 14**. Os

voltamogramas em meios ácido e fisiológico mostraram que a oxidação da FLSC ocorre em duas etapas, pico 1a e 2a, **Figs. 14A e 14B**, enquanto que em meio alcalino ocorre apenas por uma única etapa de oxidação, pico 1a, **Fig. 14C**. Assim, é demonstrado que a oxidação de FLSC é significativamente afetada pelo pH, **Figs. 14A, 14B e 14C**. Como a FLSC possui uma forma predominante em cada pH, **Fig. 1**, ocorrem mudanças estruturais nos grupos fenólicos e variações no caráter hidrofílico da molécula, influenciando seu processo de oxidação na superfície do GCE.

Figura 14. DPVs sucessivos (com correção de linha de base) obtidos em soluções de FLSC $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em: **(A)** tampão acetato, pH = 4,5, **(B)** tampão fosfato, pH = 7,0 e **(C)** tampão



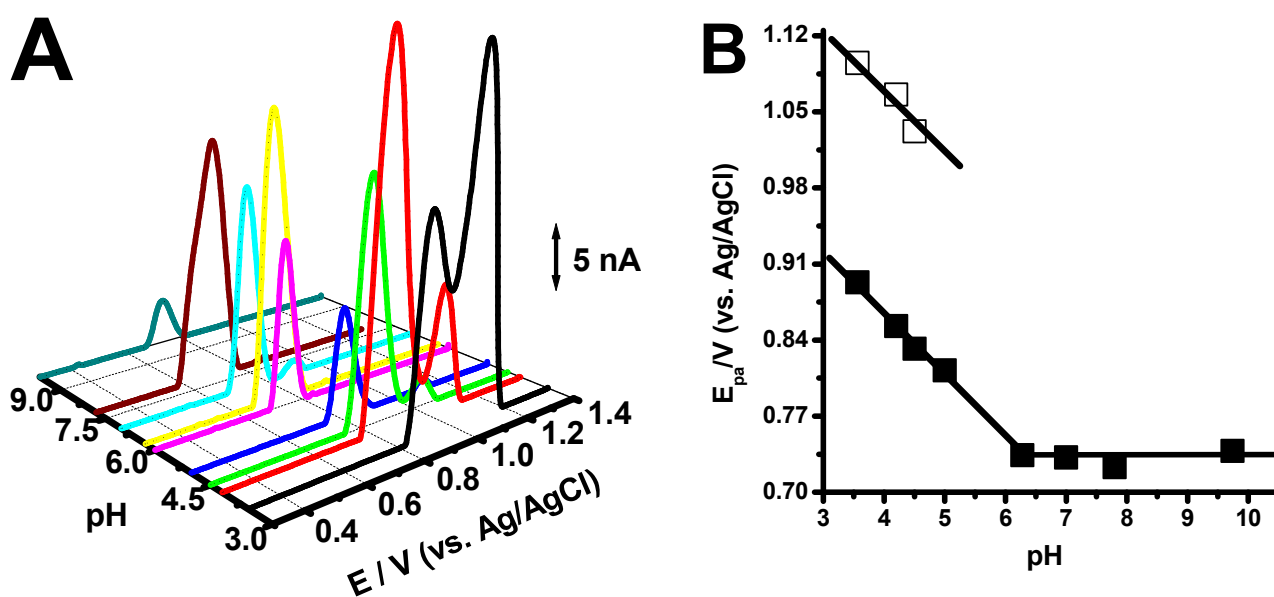
A influência do pH na oxidação da FLSC também foi investigada por DPV em um amplo intervalo de pH, entre 3,5 e 9,7, uma vez que o conhecimento dos potenciais de oxidação a diferentes valores de pH poderia oferecer informações complementares sobre o comportamento de oxidação do FLSC, como a quantidade de elétrons e prótons envolvidos no processo. Os DPVs, **Fig. 15A**, foram todos registrados em soluções de FLSC $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos, **Tabela 1**.

O pico 1a ocorre em toda a gama de pH investigada, **Figs. 15A e 15B**. No entanto, para $3,5 < \text{pH} < 6,3$, o potencial de pico foi deslocado para valores menos positivos com o aumento do pH, **Fig. 15A**, indicando a existência de um equilíbrio ácido-base e que prótons estão envolvidos no processo de oxidação. No gráfico E_{pa} vs. pH, **Fig. 15B**, uma inclinação de $\sim 59 \text{ mV}$ por unidade de pH mostra que o mecanismo associado ao pico 1a envolve um número equivalente de elétrons e prótons. Como a largura do pico à meia altura para o pico 1a é $W_{1/2} \sim 89 \text{ mV}$, pode-

se concluir que esta etapa da reação ocorre com a retirada de um elétron e um próton [8]. Para $\text{pH} > 6,5$, a oxidação no pico 1a era independente do pH, mostrando uma reação anódica envolvendo apenas a transferência de um elétron. Estes resultados permitiram atribuir tal oxidação no pico 1a ao grupo fenólico na posição C6', pKa de FLSC, $\text{pKa} \sim 6.3$ [8], **Fig. 15B**.

Para o pico 2a, a oxidação eletroquímica foi claramente detectada apenas em meio ácido e fisiológico e o potencial de pico foi deslocado para valores menos positivos com o aumento do pH, **Figs. 15A e 15B**. Uma vez que existe uma inclinação de $\sim 59 \text{ mV}$ por unidade de pH, **Fig. 15B** e uma largura de meia altura de $\sim 80 \text{ mV}$ para o pico 2a, pode concluir-se que esta etapa da reação de oxidação envolve a retirada de um par um elétron / próton.

Figura 15. (A) DPVs da oxidação da FLSC $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ vs. pH em 3D (com correção de linha de base), (—) $\text{pH} = 3,56$, (—) $\text{pH} = 4,2$, (—) $\text{pH} = 4,5$, (—) $\text{pH} = 5,0$, (—) $\text{pH} = 6,0$, (—) $\text{pH} = 6,28$, (—) $\text{pH} = 7,0$, (—) $\text{pH} = 7,5$, (—) $\text{pH} = 9,74$, (B) E_{pa} vs. pH, (■) E_{p1a} do pico 1a, (□) E_{p2a} do pico 2a, a inclinação da reta é de 59 mV por pH.



4.1.3. Voltametria de Onda Quadrada

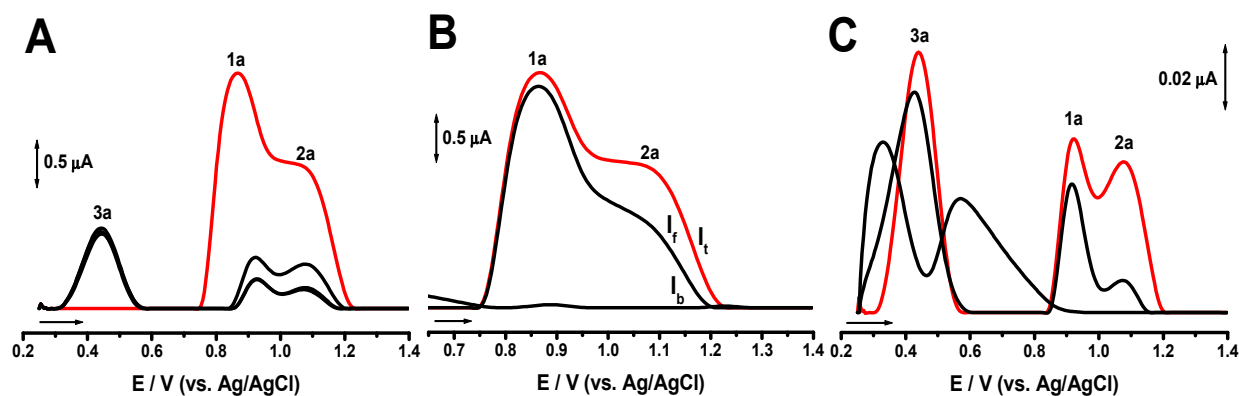
O efeito do pH sobre a oxidação do FLSC também foi investigado usando SWV. Vantagens importantes da SWV em relação à DPV incluem a minimização de problemas com envenenamento da superfície do eletrodo e análise da

reversibilidade eletroquímica da reação de transferência de elétrons executando apenas uma varredura de potencial [8].

O comportamento voltamétrico da FLSC na superfície do GCE foi investigado utilizando SWV, a uma velocidade de varredura efetiva de 50 mV s^{-1} , em eletrólitos com diferentes pHs, **Fig. 16**.

Foram realizados voltamogramas SW sucessivos numa solução FLSC $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato, $\text{pH} = 4,5$. A primeira varredura mostrou características semelhantes aos DPVs, apresentando dois picos de oxidação, pico 1a, em $E_{p1a} = +0,85 \text{ V}$ e pico 2a, em $E_{p2a} = +1,09 \text{ V}$, **Fig. 16A (—)**. A irreversibilidade dos processos de oxidação de FLSC em relação aos picos 1a e 2a foi confirmada através da representação gráfica das componentes direta (I_f) e reversa (I_b) obtidas a partir da corrente total (I_t), **Fig. 16B**. A segunda varredura mostrou a ocorrência de um novo e reversível pico de oxidação 3a, em $E_{p3a} = +0,45 \text{ V}$, correspondente a um produto de oxidação reversível de FLSC, **Figs. 16A e 16C**.

Figura 16. SWVs (com correção da linha de base) de FLSC $50 \mu\text{mol L}^{-1}$: **(A)** varreduras sucessivas em tampão de acetato, $\text{pH} = 4,5$, (—) primeira varredura, **(B)** primeira e **(C)** segunda varredura; I_t – total, I_f – forward e I_b – backward, $v_{\text{efetivo}} = 50 \text{ mV s}^{-1}$



SWVs sucessivos numa solução FLSC $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ foram realizados também em tampão fosfato, $\text{pH} = 7,0$, e o primeiro voltamograma apresentou características semelhantes aos DPVs, apresentando dois picos de oxidação, pico 1a, em $E_{p1a} = +0,77 \text{ V}$ e pico 2a, em $E_{p2a} = +0,94 \text{ V}$. No entanto, nenhum produto de eletrooxidação eletroativo foi detectado a partir dos SWVs sucessivos.

Em tampão borato, pH = 9,0, também foram realizados SWVs sucessivos em solução de FLSC de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ e apenas um único pico anódico irreversível foi detectado na primeira varredura, em concordância com os resultados de CV e DPV.

As experiências acima foram repetidas numa solução de FLSC $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ e, quando comparadas com os resultados de uma solução de FLSC $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ em meio ácido e neutro, apresentaram características semelhantes, onde foram detectados dois picos anódicos e, nos SWVs sucessivos, o pico 3a do produto de oxidação foi novamente observado apenas em meio ácido. Contudo, em meio alcalino não foi detectado nenhum pico de oxidação.

4.2. Mecanismo de Oxidação da FLSC

Com base nos dados de CV, DPV e SWV, além da estrutura da FLSC e suas propriedades químicas [17-23], um mecanismo de oxidação da FLSC foi proposto. A reação de oxidação ocorre em duas etapas. Na primeira etapa, um elétron e um próton são removidos do grupo fenólico na posição C6' e, no segundo passo, um elétron e um próton são removidos do grupo fenólico na posição C3' da molécula FLSC, **Fig. 17**.

A eletroxidação de grupos fenóis envolve a formação de um radical fenoxi que pode iniciar a polimerização, levando a produtos adsorvidos na superfície do eletrodo [82-85], e/ou pode por outra via de reação ser oxidado a uma quinona, que é reversivelmente reduzida [82-85]. Na redução eletroquímica dos pares redox de *orto*-quinona / catecol e *para*-quinona / hidroquinona na superfície de carbono, o potencial de redução eletroquímica da *para*-quinona é próximo de 0,0 V, enquanto potencial de redução da *orto*-quinona ocorre em valores de potenciais positivos variando entre 0,30 V e 0,60 V [85]. Conseqüentemente, o produto de oxidação da FLSC, pico 3a, a $E_{p3a} = + 0,40 \text{ V}$, detectado em meio ácido, corresponde a um derivado de quinona que é reversivelmente reduzido para formar um derivado de catecol. No entanto, o acoplamento de radical fenoxi para formar produtos poliméricos pode corresponder ao principal produto de reação em meio fisiológicos e alcalinos, uma vez que não se observa nenhum produto eletroativo por voltametria CV, DP e SW nestes intervalos de pH.

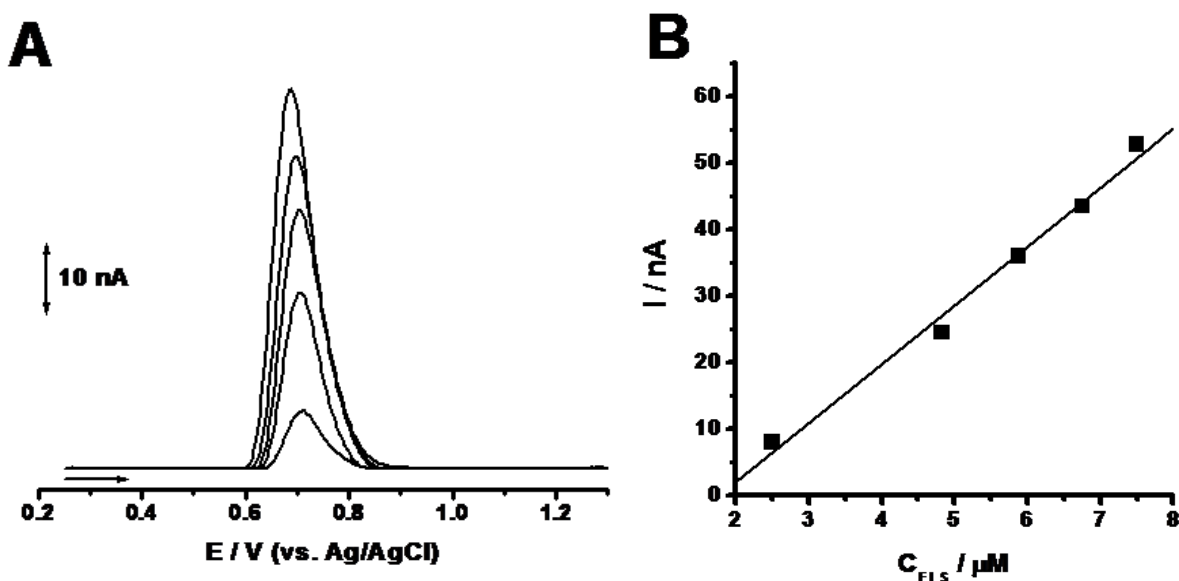
Figura 17. Mecanismo de oxidação proposto para a FLSC.

4.3. Determinação Eletroanalítica da Fluoresceína

A voltametria de DP pode ser utilizada para obter uma quantificação sensível da FLSC. Em condições otimizadas, foi possível obter melhores sinais eletroanalíticos em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,0$. Os DPVs foram registrados em soluções com diferentes concentrações de FLSC e a variação da corrente do pico anódico 1a referente à oxidação da FLSC foi utilizado como o sinal

eletroanalítico, **Fig. 18A**. Devido à forte adsorção dos produtos de oxidação da FLSC na superfície do GCE e para assegurar a linearidade da curva analítica (I_{p1a} vs. C_{FLSC}) e a reprodutibilidade do procedimento, a superfície do GCE foi sempre limpa entre cada medida.

Figura 18. (A) DPVs (com correção de linha de base) para FLSC em concentrações crescentes e **(B)** Curva analítica ($I_{p1a} (FLSC) = -0,72 (\pm 0,46) + 0,28 (\pm 0,01) [FLSC]$) de FLSC. [Tampão fosfato] = $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 7,2; (a) 2,5, (b) 5,0, (c) 6,0, (d) 7,0 e (e) $8,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, $V_{\text{efectivo}} = 5 \text{ mV s}^{-1}$.



A curva analítica correspondente, **Fig. 18B**, mostra que existe uma relação linear $I_{p1a} (A) = 0,01 [FLSC / \mu\text{M}] - 1,58 \times 10^{-8}$ onde $r = 0,994$, $n = 5$, $SD = 2,13 \text{ nmol L}^{-1}$, na faixa de concentrações de $2,0 - 8,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Em condições otimizadas, o limite de detecção foi calculado como $0,64 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($3 \sigma / S$, onde σ é o desvio padrão do sinal em branco e S , a sensibilidade) e o limite de quantificação como $2,13 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($10 \sigma / S$).

Capítulo 5

Raltitrexato: Mecanismo de oxidação e interação com o dsDNA

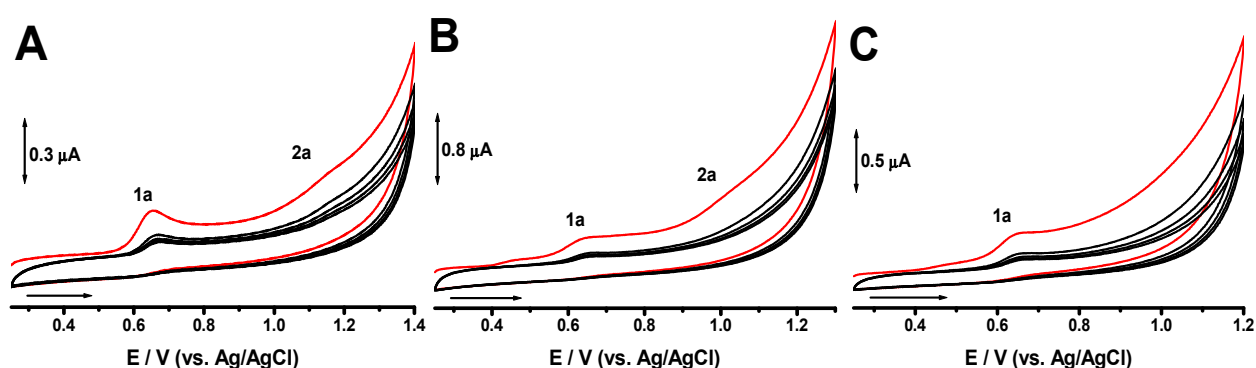
5.1. Oxidação do Raltitrexato

5.1.1. Voltametria Cíclica

A oxidação de RTX num GCE foi primeiramente investigada por CV a uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Os CVs sucessivos obtidos numa solução recém preparada de RTX $105 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato, $\text{pH} = 4,5$, **Fig. 19A**, mostraram dois picos de oxidação consecutivos, pico 1a, em $E_{p1a} = + 0,65 \text{ V}$ e pico 2a em $E_{p2a} = + 1,15 \text{ V}$. Em tampão fosfato, $\text{pH} = 7,0$, **Fig. 19B**, também foram detectados dois picos anódicos consecutivos: pico 1a, em $E_{p1a} = + 0,64 \text{ V}$ e o pico 2a, em $E_{p2a} = + 1,03 \text{ V}$. Enquanto que em tampão borato, $\text{pH} = 9,3$, **Fig. 19C**, foi detectado apenas um pico de oxidação: pico 1a em $E_{p1a} = + 0,65 \text{ V}$. Em todos os pHs, na varredura reversa na direção catódica, não foram detectados picos, demonstrando que todos os processos de oxidação são irreversíveis.

Nas varreduras sucessivas para todos os pHs pode ser observada uma diminuição das correntes dos picos devido a uma possível adsorção de produtos eletroativos de oxidação do RTX na superfície GCE, **Fig. 19**. Os dois picos anódicos detectados estão associados à oxidação do grupo amina na posição N10' e do carbono na posição C9' da molécula do RTX, **Fig. 2**.

Figura 19. CVs sucessivos obtidos em solução de RTX $105 \mu\text{mol L}^{-1}$ em (A) tampão acetato, $\text{pH} = 4,5$, (B) tampão fosfato, $\text{pH} = 7,0$, (C) tampão borato, $\text{pH} = 9,3$, (—) primeira varredura.



O efeito da influência da velocidade de varredura para a RTX $105 \mu\text{mol L}^{-1}$ no GCE foi investigada por CV em tampão fosfato, $\text{pH} = 7,0$. Os CVs foram registrados para diferentes velocidades de varredura entre 5 e 200 mV s^{-1} . A superfície do GCE foi sempre limpa entre cada medida voltamétrica para evitar adsorção de produtos de oxidação do RTX na superfície do GCE. Com o aumento das velocidades de

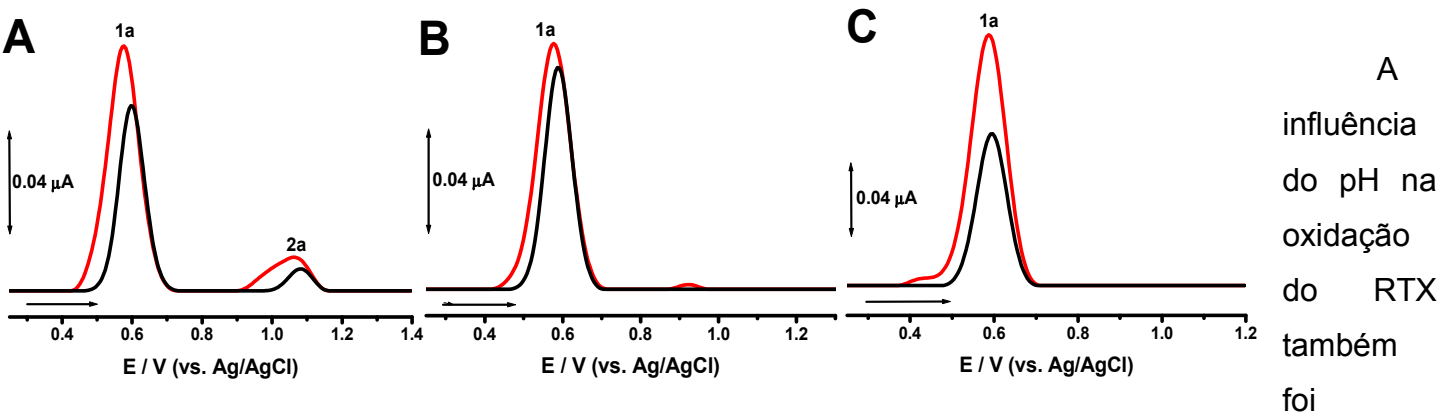
varredura, as correntes dos picos aumentaram linearmente em relação à raiz quadrada da velocidade, indicando um processo de transporte de massa predominantemente controlado por difusão [8,10].

5.1.2. Voltametria de Pulso Diferencial

A influência do pH sobre a oxidação de RTX foi investigada através da DPV. Considerando que pela teoria eletroquímica da DPV é possível estabelecer o número de elétrons e prótons do processo anódico/catódico investigado [8,75,80].

Realizaram-se DPVs sucessivos numa solução de RTX $105 \mu\text{mol L}^{-1}$ recém preparada em tampão de acetato, pH = 4,5, em tampão de fosfato, pH = 7,0 e tampão de borato, pH = 9,7, **Fig. 20**. Os voltamogramas em meio ácido mostraram que a oxidação do RTX ocorre em dois processos anódicos consecutivos, pico 1a e 2a, **Fig. 20A**, enquanto que em meio fisiológico e alcalino ocorre apenas em uma única etapa de oxidação, pico 1a, **Figs. 20B e 20C**. Assim, é demonstrado que a oxidação do RTX é significativamente afetada pelo pH, **Figs. 20A, 20B e 20C**.

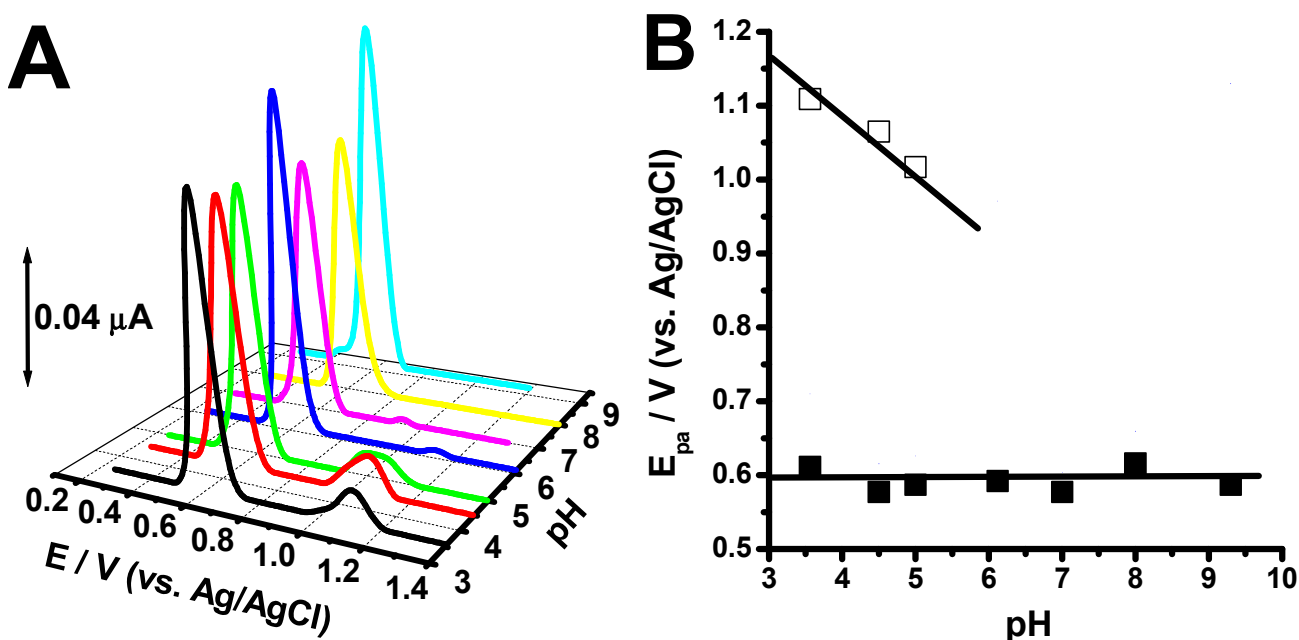
Figura 20. DPVs sucessivos (com correção de linha de base) obtidos em soluções de RTX $105 \mu\text{mol L}^{-1}$ em: **(A)** tampão de acetato, pH = 4,5, **(B)** tampão fosfato, pH = 7,0 e **(C)** tampão borato, pH = 9,7, (—) primeira varredura, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.



investigada por voltametria DP em um amplo intervalo de pH, entre 3,56 e 9,0, com o objetivo de estabelecer o número de elétrons e prótons envolvidos nos processos anódicos. Os DPVs, **Fig. 21A**, foram todos registrados em soluções de RTX $105 \mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos suporte, **Tabela 1**. Foi observado que o primeiro processo de oxidação do RTX, pico 1a, é independente do pH, enquanto o segundo processo, pico 2a, o seu potencial de oxidação se desloca para valores mais negativos com o aumento do pH, **Fig. 21B**.

O número de elétrons para cada processo de oxidação foi determinado utilizando-se a teoria da DPV, onde, para pequenas amplitudes de pulso, a largura a meia altura $W_{1/2}$ do pico de corrente é inversamente proporcional ao número de elétrons transferidos ($W_{1/2} = 90/n$), o que permite caracterizar o mecanismo de reação de transferência de carga. O potencial do pico 1a é independente do pH, **Figs. 21A e 21B**, e considerando a sua largura de pico para meia altura de ~ 95 mV ocorre com a transferência de um elétron que está associado com a oxidação do grupo amina na posição N10' da molécula do RTX, **Fig. 2**. Enquanto que para o pico 2a a reação de oxidação envolve a transferência de um elétron e um próton, uma vez que há uma inclinação de ~ 59 mV por unidade de pH, **Fig. 21B**, e uma largura de pico para meia altura de ~ 95 mV [8,77]. O processo anódico do pico 2a é associado com a oxidação do carbono na posição C9' da molécula do RTX, **Fig. 2**.

Figura 21. (A) DPVs da oxidação do RTX $105 \mu\text{mol L}^{-1}$ vs. pH em 3D (com correção de linha de base), (—) pH = 3,56, (—) pH = 4,5, (—) pH = 5,0, (—) pH = 6,0, (—) pH = 7,0, (—) pH = 8,0, (—) pH = 9,0, (B) Gráfico do E_{pa} vs. pH, (\square) E_{p1a} do pico 1a, (\blacksquare) E_{p2a} do pico 2a.

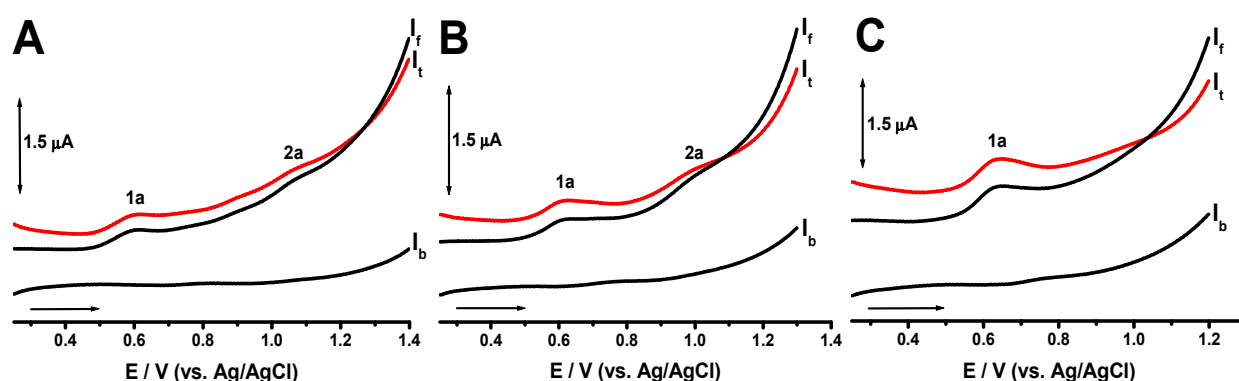


5.1.3. Voltametria de Onda Quadrada

O efeito do pH sobre a oxidação do RTX também foi investigado usando SWV, em diferentes eletrólitos suporte com diferentes valores de pHs, **Fig. 22**.

Os voltamogramas SW registrados em soluções de RTX $70 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato, pH = 4,5, em tampão fosfato, pH = 7,0 e tampão borato, pH = 9,7, **Fig. 22**, mostraram características semelhantes aos CVs, **Fig. 19**, exibindo dois picos de oxidação no meio ácido e fisiológico e um pico de oxidação no meio alcalino. A irreversibilidade dos processos de oxidação do RTX em relação aos picos 1a e 2a foi confirmada pela representação gráfica das componentes direta e reversa obtidas a partir da corrente total. Considerando que a componente direta mostrou os picos de oxidação com correntes semelhantes aquelas registradas pelo voltamograma SW total, enquanto, como esperado, a componente reversa não apresentou nenhum pico catódico.

Figura 22. SWVs obtidos em solução de RTX $70 \mu\text{mol L}^{-1}$ em **(A)** tampão acetato, pH = 4,5; **(B)** tampão fosfato, pH = 7,0 e **(C)** tampão borato, pH = 9,3, I_t – total, I_f – forward e I_b – backward.



5.2. Mecanismo de Oxidação do RTX

Com base nos dados das técnicas voltamétricas de CV, DPV e SWV, da estrutura e das propriedades químicas do RTX [44,54,82-87] e considerando a eletroxidação de moléculas semelhantes como o metotrexato [42] e o ácido fólico [88-90] foi proposto um mecanismo para a oxidação do RTX. A reação de oxidação ocorre em duas etapas sucessivas, **Fig. 23**. Na primeira etapa, um elétron é removido no grupo N-metil da amina terciária na posição N10', enquanto no segundo passo de oxidação, um elétron e um próton são removidos do C9' da molécula de RTX, **Fig. 23**.

Figura 23. Mecanismo de oxidação proposto para o RTX.

5.3. Investigação da Interação RTX-dsDNA Usando um Biossensor Eletroquímico de dsDNA

Depois de ter sido estudado o comportamento de oxidação do RTX por DPV, onde foi observado em meio fisiológico apenas um pico anódico ($E_{p1a} = + 0,551 \text{ V}$), iniciou-se o estudo da interação RTX–DNA. Para a realização desse estudo foram confeccionados biossensores eletroquímicos de dsDNA multicamada, a partir do procedimento descrito abaixo:

Biossensor de dsDNA multicamada: Foi preparado pela cobertura camada por camada do GCE ($\phi = 2,0 \text{ mm}$) com seis gotas sucessivas (duas gotas para cada camada) de uma solução de dsDNA $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Entre cada gota adicionada, a superfície do eletrodo foi secada sob um fluxo constante de nitrogênio

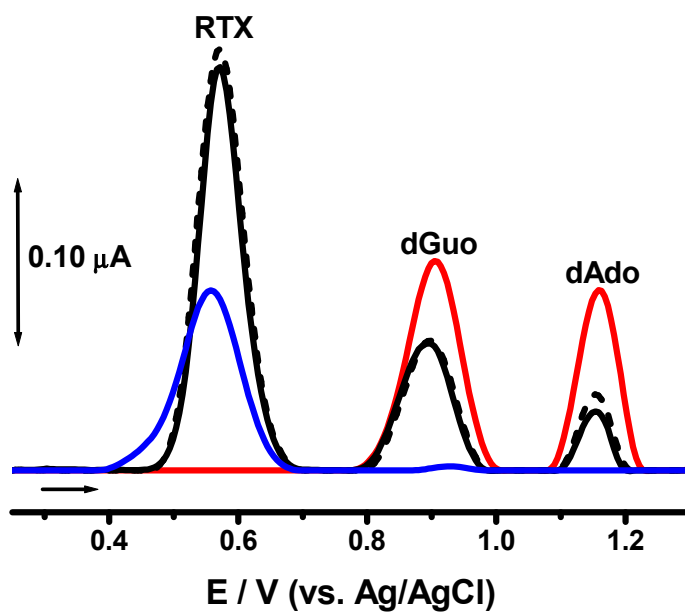
Para o biossensor eletroquímico de dsDNA controle o DPV registrado em meio fisiológico ($\text{pH} = 7,0$) demonstrou, como esperado, dois picos de oxidação bem definidos e separados. O primeiro pico está associado à oxidação de resíduos da desoxiguanosina (dGuo), a $E_p = + 0,90 \text{ V}$ enquanto o segundo pico é devido à oxidação dos resíduos da desoxiadenosina (dAdo), a $E_p = + 1,16 \text{ V}$, **Fig. 24 (—)**. Pode-se observar uma baixa intensidade de corrente em (nA), devido a estrutura de dupla hélice do dsDNA, a qual dificulta a transferência de carga das espécies eletroativas com a superfície do eletrodo.

Para certificar a reprodutibilidade dos biossensores eletroquímicos de dsDNA, vários biossensores foram confeccionados em diferentes períodos de tempo (intra-dia e inter-dias) e posteriormente investigados por DPV. Todos os biossensores apresentaram apenas dois picos anódicos característicos do dsDNA e quando comparados foi observado apenas pequenas variações de corrente. Isso demonstra claramente a reprodutibilidade desses biossensores, em concordância com a literatura [6].

A interação RTX–DNA foi estudada utilizando o biossensor eletroquímico de dsDNA multicamada. Biossensores de dsDNA foram confeccionados e posteriormente incubados na solução de RTX $105 \mu\text{mol L}^{-1}$ por diferentes períodos de tempo (24 e 72 horas). Posteriormente a incubação, o biossensor foi transferido para uma solução tampão pH = 7,0 onde foi realizada a varredura de pulso diferencial na faixa de potencial de 0,25 V a 1,3 V, **Fig. 24**.

A partir dos DPVs controle pode-se observar que foram detectados os dois picos característicos do dsDNA, **Fig. 24 (—)**, como também o pico característico do RTX, **Fig. 24 (—)**. A partir dos DPVs registrados para os biossensores incubados na solução de RTX $105 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 24, **Fig. 24 (—)** e 72 horas, **Fig. 24 (□□□)**, foi detectado um pico de corrente no potencial de 0,55 V, o qual foi associado à eletroxidação do RTX pré-concentrado na superfície do biossensor. Também foi detectada uma diminuição das correntes dos picos associados com a eletroxidação do dsDNA, o pico da dGuo em $E_{pa} = 0,90 \text{ V}$ e o pico anódico da dAdo, $E_{pa} = 1,16 \text{ V}$, quando comparados ao biossensor controle, **Fig. 24**. Esses resultados demonstraram claramente uma interação do RTX com moléculas de dsDNA, possivelmente associada a uma mudança conformacional da estrutura do dsDNA devido uma interação eletrostática e/ou uma intercalação do RTX com o dsDNA. Todavia nenhuma dano oxidativo na molécula do dsDNA foi detectado nas condições experimentais investigadas.

Figura 24. DPVs (com linha de base corrigida) em pH = 7: do biossensor de dsDNA multicamada controle (—); RTX $105 \mu\text{mol L}^{-1}$ (—); do biossensor de dsDNA: incubado na solução de RTX $105 \mu\text{mol L}^{-1}$ por: 24 horas (—) e por 72 horas (□□□).



Capítulo 6

Procarbazona: Mecanismo de oxidação e interação com o dsDNA

6.1. Oxidação da Procarbazona

6.1.1. Voltametria Cíclica

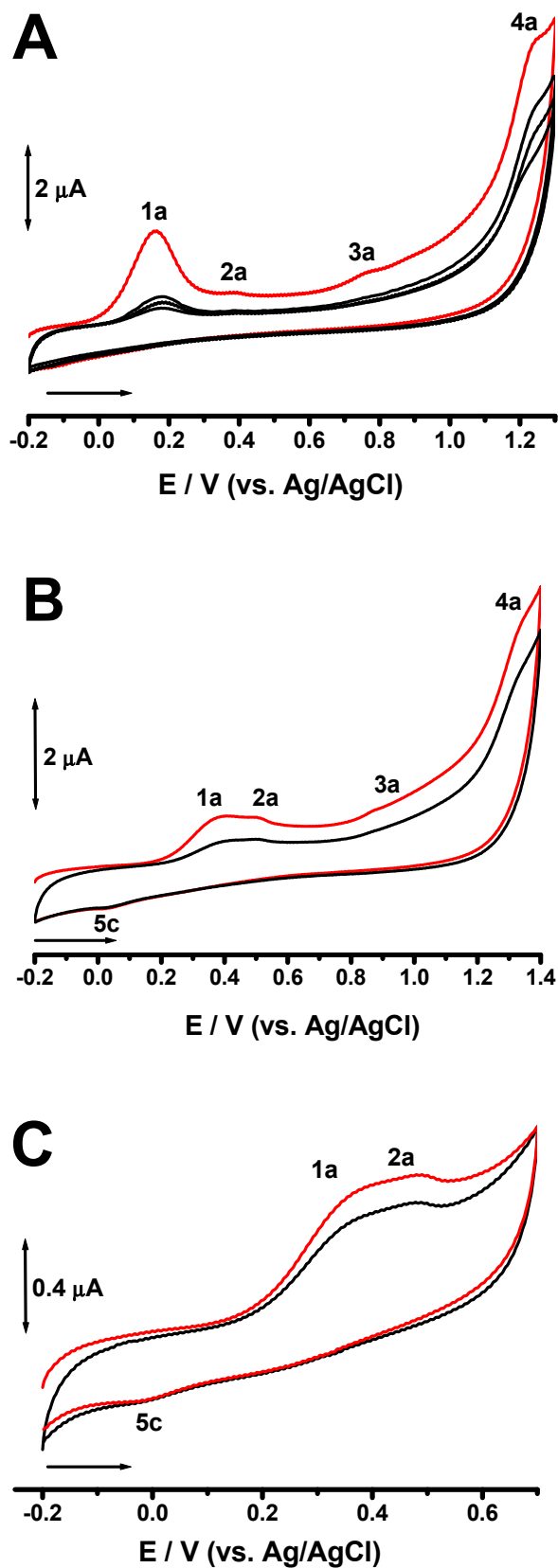
A oxidação de PCZ num GCE foi estudada por CV a uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} em tampão fosfato, $\text{pH} = 7,0$, **Fig. 25A**. Os CVs sucessivos, obtidos numa solução de PCZ $150 \mu\text{mol L}^{-1}$, mostraram quatro picos de oxidação consecutivos, pico 1a em $E_{p1a} = +0,16 \text{ V}$, pico 2a em $E_{p2a} = +0,38 \text{ V}$, pico 3a em $E_{p3a} = +0,76 \text{ V}$ e pico 4a em $E_{p4a} = +1,24 \text{ V}$. Na varredura de potencial na direção reversa (catódica) não foram detectados picos, demonstrando que todos os processos de oxidação são irreversíveis neste pH . Na segunda varredura pode ser observada uma diminuição significativa das correntes dos picos 1a e 4a, enquanto os dois picos anódicos 2a e 3a desaparecem, devido à forte adsorção de produtos de oxidação da PCZ na superfície do GCE.

Os CV foram também registrados numa solução recém preparada de PCZ $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato, $\text{pH} = 4,5$, **Fig. 25B**. Quatro picos de oxidação consecutivos: pico 1a em $E_{p1a} = +0,38 \text{ V}$, pico 2a em $E_{p2a} = +0,49 \text{ V}$, pico 3a em $E_{p3a} = +0,87 \text{ V}$ e pico 4a em $E_{p4a} = +1,33 \text{ V}$ foram detectados neste pH . No entanto, os picos anódicos, 1a e 2a, não estão completamente separados e na varredura reversa é observado um pequeno pico de redução, pico 5c em $E_{p5c} = +0,03 \text{ V}$.

Numa nova experiência com um eletrodo limpo, um CV foi executado e a inversão da direção da varredura de potencial foi realizada antes de atingir o pico 3a, o qual o pico de redução 5c foi detectado, **Fig. 25C**. Consequentemente, o pico catódico 5c foi atribuído a produtos de oxidação da PCZ produzidos nos processos de oxidação associados ao pico 1a e/ou 2a. Como será demonstrado mais adiante, este pico catódico está associado com a redução do produto eletroativo obtido após a segunda etapa de oxidação, já que em meio ácido este processo é mais estável, hidrolizando apenas parcialmente e permitindo sua eletrorredução na superfície GCE.

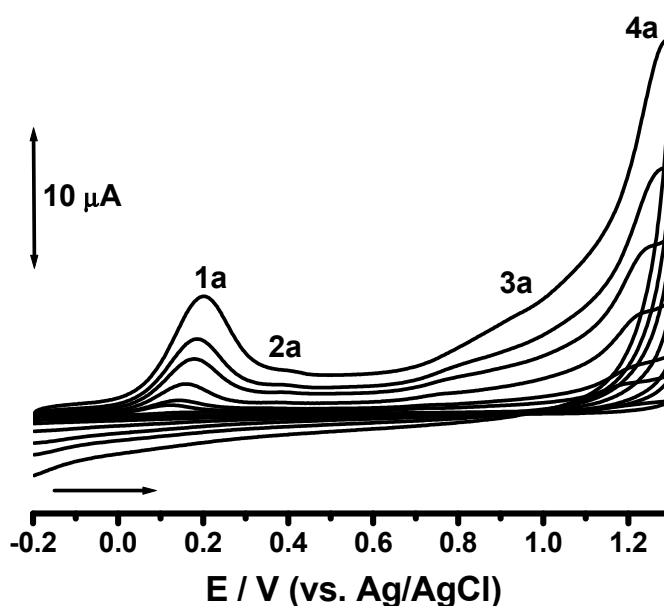
Voltamogramas cíclicos também foram efetuados em numa solução de PCZ $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão borato, $\text{pH} = 9,2$, entretanto nenhum processo de oxidação foi detectado.

Figura 25. CVs obtidos numa solução recém preparada de PCZ $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ em: **(A)** tampão fosfato, pH = 7, **(B-C)** tampão acetato, pH = 4,5, (—) primeira varredura, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.



O efeito da influência da velocidade de varredura para a PCZ $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ no GCE foi investigado por CV em tampão fosfato, $\text{pH} = 7,0$. Os CVs foram registrados para diferentes velocidades de varredura entre 10 e 500 mV s^{-1} , **Fig. 26**. Com o aumento da velocidade de varredura, o potencial do pico 1a mostrou um pequeno deslocamento de potencial para a direção anódica e as correntes de pico aumentaram linearmente, indicando um processo de transporte de massa controlado predominantemente por adsorção, de acordo com a equação de Laviron [77,91]. Isto é explicado levando em consideração a adsorção da molécula de PCZ na superfície hidrofóbica do GCE.

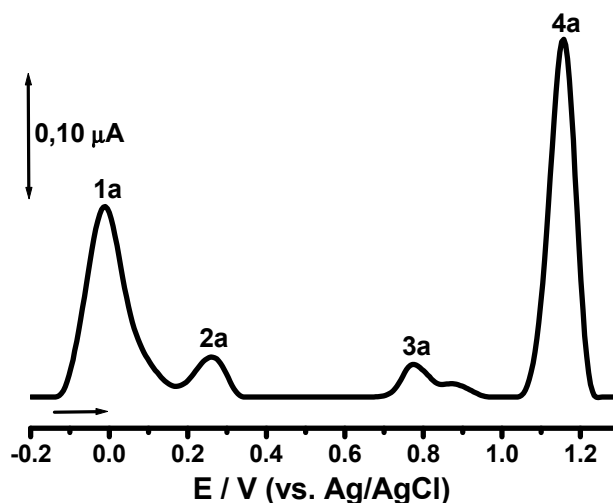
Figura 26. CVs obtidos numa solução recém preparada de PCZ $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato, $\text{pH} = 7$, para diferentes velocidades de varredura ($10, 25, 50, 100, 200, 300, 400$ e 500 mV s^{-1}).



6.1.2. Voltametria de Pulso Diferencial

DPVs foram registrados para uma solução de PCZ $150 \mu\text{mol L}^{-1}$, em tampão fosfato, $\text{pH} = 7,0$, **Fig. 27**, e foram identificados quatro picos anódicos na varredura: pico 1a em $E_{p1a} = -0,01 \text{ V}$, pico 2a em $E_{p2a} = +0,25 \text{ V}$, pico 3a em $E_{p3a} = +0,77 \text{ V}$ e pico 4a em $E_{p4a} = +1,15 \text{ V}$. Mas, durante uma segunda varredura, apenas o pico 1a e 4a foram observados. Todos os resultados de DPV estão em concordância com os resultados da CV, seção 6.1.1.

Figura 27. DPV obtido numa solução recém preparada de PCZ $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato, pH = 7, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.



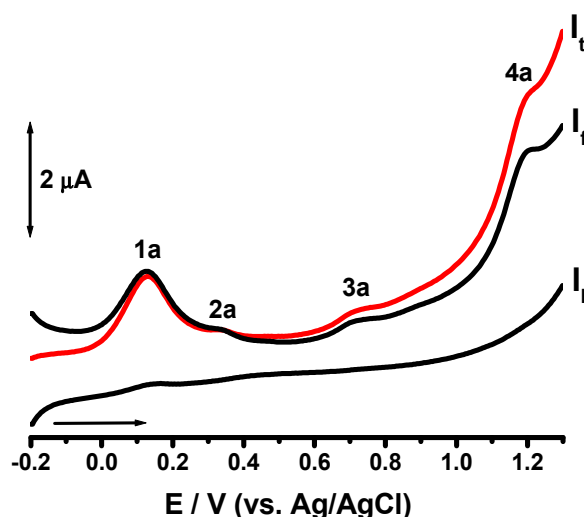
A influência do pH na oxidação da PCZ também foi investigada por DPV em um intervalo de pH, entre 3,0 e 12,0, com o intuito de estabelecer a quantidade de prótons e elétrons envolvidos no processo. Uma solução de PCZ $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi utilizada. A partir de valores das inclinações das retas para cada processo de oxidação e dos cálculos da largura e meia altura dos picos foi possível verificar que os processos de oxidação referentes aos picos 1a, 2a e 3a envolvem a transferência de um elétron e um próton, enquanto que para o pico 4a o processo de oxidação é independente do pH e envolve apenas a transferência de um elétron.

6.1.3 Voltametria de Onda Quadrada

Ensaio utilizando a técnica de SWV também foram realizados. Os eletrólitos suporte usados foram: tampão acetato, pH = 4,5; tampão fosfato, pH = 7,0; e tampão borato, pH = 9,2. Os SWVs registrados em soluções recém preparadas de PCZ $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos (tampão acetato e fosfato) demonstraram características semelhantes aos DPVs. Além disso, a irreversibilidade de todos os processos de oxidação da PCZ, picos 1a, 2a, 3a e 4a, foi confirmada no SWV registrado no meio fisiológico, pH = 7,0, **Fig. 28**, através da representação das curvas das componentes da corrente direta e reversa obtidas a partir da corrente total de varredura, **Fig. 28**.

No meio alcalino como esperado nenhum processo de eletrooxidação para a PCZ foi identificando, confirmando os resultados de CV e DPV obtidos nas seções anteriores.

Figura 28. SWV obtido numa solução recém preparada de PCZ $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato, pH = 7, I_t – total, I_f – forward e I_b – backward, $v_{\text{efetivo}} = 5 \text{ mV s}^{-1}$



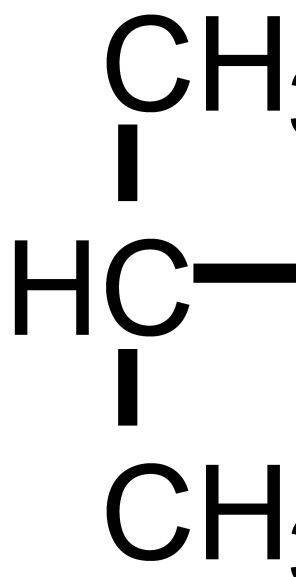
6.2. Mecanismo de Oxidação da PCZ

Com base de resultados prévios da literatura sobre o metabolismo e a oxidação química da PCZ envolvendo outras técnicas [58-63], dos resultados eletroquímicos apresentados de CV, DPV e SWV e levando em consideração a estrutura e as propriedades químicas da PCZ um mecanismo de oxidação da PCZ foi postulado e proposto, **Fig. 29**. O comportamento anódico da PCZ ocorre em quatro etapas de oxidação. As três primeiras etapas envolvem a transferência de um elétron e um próton, relacionadas aos picos 1a, 2a e 3a. A última etapa de oxidação envolve apenas um elétron, relacionado ao pico 4a, **Fig. 29**.

Na primeira e segunda etapa, pico 1a e 2a, os processos de oxidação ocorrem no grupo hidrazina com a produção da azo-procarbазina [62,83], o qual sofre isomerização em hidrazo-procarbазina e hidrólise gerando o benzaldeído-procarbазina, **Fig. 29**. Em tampão acetato, pH = 4,5 foi detectado um produto eletroativo, pico 5c, associado à eletrorredução do azo-procarbазina, uma vez que em meio ácido é mais estável, hidrolisando apenas parcialmente e permitindo a sua redução na superfície GCE. Considerando os resultados eletroquímicos e que a

isomerização de derivados azo para hidrazina e, após a hidrólise, para aldeído são favoráveis em meios aquosos [62,92-94], os terceiro e quarto passos, os picos 3a e 4a, estão associados com a oxidação do benzaldeído-procarbazina com a produção do ácido N-isopropiltereftálico, **Fig. 29**.

Figura 29. Mecanismo de oxidação proposto para a PCZ.

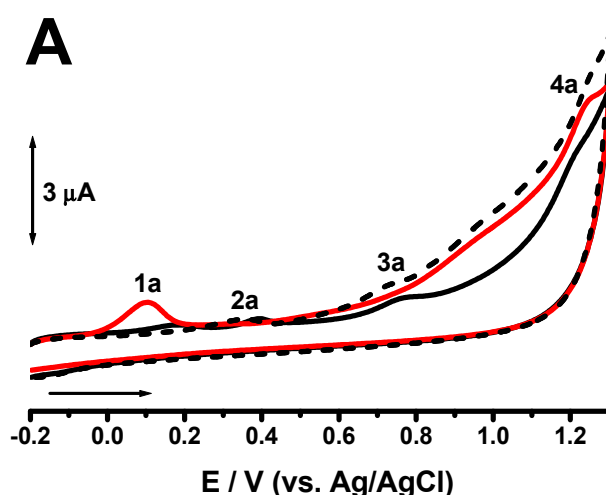


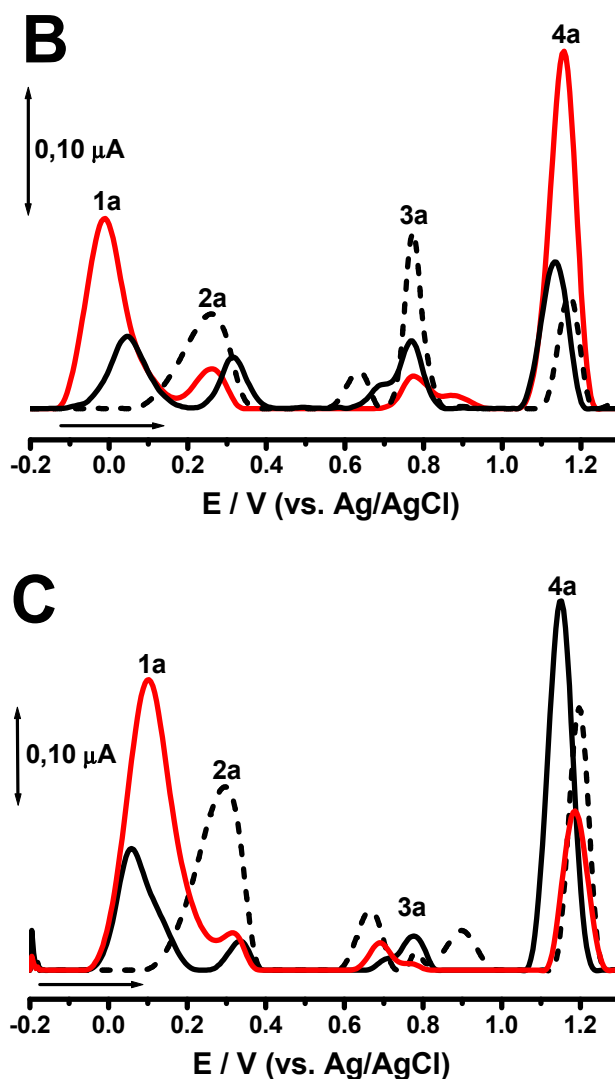
6.3. Estudo da Degradação Química da PCZ e da Interação PCZ-dsDNA Usando Técnicas Voltamétricas e Biossensores Eletroquímicos de dsDNA

A degradação química da PCZ foi investigada inicialmente a partir de soluções de PCZ $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ incubadas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7$ por diferentes períodos de tempo usando CV, DPV e SWV, **Fig. 30**. Após as varreduras iniciais, de 0 h, a solução de PCZ foi incubada sob proteção de luz até a realização das demais varreduras registradas após 48 e 72 h.

A partir dos voltamogramas de CV, SWV e DPV obtidos numa solução de PCZ recém preparada foram detectados, como esperados, os quatro pico característicos da eletroxidação da PCZ, **Fig. 30 (—)**. Posteriormente novos voltamogramas foram registrados nas soluções de PCZ incubadas durante 48 e 72 horas. Nos voltamogramas obtidos após 48 horas de incubação foi detectado a diminuição da intensidade de corrente dos picos anódicos 1a e 4a e o aumento da intensidade de corrente para os picos 2a e 3a, **Fig. 30 (—)**. Após 72 h de incubação foi observado o desaparecimento do pico anódico 1a, o aumento da intensidade de corrente dos picos 2a e 3a e uma diminuição significativa da intensidade de corrente do pico 4a, **Fig. 31 (□□□)**. Essa mudança do perfil voltamétrico da molécula comprova que houve uma degradação química da PCZ com o tempo.

Figura 30. Voltamogramas (A)CV, (B) DPV e (C) SWV da PCZ $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato, $\text{pH} = 7$, incubada por: (—) 0 h; (—) 48 h; (□□□) 72 h.

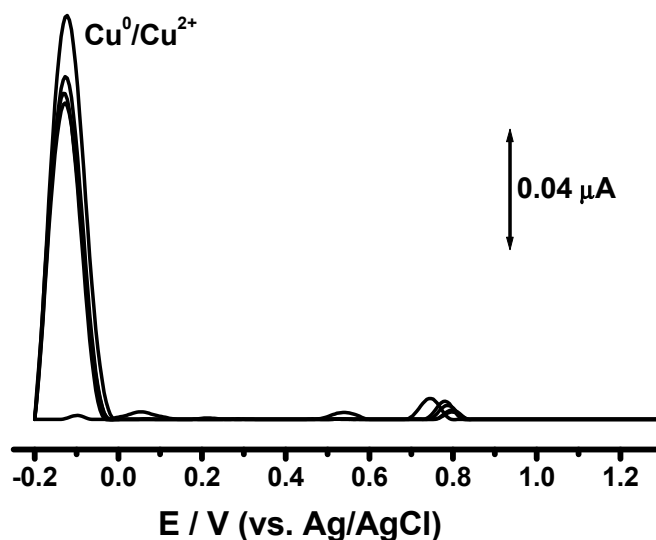




Uma vez que está descrito na literatura danos produzidos ao DNA pela PCZ na presença de íons de Cu^{2+} [95], foi realizado um estudo eletroquímico do sistema PCZ- Cu^{2+} em solução, para posteriormente possibilitar a investigação da interação DNA-PCZ- Cu^{2+} .

Antes da evolução da degradação química da PCZ- Cu^{2+} , foi investigado o comportamento eletroquímico do Cu^{2+} $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, em tampão fosfato, pH = 7,0. Varreduras sucessivas foram registradas na direção anódica, **Fig. 31**. A partir dos DPVs foi detectada a existência de apenas um pico anódico, a $E_{pa} = -0,12 \text{ V}$, correspondente à oxidação do Cu^0 para Cu^{2+} , considerando que quando aplicado potenciais com valores negativos no início da DPV ocorre a redução eletroquímica na superfície do GCE do Cu^{2+} a Cu^0 .

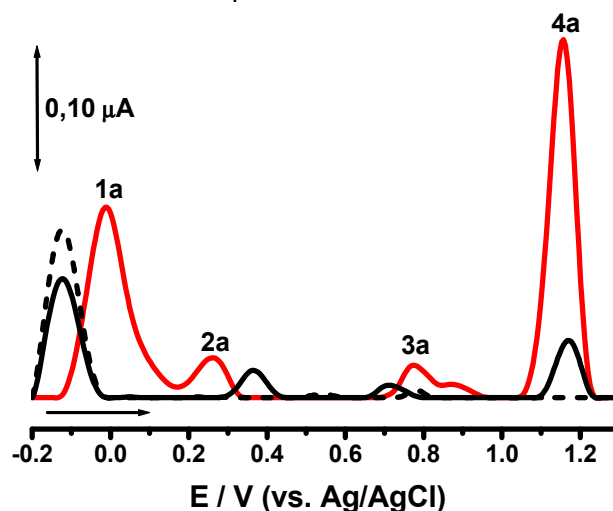
Figura 31. DPVs sucessivos (com correção de linha de base) obtidos numa solução de Cu^{2+} $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato, pH = 7.



Após compreender o comportamento eletroquímico do cobre (II) foi realizado um estudo da interação $\text{PCZ}-\text{Cu}^{2+}$ a fim de investigar o efeito do Cu^{2+} na oxidação da PCZ, assim como para posteriormente interagir $\text{DNA}-\text{PCZ}-\text{Cu}^{2+}$ e verificar possíveis danos oxidativos no DNA.

O DPV obtido numa amostra de $\text{PCZ}-\text{Cu}^{2+}$, ambos com $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, incubada durante 10 min mostrou diferenças em relação aos resultados de controle das soluções de PCZ $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ e Cu^{2+} $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, **Fig. 32**. O voltamograma para amostra de $\text{PCZ}-\text{Cu}^{2+}$ detectou quatro picos anódicos, o primeiro pico foi associado a eletroxidação do Cu^0 a Cu^{2+} , entretanto com uma menor intensidade de corrente quando comparado aos resultados de controle do Cu^{2+} , **Fig. 32** (□□□) e os demais picos foram associados aos picos de eletroxidação da PCZ, 2a, 3a, e 4a, que quando comparados ao voltamograma de controle da PCZ, **Fig. 32** (—), foram todos detectados com baixas correntes de pico, **Fig. 32** (—). Esses resultados demonstraram claramente uma interação do Cu^{2+} com a PCZ, em concordância com resultados obtidos anteriormente a partir de outras técnicas analíticas [95].

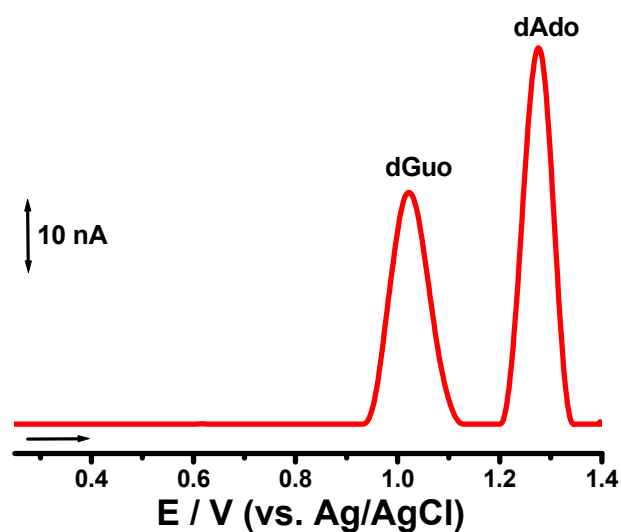
Figura 32. Voltamogramas de DP (com correção de linha de base) em tampão fosfato, pH = 7 para: (—) PCZ 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (□□□) Cu^{2+} 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (—) PCZ- Cu^{2+} ambos com 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$.



Um estudo da interação do DNA-PCZ e do DNA-PCZ- Cu^{2+} foi realizado utilizando biossensores eletroquímicos de DNA multicamada que foram confeccionados, seguindo o procedimento da seção 1.5 e o abaixo:

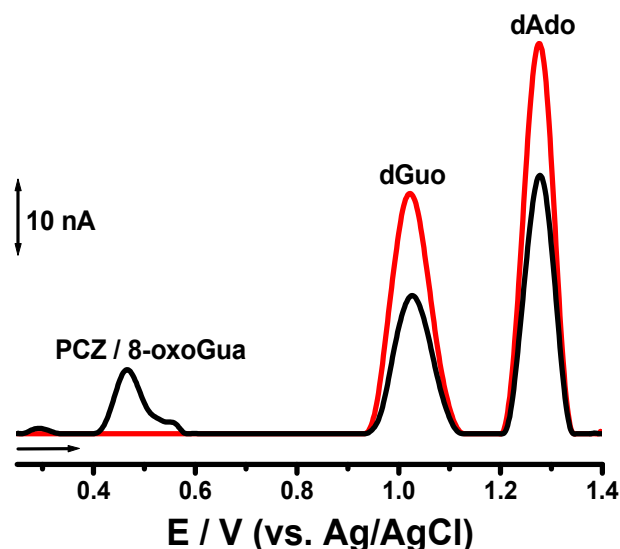
Biossensor de dsDNA multicamada: Foi preparado pela cobertura camada por camada do GCE com três gotas sucessivas de uma solução de dsDNA 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Entre cada gota adicionada, a superfície do eletrodo foi secada sob um fluxo constante de nitrogênio, **Fig. 33**.

Figura 33. DPV (com correção de linha de base) do biossensor de dsDNA multicamada em tampão acetato, pH = 4,5.



A interação DNA-PCZ foi estudada utilizando biossensores eletroquímicos de DNA multicamada, **Fig. 34**.

Figura 34. DPV (com correção de linha de base) em tampão acetato, pH = 4,5, (—) do biossensor de dsDNA controle; (—) do biossensor de dsDNA incubado por 1 hora em solução de PCZ 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$.



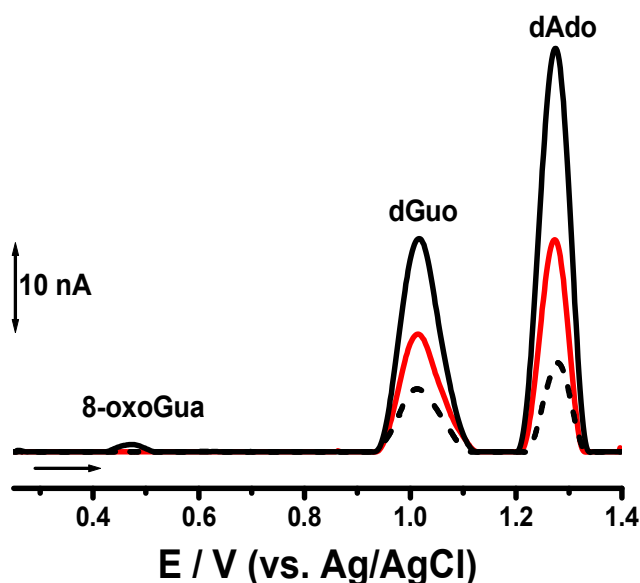
Foi possível observar a diminuição dos picos de oxidação da dGuo e dAdo, **Fig. 34** (—), quando o biossensor foi incubado durante uma hora em solução de PCZ, **Fig. 34** (—). O que comprova que houve uma interação da PCZ com o dsDNA, causando a condensação do dsDNA devido a interação da PCZ com os grupos fosfatos na parte externa da dupla hélice do DNA. Observou-se também o aparecimento de um novo pico que pode estar relacionado a uma possível oxidação da base guanina ou ainda a possíveis resíduos de PCZ presentes na superfície do biossensor.

A interação DNA-PCZ- Cu^{2+} também foi investigada utilizando os biossensores eletroquímicos de DNA multicamada, **Fig. 35**.

Foi possível observar claramente uma interação da PCZ com o dsDNA na presença de íons Cu^{2+} . Ocorreu uma diminuição dos picos de oxidação da dGuo e dAdo, **Fig. 35** (—), quando o biossensor de dsDNA foi incubado em solução de íons Cu^{2+} , **Fig. 35** (□□□), como esperado devido a atração eletrostática entre os íons Cu^{2+} e os grupos fosfatos localizados na parte externa da dupla hélice do DNA, causando uma condensação do dsDNA e dificultando o contato e a transferência eletrônica da molécula do dsDNA na superfície do GCE.

Posteriormente um novo biossensor de dsDNA foi preparado e incubado numa solução de PCZ $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ / Cu^{2+} $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, **Fig. 35 (—)**, e quando comparado ao biossensor controle, **Fig. 35 (—)**, foi claramente observado um aumento da intensidade de corrente dos picos associados a eletroxidação da dGuo e dAdo e o aparecimento de um novo pico associado a 8-oxoGua [6]. O aumento dos picos da dGuo e dAdo está relacionado a quebra da dupla hélice possibilitando um maior contato das bases do DNA com a superfície do GCE, enquanto que o aparecimento do pico da 8-oxoGua demonstra um dano oxidativo no DNA devido uma oxidação da base guanina provocada pela PCZ / Cu^{2+} [6]. Assim foi confirmado a partir do biossensor de DNA multicamada uma forte interação PCZ-DNA e da PCZ-DNA- Cu^{2+} e que a presença de íons Cu^{2+} modifica o modo de interação da PCZ com a molécula de dsDNA.

Figura 35. DPV (com correção de linha de base) em tampão acetato, pH = 4,5 (—) do biossensor de dsDNA controle; (□□□) do biossensor de dsDNA incubado por 1 hora em solução de Cu^{2+} $50 \mu\text{mol L}^{-1}$; (—) do biossensor de dsDNA incubado por 1 hora em solução de PCZ $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ / Cu^{2+} $50 \mu\text{mol L}^{-1}$.



Capítulo 7

Conclusões

Este trabalho investigou o comportamento eletroquímico anódico e os mecanismos de oxidação do biomarcador FLSC e dos fármacos antineoplásicos RTX e PCZ, bem como uma investigação da interação dos fármacos antineoplásicos com o DNA. Para isso foram realizados estudos voltamétricos com GCE, usando as técnicas de CV, DPV e de SWV. O estudo sistemático dos processos de eletrodo envolvidos na oxidação eletroquímica dos vários compostos foi investigado em diferentes eletrólitos suporte.

O estudo eletroquímico mostrou que a FLSC sofre oxidação direta em GCE. A oxidação da FLSC é complexa, dependente do pH e ocorre em duas reações de transferência de carga consecutivas nos grupos fenólicos, na posição C3' e C6', para formar derivados de ortoquinona eletroativos em meio ácido e produtos poliméricos em meio fisiológico ou alcalino, como principais produtos. Ambas as etapas de oxidação envolvem a transferência de um elétron e um próton. Um mecanismo de oxidação para a FLSC foi proposto.

Um método eletroanalítico para quantificação da FLSC foi estabelecido usando DPV em meio fisiológico com um limite de detecção de 0,64 μM e quantificação de 2,13 μM .

O conhecimento do mecanismo de oxidação da FLSC na superfície do GCE certamente será útil na interpretação de dados eletroquímicos de sua intercalação com o DNA e ainda pode oferecer informações adicionais para sua bioquímica molecular.

O RTX sofre eletroxidação irreversível em diferentes etapas, dependendo do pH do meio. Na primeira etapa de oxidação verificou-se que não há participação de prótons. Além disso, foi verificado que o primeiro e o segundo processo de oxidação ocorrem com transferência de um elétron, sendo o primeiro processo associado à oxidação da amina terciária na posição N10' e o segundo à transferência de um elétron e um próton com a oxidação do carbono na posição C9'. Um mecanismo para a oxidação do RTX foi proposto.

Um estudo da interação do RTX com o DNA foi realizado, com o intuito de investigar sua toxicidade, utilizando um biossensor eletroquímico de dsDNA multicamada. Uma interação eletrostática e/ou via intercalação do RTX com o dsDNA foi detectada, confirmada pela constatação de pré-concentração do RTX com o tempo de incubação na superfície do biossensor de dsDNA, bem como a partir da

diminuição das correntes dos picos de eletroxidação do dsDNA. Entretanto nenhum dano oxidativo na molécula do dsDNA foi detectado.

O estudo da PCZ revelou que esta molécula sofre oxidação em meio aquoso dando origem a quatro picos de oxidação. A oxidação da PCZ em meio ácido é um processo irreversível controlado por adsorção, onde a primeira, segunda e a terceira etapa de oxidação são dependentes do pH do meio e todas ocorrem com a transferência de um elétron e um próton, levando à formação de um produto eletroativo. O último processo anódico é independente do pH e ocorre apenas com a transferência de um elétron. Tanto o primeiro quanto o segundo pico estão associados à oxidação do grupo hidrazina, enquanto o terceiro e o último estão associados à oxidação do derivado benzaldeído-procarbazona.

A degradação química da PCZ em meio aquoso foi investigada em diferentes períodos de tempo por CV, SWV e DPV numa ampla faixa de pH e posteriormente foi evoluída a sua interação *in-situ* com o dsDNA utilizando biossensores eletroquímicos de DNA. Verificou-se claramente uma mudança do comportamento eletroquímico da PCZ quando incubada por diferentes períodos de tempo em meio neutro e alcalino. Em pH fisiológico (pH = 7,0) a mudança do comportamento anódico da PCZ com o tempo de incubação foi atribuída à degradação química da PCZ com formação de produto(s) de degradação eletroativo(s), enquanto em meio alcalino a ausência de picos anódicos foi justificada pela instabilidade e a degradação total da PCZ neste meio. Em meio ácido a PCZ manteve-se estável e não foi detectada mudança significativa em seu comportamento eletroquímico.

Biossensores de dsDNA foram confeccionados e incubados em soluções de PCZ e PCZ-Cu²⁺ por diferentes períodos de tempo. Foram detectadas claramente lesões na molécula do dsDNA após incubações dos biossensores de dsDNA em soluções de PCZ-Cu²⁺, que foram associadas a alterações na estrutura da dupla hélice e a danos oxidativos. Concluiu-se que a PCZ sofre degradação química oxidativa em pH fisiológico, sendo essa degradação catalisada pela presença de íons Cu²⁺ e, a partir dos estudos com os biossensores de DNA, foi proposto um mecanismo de interação PCZ-dsDNA, onde ocorre uma quebra da dupla hélice, a partir do rompimento das pontes de hidrogênio, e posteriormente danos oxidativos nas bases purínicas.

Capítulo 8

Referências

- [1] RANG, H. P.; DALE, M. M. **Farmacologia**. 7^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- [2] HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 10^a ed. Nova Iorque: McGraw-Hill, 2001.
- [3] GOLAN, D. E. *et al.* **Principles of Pharmacology** The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy. 3^a ed. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
- [4] FERNANDES, I. P. G. Mecanismo redox e eletroanálise de fármacos: temozolomida, clioquinol, daidzeína e azo-derivados da isatina. 2012. 147 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2012.
- [5] SILVERMAN, R. B. **The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action**. San Diego: Academic Press, 1992.
- [6] OLIVEIRA, S. C. B.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. DNA-Electrochemical Biosensors: AFM Surface Characterisation and Application to Detection of *In Situ* Oxidative Damage to DNA. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, 13, p. 628-640, 2010.
- [7] RAUF, S. Electrochemical approach of anticancer drugs–DNA interaction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 37, p. 205-217, 2005.
- [8] BRETT, C. M. A.; OLIVEIRA-BRETT A. M. **Electrochemistry**: Principles, Methods and Applications, Oxford: Oxford Science University Publications, 1993.
- [9] PONTINHA, A. D. R.; OLIVEIRA, S. C. B.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Electrochemical oxidation of metolazone at a glassy carbon electrode. **Electroanalysis**, Coimbra, 2008, 20, 23, p. 2531-2536, 2008.
- [10] QUEIROZ, N. L. *et al.* Oxidation mechanism of fluorescein at glassy carbon electrode. **Electroanalysis**, 29, p. 489-496, 2017.
- [11] OLIVEIRA, S. C. B. *et al.* Electrochemical oxidation mechanism of procarbazine at glassy carbon electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 746, p. 51-56, 2015.
- [12] OLIVEIRA BRETT, A. M. *et al.* DNA-electrochemical biosensors for investigating DNA damage. **Comprehensive Analytical Chemistry**, 49, p. 413-437, 2007.
- [13] OLIVEIRA, S. C. B.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. In situ evaluation of chromium-DNA damage using a DNA-electrochemical biosensor. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 398, 4, p. 1633-1641, 2010.
- [14] OLIVEIRA-BRETT, A. M. Electrochemical detection of in situ adriamycin oxidative damage to DNA. **Talanta**, 56, p. 959-970, 2002.
- [15] CORDUNEANU, O. DNA Interaction with Palladium Chelates of Biogenic Polyamines Using Atomic Force Microscopy and Voltammetric Characterization. **Analytical Chemistry**, 82, p. 1245-1252, 2010.
- [16] OLIVEIRA, S. C. B.; CORDUNEANU, O.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. In situ evaluation of heavy metal-DNA interactions using an electrochemical DNA biosensor. **Bioelectrochemistry**, 72, p. 53-58, 2008.

- [17] NOGA, E. J.; UDOMKUSONSRI, P. Fluorescein: A Rapid, Sensitive, Nonlethal Method for Detecting Skin Ulceration in Fish. **Veterinary Pathology**, 39, p. 726–731, 2002.
- [18] SJÖBACK, R.; NYGREN, J.; KUBISTD, M. Absorption and fluorescence properties of fluorescein. **Spectrochimica Acta Part A**, 51, p. L7 — L21, 1995.
- [19] ZHANG, J. *et al.* Surface-Enhanced Fluorescence of Fluorescein-Labeled Oligonucleotides Capped on Silver Nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry B**, 109, p. 7643-7648, 2005.
- [20] CHAN, P. H. *et al.* Rational Design of a Novel Fluorescent Biosensor for β -Lactam Antibiotics from a Class A β -Lactamase. **Journal of the American Chemical Society**, 126, p. 4074-4075, 2004.
- [21] WANG, B. *et al.* A highly specific fluorescent probe for hypochlorite based on fluorescein derivative and its endogenous imaging in living cells. **Dyes and Pigments**, 120, p. 22-29, 2015.
- [22] METALLO, S. J. *et al.* Using bifunctional polymers presenting vancomycin and fluorescein groups to direct anti-fluorescein antibodies to self-assembled monolayers presenting d-alanine-d-alanine groups. **Journal American Chemical Society**, 125, p. 4534-4540, 2003.
- [23] YANG, W. C. *et al.* Capillary Electrophoresis-Based Noncompetitive Immunoassay for the Prion Protein Using Fluorescein-Labeled Protein A as a Fluorescent Probe. **Analytical Chemistry**, 77, p. 4489-4494, 2005.
- [24] WANG, B. *et al.* Preparation of hybrid films containing polyoxometalate and fluorescein and their electrochemically induced fluorescence switching behaviors. **Journal of Materials Chemistry C**, 2, p. 4423-4427, 2014.
- [25] COHN, C. A.; SIMON, S. R.; SCHOONEN, M. A. Comparison of fluorescence-based techniques for the quantification of particle-induced hydroxyl radicals. **Particle and Fibre Toxicology**, 5, 2008.
- [26] MALASHIKHINA, N.; PAVLOV, V. DNA-decorated nanoparticles as nanosensors for rapid detection of ascorbic acid. **Biosensors and Bioelectronics**, 33, p. 241-246, 2012.
- [27] MA, X. *et al.* A fluorescein-based probe with high selectivity and sensitivity for sulfite detection in aqueous solution. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 188, p. 1196-1200, 2013.
- [28] SMITH, L. M. *et al.* Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. **Nature**, 321, p. 674-679, 1986.
- [29] CHENG, Y. F.; DOVICH, N. J. Subattomole amino acid analysis by capillary zone electrophoresis and laser-induced fluorescence. **Science**, 242, p. 562-564, 1988.
- [30] EKLUND, J. C. *et al.* Organic sonoelectrochemistry. Reduction of fluorescein in the presence of 20 kHz power ultrasound: an EC' reaction. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, 11, p. 1981-1984, 1995.

- [31] COMPTON, R. G.; COLES, B. A.; PILKINGTON, M. B. G. Photoelectrochemical Electron-Spin Resonance .3. The Reduction Of Fluorescein - A Photo-Disp2 Reaction. **Journal Of The Chemical Society-Faraday Transactions I**, 84, p. 4347-4357, 1988.
- [32] COMPTON, R. G.; PAGE, D. J.; SEALY, G. R. Insitu Electrochemical Electron-Spin-Resonance - 1st-Order Kinetics And Transient Signals. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 163, p. 65-75, 1984.
- [33] COLES, B. A.; COMPTON, R. G. Photo-Electrochemical Electron-Spin-Resonance .1. Experimental. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 144, p. 87-98, 1983.
- [34] SHI, M. J.; CUI, H. Electrochemiluminescence of fluorescein in alkaline solution at a polycrystalline gold electrode. **Journal of Luminescence**, 126, p. 187-195, 2007.
- [35] RAIDAN, R. I. *et al.* Influence of chemical structure on the electrodegradation of fluorescein and similar compounds. **Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy**, 44, p. 79-85, 2009.
- [36] FERRARI, V. D. *et al.* Epirubicin, cisplatin, and raltitrexed in patients with advanced gastric and hepatobiliary carcinoma: a phase II study. **American Journal of Clinical Oncology**, 27, p. 445-448, 2004.
- [37] PLANTING, A. *et al.* Phase I study of concomitant chemoradiation with raltitrexed in locally advanced head and neck câncer. **European Journal of Cancer**, 41, p. 93-97, 2005.
- [38] VAN MEERBEECK, J. P. *et al.* Randomized phase III study of cisplatin with or without raltitrexed in patients with malignant pleural mesothelioma: an intergroup study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Lung Cancer Group and the National Cancer Institute of Canada. **Journal of Clinical Oncology**, 23, p. 6881-6689, 2005.
- [39] FRANÇOIS, E. *et al.* A phase II trial of raltitrexed (Tomudex) in advanced pancreatic and biliary carcinoma. **Oncology**, 68, p. 299-305, 2005.
- [40] SCHWARZT, G. K.; HARSTRICK, A.; GONZALEZ BARON, M. Raltitrexed (Tomudex) in combination with 5-fluorouracil for the treatment of patients with advanced colorectal cancer: preliminary results from phase I clinical trials. **European Journal of Cancer**, 35, p. S9-S13, 1999.
- [41] NISHISHO, I. *et al.* A late phase II study of raltitrexed (ZD 1694) in chemotherapy-naïve patients with advanced colorectal cancer. **Japanese Journal of Cancer Chemotherapy**, 27, p. 81-91, 2000.
- [42] PONTINHA, A. D. R. *et al.* Antineoplastic Drug Methotrexate Redox Mechanism Using a Glassy Carbon Electrode. **Electroanalysis**, 24, p. 917-923, 2012.
- [43] INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Quimioterapia. Disponível em http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101

[44] LIU, Y. *et al.* Raltitrexed-based chemotherapy for advanced colorectal cancer. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, 38, p. 219-225, 2014.

[45] NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Compound Database. Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6037>

[46] JIANG, Q. L. *et al.* Folic acid-conjugated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for hyperthermia and MRI *in vitro* and *in vivo*. **Applied Surface Science**, 307, p. 224-233, 2014.

[47] KARIMI-MALEH, H. *et al.* Electrocatalytic and Simultaneous Determination of Ascorbic Acid, Nicotinamide Adenine Dinucleotide and Folic Acid at Ruthenium(II) Complex-ZnO/CNTs Nanocomposite Modified Carbon Paste Electrode. **Electroanalysis**, 26, p. 962-970, 2014.

[48] PITKIN, R. M. Folate and neural tube defects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 85, p. 285S-288S, 2007.

[49] HERBERT, V.; ZALUSKY, R. Interrelations of Vitamin B₁₂ and Folic Acid Metabolism: Folic Acid Clearance Studies. **The Journal of Clinical Investigation**, 41, p. 1263-1276, 1962.

[50] GREEN, N. S. Folic acid supplementation and prevention of birth defects. **Journal of Nutrition**, 132, p. 2356S-2360S, 2002.

[51] DUTHIE, S. J. Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. **British Medical Bulletin**, 55, p. 578-592, 1999.

[52] GUNASEKARA, N. S.; FAULDS, D. Raltitrexed. A review of its pharmacological properties and clinical efficacy in the management of advanced colorectal cancer. **Drugs**, 55, p. 423-435, 1998.

[53] SADOU-YAYÉ, H. *et al.* Density functional theory and liquid chromatography-multistage mass spectrometry to characterize raltitrexed photo-degradation mechanisms. **The Royal Society of Chemistry**, 6, p. 93801-93814, 2016.

[54] HU, J. *et al.* Determination of raltitrexed in human plasma by high performance liquid chromatography–electrospray ionization–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, 853, p. 147-153, 2007.

[55] WEEKES, C. D. *et al.* Hodgkin's Disease in the Elderly: Improved Treatment Outcome With a Doxorubicin-Containing Regimen. **Journal of Clinical Oncology**, 20, p. 1087, 2002.

[56] TRAVIS, L. B. *et al.* Lung Cancer Following Chemotherapy and Radiotherapy for Hodgkin's Disease. **The Journal of National Cancer Institute**, 94, p. 182-192, 2002.

[57] OGAWA, K. *et al.* Molecular mechanisms of DNA damage induced by procarbazine in the presence of Cu(II). **Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 539, p. 145-155, 2003.

- [58] SINHA, B. K. Metabolic activation of procarbazine. Evidence for carbon-centered free-radical intermediates. **Biochemical Pharmacology**, 33, p. 2777-2781, 1984.
- [59] WEEKES, C. D. *et al.* Hodgkin's Disease in the Elderly: Improved Treatment Outcome With a Doxorubicin-Containing Regimen. **Journal of Clinical Oncology**, 20, p. 1087-1093, 2002.
- [60] PLETSA, V. *et al.* DNA damage and mutagenesis induced by procarbazine in lambda lacZ transgenic mice: evidence that bone marrow mutations do not arise primarily through miscoding by O6-methylguanine. **Carcinogenesis**, 18, p. 2191-2196, 1997.
- [61] HEA, X. *et al.* Determination of procarbazine in human plasma by liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, 799, p. 281-291, 2004.
- [62] WEINKAM, R. J.; SHIBA, D. A. Metabolic activation of procarbazine. **Life Sciences**, 22, p. 937-945, 1978.
- [63] MASSOUD, M.; ARMAND, J. P.; RIBRAG, V. Procarbazine in haematology: na old drug with a new life?. **European Journal of Cancer**, 40, p. 1924-1927, 2004.
- [64] KELLY, M. G. *et al.* Carcinogenic activity of a new antitumor agent, /N/-isopropyl-a-(2-methylhydrazino)- p-toluamide hydrochloride. **Cancer Chemotherapy**, 39, p. 77-80, 1964.
- [65] KELLY, M. G. *et al.* Induction of tumors in rats with procarbazine hydrochloride. **Journal of the National Cancer Institute**, 40, p. 1027-1051, 1968.
- [66] SIEBER, S. M. *et al.* Carcinogenesis and other adverse effects of procarbazine in nonhuman primates. **Cancer Research**, 38, p. 2125-2134, 1978.
- [67] OLIVEIRA, S. C. B. Biossensores electroquímicos com DNA: Desenvolvimento e aplicações para detecção *in-situ* de danos oxidativos causados ao DNA. 2010. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.
- [68] PACHECO, W. F *et al.* Voltamétrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Revista Virtual de Química**, 5, 4, p.516-537, 2013.
- [69] LOBO, V. M. M. Soret coefficients of some polyelectrolytes. **Portugaliae Electrochimica Acta**, 14, p. 27-36, 1996.
- [70] ALEIXO, L. M. Voltamétria: Conceitos e Técnicas. **Chemkeys**, São Paulo, 2002.
- [71] OLIVEIRA, S. C. B.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. *In Situ* DNA Oxidative Damage by Electrochemically Generated Hydroxyl Free Radicals on a Boron-Doped Diamond Electrode. **Langmuir**, 28, p. 4896-4901, 2012.
- [72] OLIVEIRA, S. C. B.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Voltammetric and electrochemical impedance spectroscopy characterization of a cathodic and anodic pre-treated boron doped diamond electrode. **Electrochimica Acta**, 55, p. 4599-4605, 2010.

- [73] OLIVEIRA, S. C. B.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Boron doped diamond electrode pre-treatments effect on the electrochemical oxidation of dsDNA, DNA bases, nucleotides, homopolynucleotides and biomarker 8-oxoguanine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 648, p. 60-66, 2010.
- [74] OLIVEIRA-BRETT, A. M. *et al.* Voltammetric behaviour of mitoxantrone at a DNA-biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, 13, p. 861-867, 1998.
- [75] RAVERA, M. DNA-Metallo drugs Interactions Signaled by Electrochemical Biosensors: An Overview. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, 1, p. 11, 2007.
- [76] BEYNON, R.; EASTERBY, J. **The basics buffer Solutions**. Oxford: Oxford University Press, 1996.
- [77] BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**, 2^a ed., Nova Iorque: Wiley, 2001.
- [78] SHIMIZU, K.; SEPUNARU, L.; COMPTON, R. G. Innovative catalyst design for the oxygen reduction reaction for fuel cells. **Chemical Science**, 7, p. 3364-3369, 2016.
- [79] GUIDELLI, R. *et al.* Definition of the transfer coefficient in electrochemistry. **Pure and Applied Chemistry**, 86, p. 259-262, 2014.
- [80] HAYNES, W. M. **CRC Handbook of Chemistry and Physics**, 97^a ed., CRC Press, 2016.
- [81] MASEK, A.; ZABORSKI, M.; CHRZESCIJANSKA, E. Electrooxidation of flavonoids at platinum electrode studied by cyclic voltammetry. **Food Chemistry**, 127, p. 699-704, 2011.
- [82] FERNANDES, I. P. G. Electrochemical Oxidation Mechanisms of the Antioxidants Daidzein and 7-Hydroxy-4-chromone. **Electroanalysis**, 24, p. 618-626, 2012.
- [83] LUND, H.; HAMMERICH, O. **Organic Electrochemistry**, 4^a ed., Nova Iorque: Marcel Dekker, 2001.
- [84] GATTRELL, M.; KIRK, D. W. The electrochemical oxidation of aqueous phenol at a glassy carbon electrode. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, 68, p. 997-1003, 1990.
- [85] ENACHE, T. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 655, p. 9-16, 2011.
- [86] PERRY, M. C. **The Chemotherapy Source Book**, Pensilvânia: Lippincott, Williams & Wilkins, 1996.
- [87] WIDEMANN, B. C. *et al.* The plasma pharmacokinetics and cerebrospinal fluid penetration of the thymidylate synthase inhibitor raltitrexed (TomudexTM) in a nonhuman primate model. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, 44, p. 439-443, 1999.

- [88] VAZE, V. D.; SRIVASTAVA, A. K. Electrochemical behavior of folic acid at calixarene based chemically modified electrodes and its determination by adsorptive stripping voltammetry. **Electrochimica Acta**, 53, p. 1713-1721, 2007.
- [89] YARDIM, Y.; SENTÜRK, Z. Electrochemical Behavior of Folic Acid at A Boron-Doped Diamond Electrode: Its Adsorptive Stripping Voltammetric Determination in Tablets. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, 11, p. 87-100, 2014.
- [90] ZHAO, K. *et al.* Electrochemical behavior of folic acid in neutral solution on the modified glassy carbon electrode: Platinum nanoparticles doped multi-walled carbon nanotubes with Nafion as adhesive. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 677–680, p. 105–112, 2012.
- [91] LAVIRON, E. The use of linear potential sweep voltammetry and of a.c. voltammetry for the study of the surface electrochemical reaction of strongly adsorbed systems and of redox modified electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, 100, p. 263-270, 1979.
- [92] DUNN, D. L.; LUBET, R. A.; PROUGH, R. A. Oxidative metabolism of N-isopropyl- α -(2-methylhydrazino)-*p*-toluamide hydrochloride (procarbazine) by rat liver microsomes. **Cancer Research**, 39, p. 4555-4563, 1979.
- [93] FLOREY, K. **Analytical Profiles of Drug Substances**. 13^a ed., Nova Iorque: Academic Press, 1976.
- [94] DOST, F. N.; REED, D. J. Methane formation *in vivo* from N-isopropyl α -(2-methylhydrazino)-*p*-toluamide hydrochloride, a tumor-inhibiting methylhydrazine derivative. **Biochemical Pharmacology**, 16, p. 1741-1746, 1967.
- [95] OGAWA, K. *et al.*, Molecular mechanisms of DNA damage induced by procarbazine in the presence of Cu(II). **Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 539, p. 145-155, 2003.

Anexos

ARTIGO 1: Oxidation Mechanism of Fluorescein at Glassy Carbon Electrode

DOI: 10.1002/elan.201600456

Oxidation Mechanism of Fluorescein at Glassy Carbon Electrode

Nathalia L. Queiroz,^[a] Jos8 A. M. Nascimento,^[a] Maysa L. Nascimento,^[a] Valberes B. Nascimento,^[a] and Severino Carlos B. Oliveira*^[a]

Abstract: This study investigates redox properties of fluorescein (FLSC), a fluorescent tracer with many applications in several areas, markedly in biochemical research and health care diagnosis, on glassy carbon electrode (GCE) at a wide interval of pH by using voltammetric techniques. Three peaks were observed at different potentials. The investigation revealed that FLSC is irreversibly electrooxidized under a diffusion-controlled and pH-dependent process. The oxidation process in acid and physiological media occurs in two consecutive steps with formation of a main electroactive oxidation product in

acid medium. Both oxidation steps involve the transfer of one electron and one proton, corresponding to the oxidation of phenolic groups with formation of ortho-quinone derivatives, which are reversibly reduced to form catechol derivatives, and/or polymeric products. One electron and one proton are removed from the phenolic group at the position C6Q at the first step and at position C3Q at the second step. The diffusion coefficient of FLSC was assessed in pH = 7.0 phosphate buffer ($9.77 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$). A differential pulse voltammetric method for determination of FLSC in physiological medium was also proposed.

Keywords: Fluorescein · Oxidation mechanism · Glassy carbon

1 Introduction

Fluorescein (3',6'-dihydroxyspiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one, FLSC), Scheme 1, is a xanthene dye well known as a fluorescent tracer with many applications in several areas, markedly in biochemical research and as a diagnostic tool in the field of ophthalmology and optometry in medicine [1–7]. FLSC has been largely used in medicine as fluorescent label in immunoassay [3–6], DNA detection [7], antibiotics [8] and as diagnostic tool in the field of ophthalmology and optometry [2], also finding numerous applications in sensors [9–15] and as a textile dye [16]. On the other hand, the growing use of FLSC increases its harmfulness as a chemical pollutant [16,17]. FLSC does exist in aqueous medium under the form of cation, neutral or anion, Scheme 1, making its properties such as absorption and fluorescence strongly pH dependent [1].

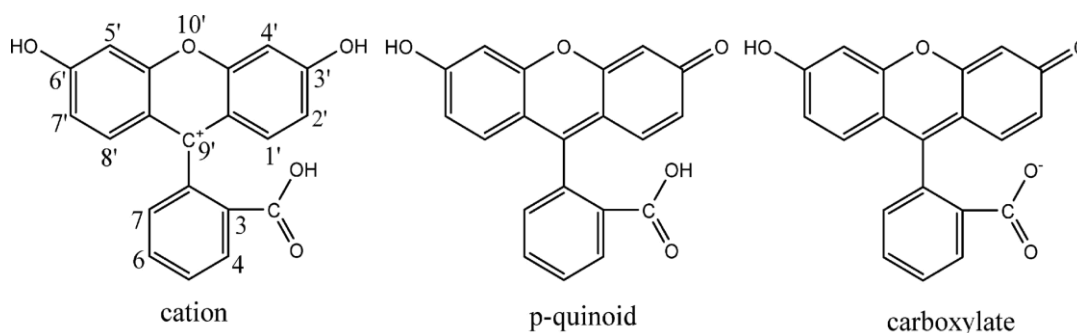
Several factors like in vivo drug activity, diffusion, solubility, stereochemistry, metabolism, acid-base equilibrium and the redox reactions involved in physiological processes must be considered to understand the mechanism of action and toxicity of various classes of drugs. So, it is highly pertinent to investigate the electron transfer pathways of in vitro biological reactions, since electrochemical data are correlated with molecular structure, pharmacological activity and toxicity of the drug, providing insights to help understanding biochemical mechanisms in living cells. Electrochemical techniques have been applied to help clarifying such drug mechanism of action and toxicity. Moreover, due to their high sensitivity, voltammetric methods have been successfully used for detection and

determination of various pharmaceutical and hazardous compounds [18–26].

FLSC is electroactive and can be reduced and oxidized at various electrode surfaces [9, 27–33]. However, the electrochemical oxidation has not been widely studied so far. Electrochemical reduction study of FLSC at mercury electrodes in alkaline medium has been investigated in the absence/presence of ultrasound and demonstrated that FLSC is reduced in two one-electron steps to the radical semi-FLSC and leuco-FLSC and, in the presence of ultrasound, the FLSC radicals are re-oxidized by hydroxyl radicals formed in the aqueous medium through the sonochemical decomposition [28–31]. Electrochemiluminescence mechanism of FLSC has been studied at gold electrode in a wide potential window, but only in specific conditions (alkaline solution) and using cyclic voltammetry [33]. The electrodegradation of FLSC on Pt and boron doped diamond electrode as a function of several parameters such as pH, current and nature of the electrolyte has been investigated towards developing a degradation protocol for treating polluted wastewater [17].

The knowledge of the oxidation mechanism of FLSC is of great relevance to clarify properties such as drug activity, stereochemistry, diffusion, solubility, metabolism, and

[a] N. L. Queiroz, J. A. M. Nascimento, M. L. Nascimento, V. B. Nascimento, S. C. B. Oliveira
Departamento de Química,
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE,
52171-900 Recife, Brasil
Tel: +55-81-3320-6375
*e-mail: s.carlosb.oliveira@gmail.com
severino.oliveira@ufrpe.br



Scheme 1. Chemical structures of FLSC in acid, neutral and alkaline media.

redox reactions in aqueous medium. This work presents for the first time an investigation of the anodic behaviour of FLSC on a GCE using cyclic, differential pulse and square wave voltammetry. The study permitted interesting insights on its redox properties, which resulted the proposition of an oxidation mechanism for the overall oxidation process. A differential pulse voltammetry method for determination of FLSC was also proposed.

2 Experimental

2.1 Materials and Reagents

FLSC was obtained from Sigma and used without further purification. A stock solution of 100 mM was prepared in water and stored at 5 °C. Dilutions were prepared in supporting electrolyte solutions. Supporting electrolyte solutions of different pH/composition (3.5/HAcO + NaAcO, 4.5/HAcO + NaAcO, 5.2/HAcO + NaAcO, 6.0/NaH₂PO₄ + Na₂HPO₄, 7.0/NaH₂PO₄ + Na₂HPO₄, 7.8/NaH₂PO₄ + Na₂HPO₄, 9.7/NaOH + Na₂B₂O₇) were prepared using analytical grade reagents and purified water from a Millipore Milli-Q system (conductivity 0.1 mS/cm) with ionic strength I = 0.1 M according to the literature [34].

Microvolumes were measured using electronic pipettes (EP), EP-10 mM and EP-100 mM Plus Motorized (Rainin Instrument Co. Inc., Woburn, USA). The pH measurements were carried out on a Metrohm Herisau (Switzerland) pH-meter using Scott Gerate glass combination electrode.

All experiments were done at room temperature, T = 298 K.

2.2 Voltammetric Parameters and Electrochemical Cells

Voltammetric experiments were carried out using a three electrode potentiostat (Metrohm, PGSTAT 302N) running with GPES 4.9 software, Metrohm/Autolab, Utrecht, The Netherlands. Measurements were carried out using a glassy carbon working electrode (GCE) (d = 1.6 mm), a Pt wire counter electrode, and an Ag/AgCl (3 M KCl) as reference electrode, in a 10 mL one-compartment electrochemical cell. The experimental conditions for differ-

ential pulse (DP) voltammetry were: pulse amplitude 50 mV, pulse width 70 ms, and scan rate 5 mV s⁻¹. For square wave (SW) voltammetry the experimental conditions were: pulse amplitude 50 mV, frequency 10 Hz and potential increment 5 mV, corresponding to an effective scan rate of 50 mVs⁻¹.

The GCE was polished to a mirror using diamond spray (particle size 1 μm, Kement, Kent, UK) before every electrochemical assay. After polishing, the electrode was rinsed thoroughly with Milli-Q water. Following this mechanical treatment, the GCE was placed in buffer supporting electrolyte and various DP voltammograms were recorded until a flat baseline voltammogram was obtained. This procedure ensured very reproducible experimental results.

All DP and SW voltammograms, for a better and clearer identification of the peaks presented, were baseline-corrected using the moving average application with a step window of 2 mV included in the GPES version 4.9 software.

3 Results and Discussion

The FLSC has two phenolic groups at the position C6Q and C3Q that can be oxidized, Scheme 1. The oxidation mechanism of FLSC was investigated in different pH conditions by cyclic, differential and square wave voltammetry.

3.1 Cyclic Voltammetry

Firstly, the oxidation behaviour of FLSC at a GCE was investigated by cyclic voltammetry (CV) at a scan rate of 100 mVs⁻¹ in electrolytes with different pHs, all containing 25 mM FLSC, Fig. 1.

Successive CVs in solutions of 25 mM of FLSC were performed in 0.1 M acetate buffer, pH = 4.5, Fig. 1A, in 0.1 M phosphate buffer, pH = 7.0, Fig. 1B, and 0.1 M borate buffer, pH = 9.7, Fig. 1C. One oxidation peak 1a appears at E_{p1a} = +0.91 V in acid medium, pH = 4.5, at E_{p1a} = +0.71 V in physiological medium, pH = 7.0, and at E_{p1a} = +0.67 V in alkaline medium, pH = 9.0, which is associated with the oxidation of the phenolic group at the

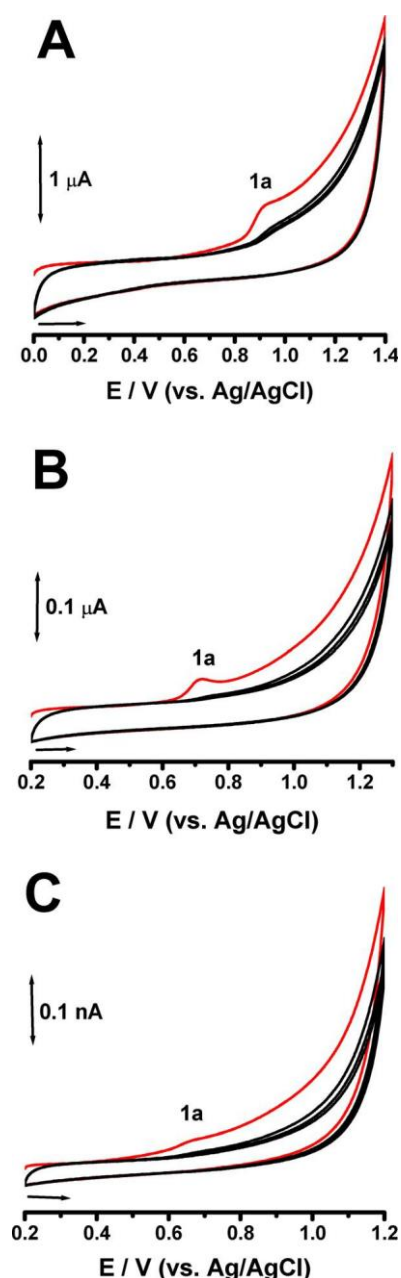


Fig. 1. Successive CVs obtained in solutions of 25 mM FLSC in: (A) 0.1 M acetate buffer, pH =4.5, (B) 0.1 M phosphate buffer, pH =7.0, and (C) 0.1 M borate buffer, pH =9.7, (—) first scan, $n=100 \text{ mVs}^{-1}$.

position C6Q of an aromatic ring of the molecule, Scheme 1. On the reverse scan, in cathodic direction, no peaks were detected, demonstrating that the oxidation process is irreversible at all investigated pHs. In the second scan in acid medium, pH =4.5, a decrease in the peak height can be seen for the peak 1a, Fig. 1A, while, in neutral and alkaline media, peak 1a completely disappears, Figs. 1B and 1C, which is attributed to adsorption of FLSC oxidation products on the GCE surface.

Adsorption of FLSC oxidation products at the GCE surface was confirmed. After CV successive scans record-

ed in a 25 mM FLSC solution, in pH =4.5, 7.0 and 9.7, the electrode was washed with a jet of deionized water and then transferred to a supporting electrolyte solution (pH =4.5, 7.0 or 9.7). CV voltammograms obtained in these conditions, at all investigated pHs, as expected, did not show any peaks. As FLSC does not adsorb on the GCE electrode surface, and by considering the almost disappearance of the peak at the second scan Fig. 1, oxidation products of FLSC must adsorb strongly.

CVs were also performed for a 50 mM solution of FLSC in acid, physiological and alkaline media, Fig. 2. In 0.1 M acetate buffer, pH =4.5, it was detected a broad anodic peak, peak 1a at $E_{p1a} = +0.91 \text{ V}$, which decreased strongly in the second scan, but not completely, Fig. 2A. In 0.1 M phosphate buffer, pH =7.0, two irreversible consecutive oxidation peaks, peak 1a, at $E_{p1a} = +0.71 \text{ V}$, and peak 2a, at $E_{p2a} = +0.96 \text{ V}$, were detected, Fig 2B, while in 0.1 M borate buffer, pH =9.7, a small anodic peak was detected at $E_{p1a} = +0.77 \text{ V}$, Fig 2C. The FLSC anodic peaks are associated with the oxidation of the phenolic group at the position C6Q (peak 1a) and C3Q (peak 2a) on aromatic rings of the molecule, Scheme 1. In all pH ranges investigated, a decrease in peak currents for both peaks 1a and 2a in successive CVs was observed, Figs. 2A, 2B and 2C, which is attributed to adsorption of FLSC oxidation products on the GCE surface. However, the GCE surface is not completely blocked, since oxidation peaks never disappear completely in these experimental conditions.

The effect of scan rate on the oxidation of FLSC on GCE was investigated by CV. The GCE was immersed in a 25 mM FLSC in a 0.1 M phosphate buffer solution, pH =7.0, and the voltammograms were run using different scan rates ($10\text{--}500 \text{ mVs}^{-1}$), Fig. 3. Between measurements, the electrode surface was always polished in order to assure a clean surface and to avoid possible problems from adsorption of FLSC oxidation products onto the GCE surface. A slightly positive shift in potential was observed for the peak 1a, Fig. 3. Also, by increasing the scan rate, the current of the peak 1a increases linearly with square root of n , Fig. 3, which is consistent with the diffusion-controlled oxidation process [18,35–38] and in agreement with the highly hydrophilic character of FLSC in physiological medium, pH =7.0 [1]. The peak current, in amperes, for a diffusion-controlled irreversible system, is given by the Randles-Sevcik equation [18,35–38],

$$I_{p1a} (\text{A}) = 2.99 \cdot 10^5 \cdot n \cdot (a_c + nQ)^{1/2} \cdot A \cdot [O]_1 \cdot D_O^{1/2} \cdot n^{1/2}$$

where n is the number of electrons transferred during the oxidation of FLSC ($n=1$, Section 3.2), A is the GCE electroactive area in cm^2 , D_O is the diffusion coefficient in $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $[O]_1$ is the FLSC concentration in mol cm^{-3} and n is the scan rate in V s^{-1} . So, the value of D_{FLSC} of FLSC was estimated by Randles-Sevcik equation by plotting I_{p1a} vs. $n^{1/2}$ in 0.1 M phosphate buffer, pH =7.0, as $D_{\text{FLSC}} = 9.77 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, and considering the experimental conditions, it is in good agreement with the previously reported results [39]. For this calculation, the difference between peak potential E_{p1a} and the potential at half height of

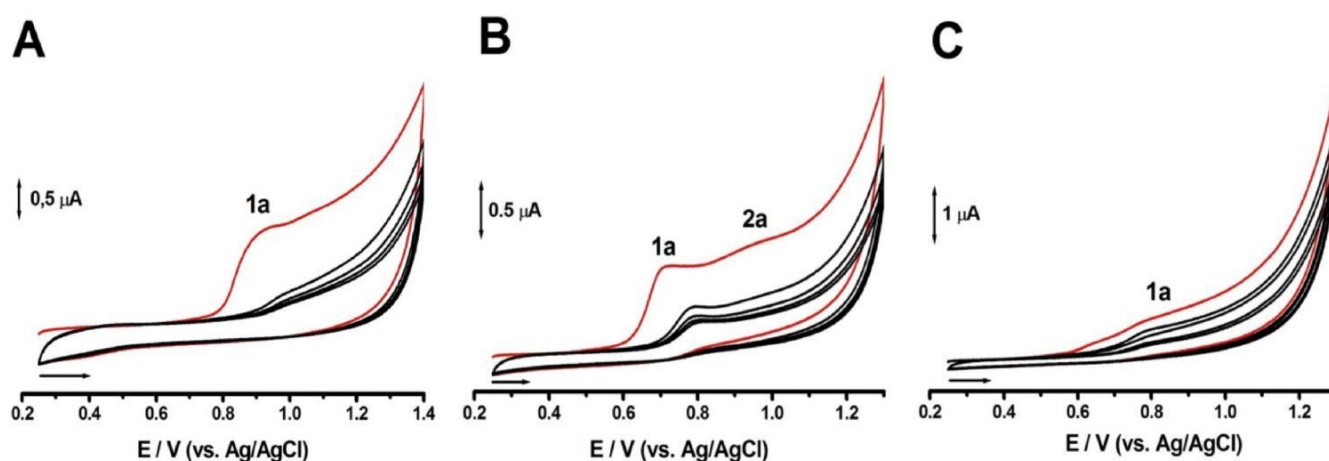


Fig. 2. Successive CVs obtained in solutions of 50 mM FLSC in: (A) 0.1 M acetate buffer, pH =4.5, (B) 0.1 M phosphate buffer, pH =7.0, and (C) 0.1 M borate buffer, pH =9.7, (—) first scan, $n = 100 \text{ mVs}^{-1}$.

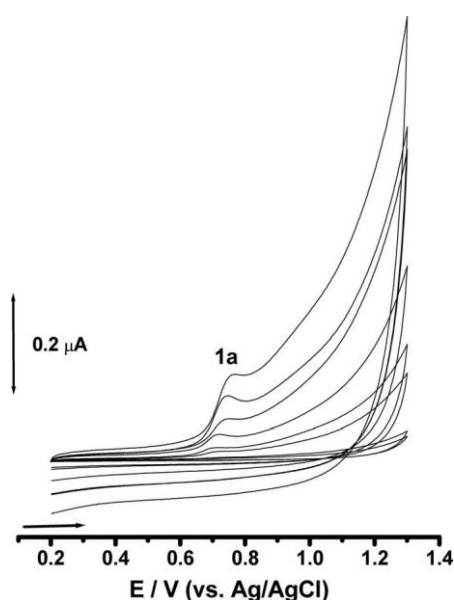


Fig. 3. CVs in solution of FLSC 25 mM in 0.1 M phosphate buffer, pH =7.0, under different scan rates (10, 25, 50, 100, 300, 400 and 500 mV s^{-1}).

peak $E_{p1a/2}$ was determined as $\sim 35 \text{ mV}$. Since for a diffusion-controlled irreversible system, $j_{E_{p1a}}@E_{p1a/2} = 47.7 / (a_c + nQ)$, where a_c is the charge transfer coefficient and nQ the number of electrons in the rate-determining step [18,35–38], it can be calculated that $(a_c + nQ) = 1.36$. The GCE electroactive area was determined by the Randles-Sevcik equation for a reversible system, $I_{pa} (\text{A}) = 2.69 \times 10^{-5} n^{3/2} A [O]_1 D_0^{1/2} n^{1/2}$, plotting I_{p1a} vs. $n^{1/2}$ and using a solution of 62.5 mM hexacyanoferrate and the value of the diffusion coefficient of hexacyanoferrate in phosphate buffer of $D_0 = 7.35 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [40]. So, an electroactive area of 0.011 cm^2 was estimated.

3.2 Differential Pulse Voltammetry – Effect of pH

The effect of pH on the oxidation of FLSC was investigated by using DP voltammetry, a method with high resolution and sensitivity that allows well separation of peaks, to better characterize subsequent steps [18,35,41].

Successive DP voltammograms in a 25 mM of FLSC were performed in 0.1 M acetate buffer, pH =4.5, in 0.1 M phosphate buffer, pH =7.0, and in 0.1 M borate buffer, pH =9.7, Fig. 4. The voltammograms in acid and physiological media showed that the FLSC oxidation occurs in two consecutive steps, peak 1a and 2a, Figs. 4A and 4B, while in alkaline medium occurs only by one oxidation step, peak 1a, Fig. 4C. So, it is demonstrated that the FLSC oxidation is significantly affected by the pH, Figs. 4A, 4B and 4C. So, it is important to consider the FLSC predominant form at each pH, Scheme 1, which means structural changes in the phenolic groups and variations on the hydrophilic character, strongly influencing, as expected, its electrooxidation process on the GCE surface.

An additional DP voltammetric study of the oxidation of FLSC was performed on a wide pH range, between 3.5 and 9.7, since the knowledge of oxidation potentials at different pH values could offers complementary information on the oxidation behaviour of FLSC. The DP voltammograms, Fig. 5A, were all recorded in solutions of 25 mM FLSC in different electrolytes with 0.1 M ionic strength.

The peak 1a occurs at all the investigated pH range, Figs. 5A and 5B. However, for $3.5 < \text{pH} < 6.3$ the peak potential was shifted to less positive values with increasing pH, Fig. 5A, indicating the existence of an acid-base equilibrium and that protons are involved in the oxidation process. In the E_{pa} vs. pH plot, Fig. 5B, a slope of $\sim 59 \text{ mV per pH unit}$ shows that the mechanism associated with the peak 1a involves an equal number of electrons and protons. As the peak width at half height for

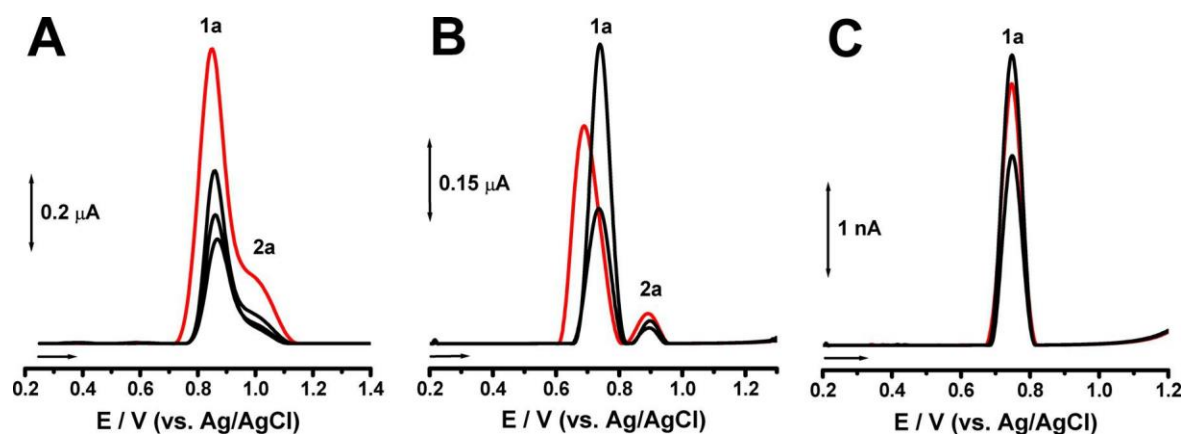


Fig. 4. Successive DPVs (with base line correction) obtained in solutions of 10 mM FLSC in: (A) 0.1 M acetate buffer, pH =4.5, (B) 0.1 M phosphate buffer, pH =7.0 and (C) 0.1 M borate buffer, pH =9.7, (—) first scan, $n = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

the peak 1a is $W_{1/2} \sim 89 \text{ mV}$, it can be concluded that this reaction step occurs with the withdrawal of a one electron/proton pair [18]. For $\text{pH} > 6.5$, the oxidation at peak 1a was pH-independent, showing an anodic reaction involving only the transfer of one electron. These results permitted to assign such oxidation at peak 1a to the phenolic group at the position C6Q, pK_a of FLSC, $\text{pK}_a \sim 6.3$, Fig. 5B.

The plot of peak current 1a vs. pH, Fig. 5A, shows an optimum sensitivity in the pH range 3.5 to 7.8.

For the peak 2a, the electrochemical oxidation was clearly detected only in acid and physiological medium

and the peak potential was shifted to less positive values with increasing pH, Figs. 5A and 5B. Since there is a slope of $\sim 59 \text{ mV}$ per pH unit, Fig. 5B, and a half-height width of $\sim 80 \text{ mV}$ for the peak 2a, it can be concluded that this step of the oxidation reaction involves the withdrawal of a one electron/proton pair [18]. The plot of peak current 2a vs. pH, Fig. 5A, shows an optimum sensitivity in the $\text{pH} = 3.5$.

3.3 Square Wave Voltammetry

The effect of pH on the oxidation of FLSC was also investigated by using SW voltammetry. Important advantages of SW voltammetry in relation to DP voltammetry include minimization of problems with poisoning of the electrode surface and analysis of the electrochemical reversibility of the electron transfer reaction by running only one scan [18].

The SW voltammetric behaviour of FLSC at GCE surface, at an effective scan rate of 50 mVs^{-1} , in electrolytes with different pH is shown in Fig. 6.

Successive SW voltammograms in a 50 mM FLSC solution were performed in 0.1 M acetate buffer, $\text{pH} = 4.5$, and the first voltammogram showed similar features to the DP voltammograms, presenting two oxidation peaks, peak 1a, at $E_{p1a} = +0.85 \text{ V}$, and peak 2a, at $E_{p2a} = +1.09 \text{ V}$, Fig. 6A. The irreversibility of the FLSC oxidation processes relative to peaks 1a and 2a was confirmed by plotting the forward and backward components of the total current, Fig. 6B. The second SW voltammogram showed the occurrence of one new and reversible oxidation peak 3a, at $E_{p3a} = +0.45 \text{ V}$, corresponding to a reversible oxidation product of FLSC, Figs. 6A and 6C.

Successive SW voltammograms in a 50 mM FLSC solution were performed also in 0.1 M phosphate buffer, $\text{pH} = 7.0$, and the first voltammogram showed similar features to the DP voltammograms, presenting two oxidation peaks, peak 1a, at $E_{p1a} = +0.77 \text{ V}$, and peak 2a, at $E_{p2a} = +0.94 \text{ V}$. However, there was no production of electroactive products by running successive SW voltammograms.

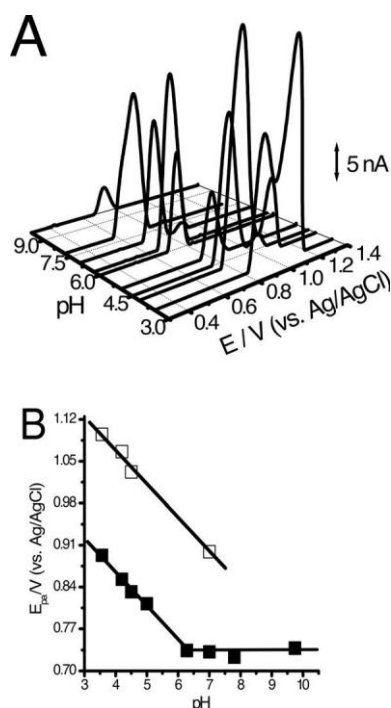


Fig. 5. (A) 3D plot of oxidation DPVs (with base line correction) in 25 mM FLSC vs. pH. (B) Plot of (&) E_{p1a} of peak 1a and (&) E_{p2a} of peak 2a vs. pH. The slope of the line is 59 mV per pH unit.

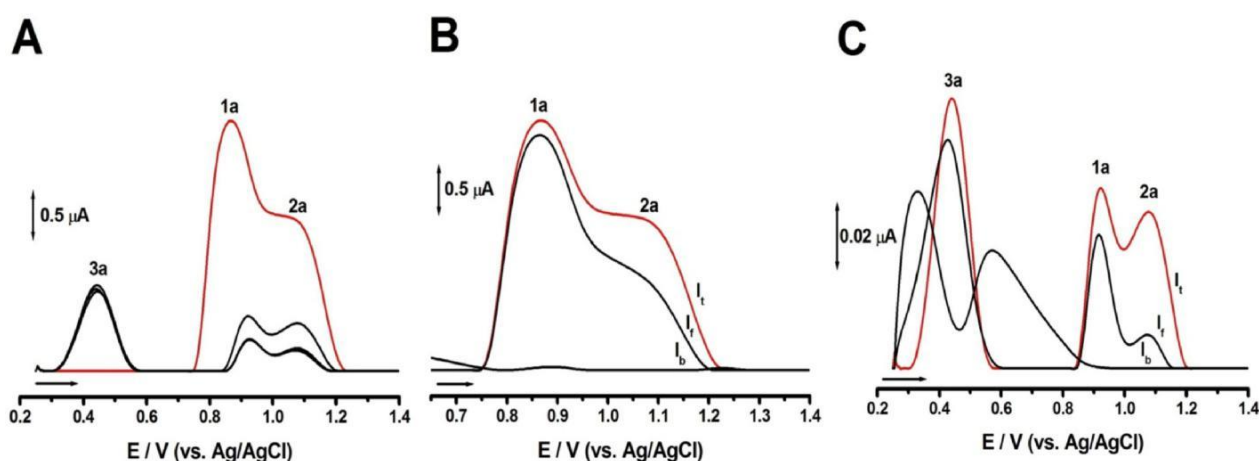
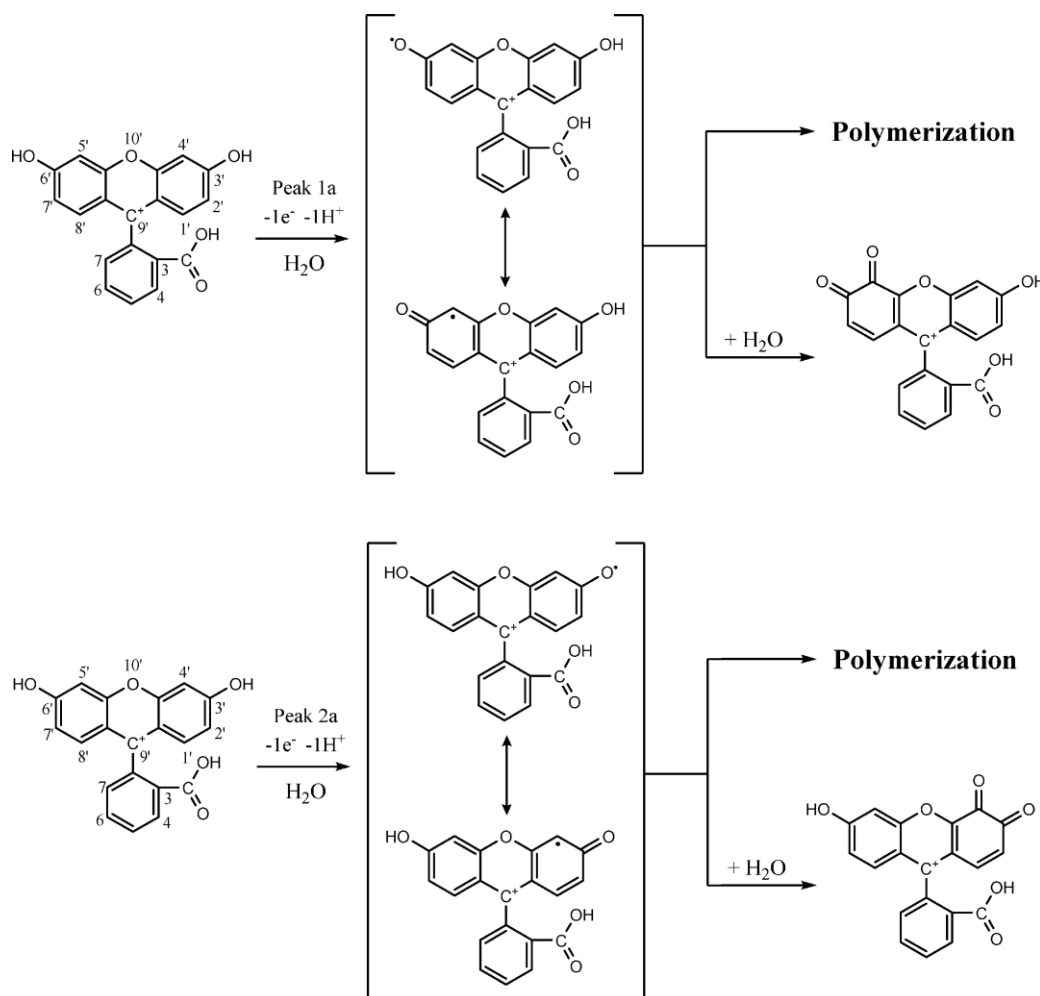


Fig. 6. SWVs (with base line correction) of 50 mM FLSC: (A) successive scans in 0.1 M acetate buffer, pH =4.5, (—) first scan, (B) first and (C) second scan; I_t – total, I_f – forward and I_b – backward, $n_{\text{effective}} = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

Successive SW voltammograms were also performed in a 50 mM FLSC solution in 0.1 M borate buffer, pH =9.0, and only one irreversible anodic peak was detected in the first scan, in good agreement with the CV and DP voltammetry results.

The experiments above were repeated in a 10 mM FLSC solution and, when compared to the results from a 50 mM FLSC solution in acid and neutral media, showed similar features, where two anodic peak were detected and, in the successive SW voltammograms, the



Scheme 2. Tentative oxidation mechanism of FLSC.

peak 3a of the oxidation product was observed again only in acidic medium. However, in alkaline medium no peak was detected.

3.4 Oxidation Mechanism of FLSC

Based on the CV, DP and SW voltammetry data, besides FLSC structure and chemical properties [1–9], a tentative oxidation mechanism of FLSC was proposed. The electro-oxidation reaction occurs in two steps, Scheme 2. In the first step, one electron and one proton are removed of the phenolic group at the position C6Q and, in the second step, one electron and one proton are removed of the phenolic group C3Q from the FLSC molecule.

The electrooxidation of phenols groups involves the formation of a phenoxy radical, that can initiate polymerization, leading to adsorbed products on the electrode surface [25,42–45], and the radical can also be oxidized to a quinone, that is reversibly reduced in another pathway [25,42–45]. In the electroreduction of the ortho-quinone/catechol and para-quinone/hydroquinone redox couples on the carbon surface, the electroreduction potential of para-quinone occurs at a lower potential close to 0.0 V and the electroreduction potential of ortho-quinone occurs at a higher potential varying between 0.30 V and 0.60 V [25,43]. Consequently, the FLSC oxidation product, peak 3a, at $E_{p3a} = +0.40$ V, detected in acidic medium corresponds to a quinone derivative that is reversibly reduced to form a catechol, Scheme 2. However, the phenoxy radical coupling to form polymeric products may correspond to the main reaction product in physiological and alkaline media, since no electroactive product is observed by CV, DP and SW voltammetry at these pH range.

3.5 Electroanalytical Determination

DP voltammetry can be used to obtain a sensitive quantification of FLSC in 0.1 M phosphate buffer, pH = 7.0. Fig. 7A shows DP voltammetric responses under optimized conditions for increasing concentrations of FLSC on GCE surface. The corresponding calibration plot, Fig. 7B, shows that there is a linear relationship $I_{pa} (A) = 0.01 [FLSC/mM] @ 1.58 \cdot 10^{-8}$ where $r = 0.994$, $n = 5$, $SD = 2.13$ nM, in the concentration range from 2.0–8.0 mM (For each concentration, three measurements were performed and, after each measurement, the electrode surface was always polished and thoroughly rinsed with deionized water, in order to ensure a clean electrode surface). Under optimized conditions, the detection limit was calculated as 0.64 mmolL^{-1} (3 s/S, where s is the standard deviation of the blank signal and S, the sensitivity) and the quantification limit as 2.13 mmolL^{-1} (10 s/S).

4 Conclusions

The electrochemical study showed that FLSC undergoes direct oxidation at a GCE. The oxidation of FLSC is

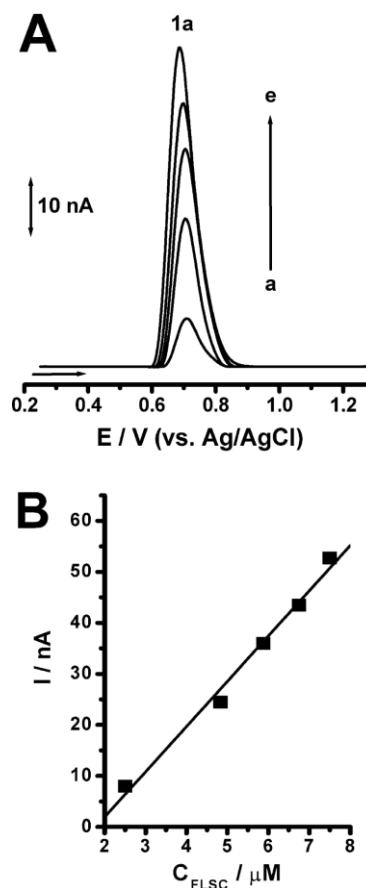


Fig. 7. (A) DPVs (with base line correction) for FLSC at in-creasing concentrations and (B) Analytical curve I_{pa} (A) = 0.01 [FLSC/mM] @ $1.58 \cdot 10^{-8}$ of FLSC. [phosphate buffer] = 0.1 M, pH = 7.0; (a) 2.5, (b) 5.0, (c) 6.0, (d) 7.0, (e) 8.0 mM, $n = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

complex, pH-dependent and occurs in two consecutive charge transfer reactions in the phenolic groups at the position C3Q and C6Q to form electroactive ortho-quinone derivatives in acid medium, and polymeric products in physiological or alkaline media, as main products. Both oxidation steps involve the transfer of one electron and one proton. A FLSC oxidation mechanism is proposed. The diffusion coefficient of FLSC was calculated in pH = 7.0 phosphate buffer to be $D_{FLSC} = 9.77 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

An electroanalytical method for FLSC has been established using DPV in physiological medium with a limit of detection of 0.64 mM and quantification of 2.13 mM.

The knowledge of the oxidation mechanism of FLSC at GCE will certainly be helpful on interpreting electrochemical data from its intercalation with DNA and still can offer additional information to its molecular bio-chemistry.

Acknowledgements

Financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), PPP/FACEPE/CNPq/APQ-0535–1.06/14, Conselho Nacio-

nal de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), MCTI/CNPQ/Universal/APQ-456725/2014–8, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Apoio a Pesquisa Institucional-UFRPE 09/2014, Msc. CAPES Grant (N. L. Queiroz), BTT-FACEPE Grant (M.L. Nascimento), PIBIC-UFRPE-CNPq Grant (J. A.M. Nascimento), is gratefully acknowledged.

References

- [1] R. Sjoback, J. Nygren, M. Kubista, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 1995, 51, L7.
- [2] D. Bongetta et al, *Word Neurosurg*. 2016, 88, 54.
- [3] B. Wang et al, *Dyes and Pigm.* 2015, 120, 22.
- [4] P. Talar, D. Kacik, N. Tarjanvi, *Opt. Fiber Technol.* 2016, 30, 8.
- [5] S. J. Metallo, R. S. Kane, R. E. Holmlin, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125 4534.
- [6] W. C. Yang, *Anal. Chem.* 2005, 77, 4489.
- [7] J. Zhang, J. Malicka, I. Gryczynski, J. R. Lakowicz, *J. Phys. Chem. B.* 2005, 109, 7643.
- [8] P. H. Chan et al, *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 4074.
- [9] B. Wang et al, *J. Mater. Chem. C* 2014, 2, 4423.
- [10] C. A. Cohn, S. R. Simon, M. A. A. Schoonen, *Part. Fibre Toxicol.* 2008, 5, 1.
- [11] D. Millar, M. Uttamlal, R. Henderson, A. Keeper, *Chem. Commum.* 1998, 477.
- [12] N. Malashikhina, V. Pavlov, *Biosens. Bioelectron.* 2012, 33, 241.
- [13] M. M. Sari, *Mater. Chem. Phys.* 2013, 138, 843.
- [14] J. Chen et al, *Sensors Actuat. B-Chem.* 2015, 206, 230.
- [15] X. Ma et al, *Sensors Actuat. B-Chem.* 2013, 188, 1196.
- [16] S. Pirillo, F. S. G. Einschlag, M. L. Ferreira, E. H. Rueda, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2010, 66, 63.
- [17] R. I. Raidan, M. A. Tabbara, A. A. El Zant, M. M. El Jamal, *J. Chem. Technol. Metal.* 2009, 44, 79.
- [18] C. M. A. Brett, A. M. O. Brett, *Electrochemistry: Principles, Methods and Applications*, Oxford Science University Publications ed., Oxford, 1993.
- [19] S. C. B. Oliveira et al., *J. Electroanal. Chem.* 2015, 746, 51.
- [20] I. B. Santarino, S. C. B. Oliveira, A. M. Oliveira-Brett, *Electrochem. Commum.* 2012, 23, 114.
- [21] C. Batchelor-McAuley, R. G. Compton, *J. Electroanal. Chem.* 2012, 669, 73.
- [22] V. VargovQ et al., *Electrochim. Acta* 2016, 187, 662.
- [23] B. J. Sanghavi, A. K. Srivastava, *Electrochim. Acta* 2010, 55, 8638.
- [24] A. C. Torres, M. E. Guica, C. M. A. Brett, *Electroanalysis* 2012, 24, 1547.
- [25] S. C. B. Oliveira, V. B. Nascimento, *Electroanalysis* 2013, 25, 2117
- [26] H. Shirinzadeh, et al., *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2010, 13, 619.
- [27] S. K. Vig, N. R. Bannerjee, *Electrochim. Acta* 1971, 16, 157.
- [28] J. C. Eklund, D. N. Waller, T. O. Rebbit, F. Marken, R. G. Compton, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1995, 1983.
- [29] B. A. Coles, R. G. Compton, *J. Electroanal. Chem.* 1983, 144, 87.
- [30] R. G. Compton, D. J. Page, G. R. Sealy, *J. Electroanal. Chem.* 1984, 163, 65.
- [31] R. G. Compton, B. A. Coles, M. B. G. Pilkington, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1988 84, 4347.
- [32] J. Panchompoo, L. Aldous, M. Baker, M. I. Wallace, R. G. Compton, *Analyst* 2012, 137, 2054.
- [33] M. J. Shi, H. Cui, *J. Lumin.* 2007, 126, 187.
- [34] R. Beynon and J. Easterby, *The basics buffer Solutions*, Oxford University Press, Oxford, 1996.
- [35] A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, Second ed., Wiley, New York, 2001.
- [36] R. Guidelli, R. G. Compton, J. M. Feliu, E. Gileadi, J. Lipkowski, W. Schmickler, S. Trasatti, *Pure Appl. Chem.* 2014, 86, 245.
- [37] R. Guidelli, R. G. Compton, J. M. Feliu, E. Gileadi, J. Lipkowski, W. Schmickler, S. Trasatti, *Pure Appl. Chem* 2014, 86, 259.
- [38] K. Shimizu, L. Sepunaru, R. G. Compton, *Chem. Sci.* 2016, 7, 3364.
- [39] Ch.T. Culbertson, S. C. Jacobson, J. M. Ramsey, *Talanta* 2002, 56, 365.
- [40] <http://www.hbcpnetbase.com/>, Handbook of chemistry and physics.
- [41] A. Masek, M. Zaborski, E. Chrzescijanska, *Food Chem.* 2011, 127, 699
- [42] I. P. G. Fernandes, S. C. B. Oliveira, M. Ghalkhani, S. Shahrokhian, A. M. Oliveira-Brett, *Electroanalysis* 2012, 24, 618.
- [43] T. A. Enache, A. M. Oliveira-Brett, *J. Electroanal. Chem.* 2011, 655, 9.
- [44] H. Lund and O. Hammerich (eds.), *Organic Electrochemistry*, 4th ed., Marcel Dekker, New York, 2001.
- [45] M. Gattrell, D. W. Kirk, *Can. J. Chem. Eng.* 1990, 68, 997.

Received: July 20, 2016

Accepted: August 10, 2016

Published online: August 26, 2016

ARTIGO 2: Electrochemical oxidation mechanism of procarbazine at glassy carbon electrode



Electrochemical oxidation mechanism of procarbazine at glassy carbon electrode



Severino Carlos B. Oliveira[†], Carlos H.S. Mendes, Franklin F.S. Filho, Nathalia L. Queiroz, José A.M. Nascimento, Valberes B. Nascimento

Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52071-030 Recife, PE, Brazil

article info

Article history:

Received 16 September 2014
Received in revised form 20 January 2015
Accepted 27 February 2015 Available online 28 February 2015

Keywords:

Procarbazine
Glassy carbon
Oxidation
Mechanism

abstract

A voltammetric study of the redox behavior of procarbazine (PCZ), one of the most used chemotherapy agents to face Hodgkin's lymphoma, was carried out to investigate its oxidation at glassy carbon electrode (GCE). Essays of cyclic, differential pulse and square-wave voltammetries, on a large pH interval, revealed the electrochemical oxidation behavior of PCZ as an irreversible adsorption-controlled oxidation process, occurring in four consecutive charge transfer steps. The first, second and third steps are pH-dependent and occur with the transfer of one electron and one proton, leading to the formation of an electroactive product in acid media, while the last one is pH-independent, involving the transfer of one electron. A reaction mechanism for the electrochemical oxidation of PCZ is proposed, where, in the first and second step the oxidation occurs on the hydrazine group, followed by isomerization and, after hydrolysis, conversion to benzaldehyde-procarbazine. The third and fourth steps are associated with the oxidation of the benzaldehyde-procarbazine with the production of the N-isopropylterephthalic acid. © 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Procarbazine [N-isopropyl-a-(2-methylhydrazino)-p-toluamide hydrochloride, PCZ, Matulane, Nathulane, Natulanar], a chemotherapeutic hydrazine, [Scheme 1](#), is one of the most used chemotherapy agents to face Hodgkin's lymphoma, being applied also to non-Hodgkin's lymphomas and various other forms of cancer [1]. PCZ induces pulmonary tumors, leukemia, mammary adenocarcinoma and nasal tumor in animals [2–4]. The MOPP chemotherapy (mustargen, oncovin, procarbazine and prednisone) was found to induce lung tumor and leukemia in humans [2].

The mechanism of action of PCZ is not yet fully understood, but there is some evidence suggesting that several enzymes and certain transition metal ions, as horseradish peroxidase, prostaglandin synthetase, cytochrome P450 and copper (II), catalyze oxidation of PCZ, leading to the formation of toxic derivatives, such as azo derivatives, the hydrazine, the aldehyde and carbon-centered and oxygen free radicals, that in contact with DNA can cause alkylation and/or oxidative damage [1–6].

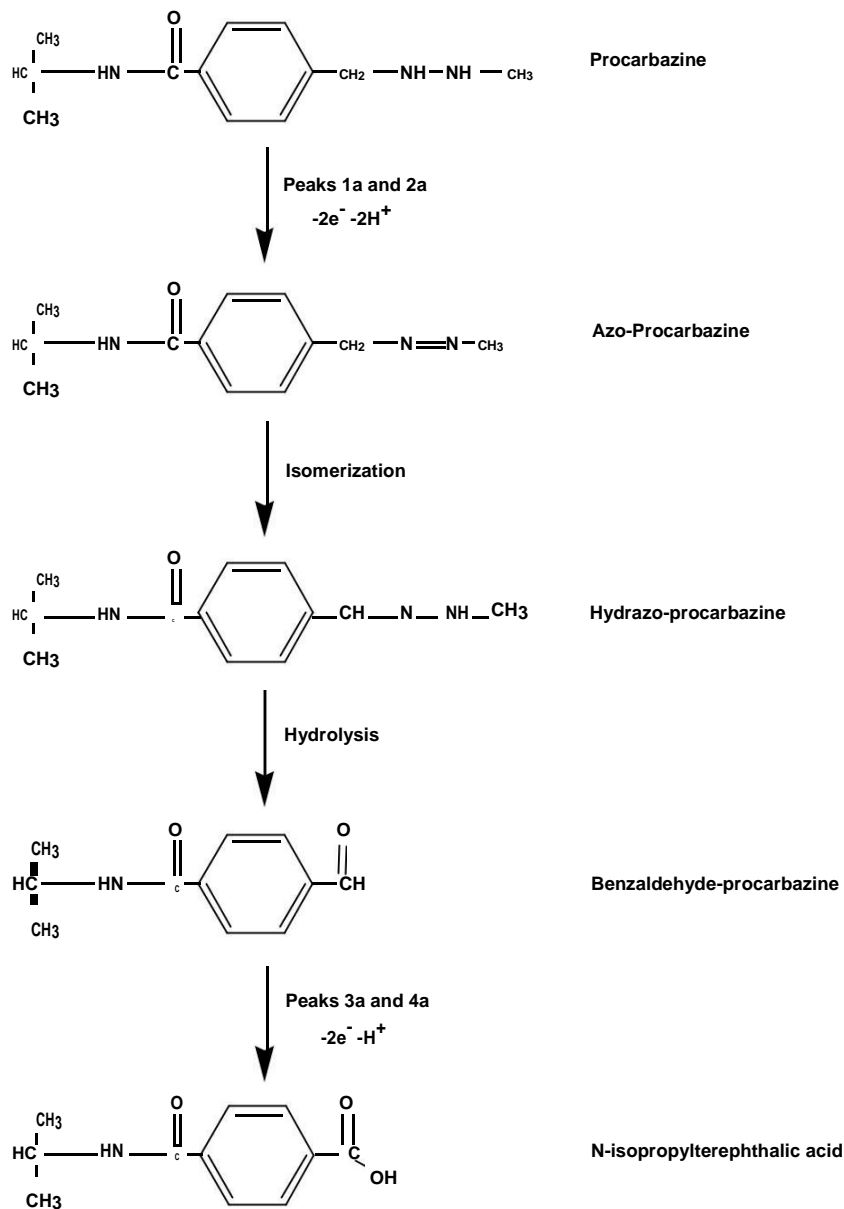
Electrochemical techniques are widely used in fundamental research to characterize the redox properties of drugs and biological compounds, mainly using polarographic and voltammetric techniques with different types of electrochemical substrates such as mercury and carbon electrodes, since the electrochemical data are correlated with the chemical structure and the pharmacological/biological activity of the species investigated, providing insights to help understanding biochemical mechanisms in living cells [7–18]. Recently numerous redox mechanisms of various antineoplastic drugs have been postulated from voltammetric studies [15–18].

To the best of our knowledge, the only electrochemical investigation of PCZ presented in the literature is a polarographic study of the influence of titanium (IV) ions, which are present on white cells of Hodgkin's and of leukemia patients, in the oxidation of PCZ by air, under physiological pH [19]. That study reveals that PCZ presents four reduction waves with half-wave potentials at 0.61, 0.93, 1.04 and 1.30 V and that titanium (IV) coordinates PCZ, causing a significant inhibition on its air oxidation, especially for oxidation catalyzed by copper (II) ions [19].

This work presents, for the first time, a study of the electrochemical oxidation mechanism of PCZ hydrate, for a wide range of solution conditions, using cyclic, differential pulse and square-wave voltammetry, at glassy carbon electrode.

[†] Corresponding author at: Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, 52071-030 Recife, PE, Brazil.

E-mail addresses: s.carlosb.oliveira@gmail.com, severinocarlos.oliveira@dq.ufrpe.br (S.C.B. Oliveira).



Scheme 1. Oxidation mechanism of PCZ.

2. Experimental

2.1. Materials and reagents

Procarbazine hydrochloride (PCZ) was obtained from Sigma and used without further purification. A stock solution of 300 μM PCZ was prepared in deaerated deionized water and stored in the dark at 4 °C.

Supporting electrolyte solutions of different pH/composition (2.0/HCl + KCl, 3.3/HOAc + NaOAc, 4.5/HOAc + NaOAc, 5.2/HOAc + NaOAc, 5.9/NaH₂PO₄ + Na₂HPO₄, 7.2/NaH₂PO₄ + Na₂HPO₄, 8.0/ NaH₂PO₄ + Na₂HPO₄, 9.2/NaOH + Na₂B₂O₇, 11.2/NaOH + Na₂HPO₄) were prepared using analytical grade reagents and purified water from a Millipore Milli-Q system (conductivity 6.0 μS cm⁻¹) with ionic strength I = 0.1 M according to the literature [20]. Microvolumes were measured using EP-10 and EP-100 Plus Motorized Microliter Pipettes (Rainin Instrument Co. Inc., Woburn, USA). The pH measurements were carried out on a Metrohm Herisau (Switzerland) pH-meter using a Scott Gerate glass combination electrode.

All experiments were done at room temperature, T = 298 K (25 °C).

2.2. Voltammetric parameters and electrochemical cell

Voltammetric experiments were carried out using a IAutolab potentiostat, running with GPES 4.9 software, Metrohm/Autolab, Utrecht, The Netherlands. Measurements were carried out using a GCE (d = 3.0 mm), a Pt wire counter electrode, and an Ag/AgCl (3 M KCl) as reference electrode, in a 2 mL one-compartment conventional electrochemical cell. The experimental conditions for differential pulse (DP) voltammetry were: pulse amplitude DE = 50 mV, pulse width Dt = 70 ms, and scan rate m = 5 mV/s. For square wave (SW) voltammetry the experimental conditions were: frequency f = 25 Hz and potential increment E = 2 mV, corresponding to an effective scan rate m_{effective} = 50 mV/s. The GCE was polished using diamond spray (particle size 1 μm, Kement, Kent, UK) before every electrochemical assay. After polishing, the electrode was rinsed thoroughly with Milli-Q water. Following this mechanical treatment, the GCE was placed in supporting electrolyte and

various voltammograms were recorded until a steady state base-line voltammogram was obtained. This procedure ensured very reproducible experimental results.

2.3. Acquisition and presentation of voltammetric data

All DP voltammograms presented were baseline-corrected by the moving average application with a step window of 2 mV included in the GPES version 4.9 software. This mathematical treatment improves the visualization and identification of peaks over the baseline without introducing any artefact, although the peak current is in some cases reduced (<10%) relative to that of the untreated curve. Nevertheless, this mathematical treatment of the original DP voltammograms was used in the presentation of all experimental DP voltammograms for a better and clearer identification of the peaks. The values for peak current presented in all graphs were determined from the original untreated voltammograms after subtraction of the baseline.

3. Results and discussion

3.1. Cyclic voltammetry

The oxidation of PCZ at a GCE was first investigated by cyclic voltammetry (CV) at a scan rate of 100 mV/s in 0.1 M phosphate buffer pH = 7.0, Fig. 1A. The successive CVs, obtained in a freshly prepared solution of PCZ 150 μ M in a potential range from 0.20 V to +1.30 V, showed four separated consecutive oxidation peaks: peak 1_a at E_{p1a} = +0.16 V, peak 2_a at E_{p2a} = +0.38 V, peak 3_a at E_{p3a} = +0.76 V and peak 4_a at E_{p4a} = +1.24 V. On scanning in the cathodic direction, no peaks were detected, demonstrating that all oxidation processes are irreversible in this pH. In the second scan a decrease in peak heights can be seen for the peaks 1_a and 4_a, while the two peaks, 2_a and 3_a, disappear due to strong adsorption of PCZ oxidation products on the GCE surface.

CVs were also carried out in a freshly prepared solution of PCZ 150 μ M in 0.1 M acetate buffer pH = 4.5 in a potential range from 0.20 V to +1.40 V, Fig. 1B. Four consecutive oxidation peaks: peak

1_a at E_{p1a} = +0.38 V, peak 2_a at E_{p2a} = +0.49 V, peak 3_a at E_{p3a} = +0.87 V and peak 4_a at E_{p4a} = +1.33 V, were also detected in that pH. However, the anodic peaks, 1_a and 2_a, are not fully separated and on the reversed scan, a small reduction peak (peak 5_c at E_{p5c} = +0.03 V) is observed.

In a new experiment with a clean electrode a CV was ran by inverting the scan direction before reaching the peak 3_a, where the peak 5_c was detected, Fig. 1C. So, the cathodic peak 5_c was assigned to PCZ oxidation products yielded in the oxidation processes associated to peak 1_a and/or 2_a. As will be seen later, this

cathodic peak is associated with the reduction of the electroactive product obtained after the second anodic step, since in acid media it is more stable, hydrolyzing only partially and enabling its electroreduction on the GCE surface.

CVs were also obtained for a 150 μ M solution of PCZ in pH = 7.0 at scan rates from 10 to 500 mV/s, Fig. 2. With the increase in the scan rates, the potential of the peak 1_a showed a small drift in the anodic direction and the peak currents increased linearly, indicating an adsorption-controlled electrode process, according to Laviron equation [21,22]. This is explained taking into consideration the adsorption of PCZ molecules on the GCE surface.

3.2. Differential pulse voltammetry

The influence of pH on the electrochemical oxidation of PCZ was studied in different electrolytes, using a 0.1 M ionic strength, over a pH range between 3.0 and 12.0, by using DP voltammetry.

DP voltammograms in freshly prepared solutions of PCZ 100 μ M confirmed that the oxidation process occurs in four steps, peaks 1_a, 2_a, 3_a and 4_a, Fig. 3A, in agreement to the above CVs experiments. However, in pH higher than 8 no peak was detected, showing that in alkaline pH there is a complete chemical degradation of the PCZ.

The peak potential is shifted to more negative values with increasing pH for peaks 1_a and 2_a, Fig. 3A and B, indicating the existence of an acid-base equilibrium where protons are involved in the process. Since there is a slope of 59 mV per pH unit for the peaks 1_a and 2_a, Fig. 3B, and a half-height width of the peaks, 120 mV and 66 mV, respectively, it can be concluded that both oxidation reactions involve one electron and one proton [7,22]. The graph of peak current 1_a vs. pH, Fig. 3A, points out an optimum sensitivity for the peak 1_a in neutral media, pH = 7.0, and for the peak 2_a in acid media, pH = 4.5.

For the peak 3_a, the electrochemical oxidation was clearly detected only in acid media and the peak potential shifted to more negative values with increasing pH, Fig. 3A and B. Since there is a slope of 59 mV per pH unit, Fig. 3B, and a half-height width of 63 mV for the peak 3_a, it can be concluded that the oxidation reaction involves one electron and one proton. The graph of peak current 3_a vs. pH, Fig. 3A, shows an optimum sensitivity in the pH range 4.0–5.0.

The potential of the peak 4_a is pH-independent, Fig. 3A and B. That means an oxidation process involving only electron transfer. The number of electrons transferred (n) was determined by the peak width at half height, corresponding to an electrochemical reaction involving the transfer of one electron [7,22].

Successive DP voltammograms were also recorded for a 100 μ M solution of PCZ, in physiological pH media, pH = 7.0, Fig. 4A and in

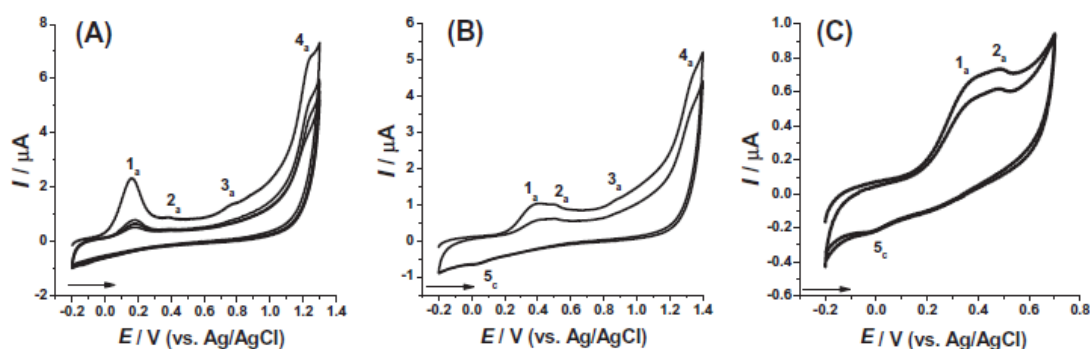


Fig. 1. Successive CVs in freshly prepared solution of PCZ 150 μ M in: (A) 0.1 M phosphate buffer, pH = 7.0 and (B and C) 0.1 M acetate buffer, pH = 4.5, $v = 100$ mV/s.

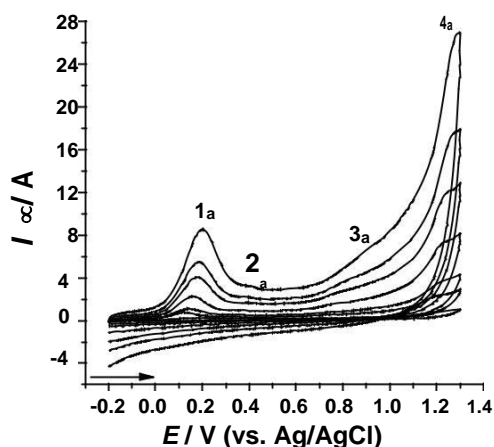


Fig. 2. CVs in freshly prepared solution of PCZ 150 μM in 0.1 M phosphate buffer, pH = 7.0, under different scan rates (10, 25, 50, 100, 200, 300 and 500 mV/s).

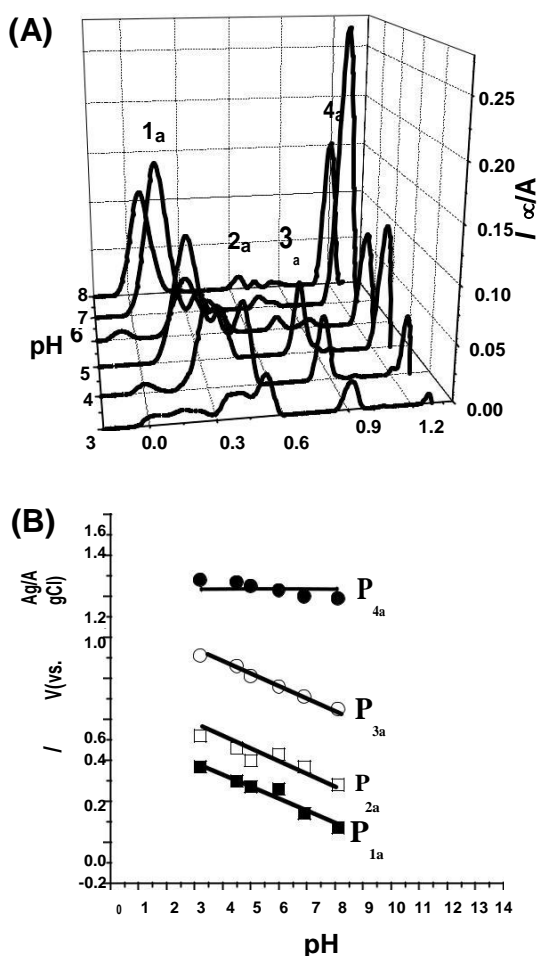


Fig. 3. (A) 3D graph of DP voltammograms of 100 μM PCZ as a function of pH ($m = 5$ mV/s); (B) plot of E_{pa} vs. pH: peak 1a (j), peak 2a (h), peak 3a (s) and peak 4a (d). The slope of the lines for peaks 1a, 2a and 3a is 59 mV per pH unit.

acid media, pH = 4.5 acetate buffer, Fig. 4B. The oxidation of PCZ in physiological pH in a potential range from 0.20 to 1.30 V showed four oxidation peaks in the first scan: peak 1a at $E_{\text{p}1\text{a}} = +0.08$ V, peak 2a at $E_{\text{p}2\text{a}} = +0.31$ V, peak 3a at $E_{\text{p}3\text{a}} = +0.67$ V and peak 4a at $E_{\text{p}4\text{a}} = +1.15$ V. But, during a second DP scan, only the peak 1a and 4a were observed, in a complete agreement with the above CV

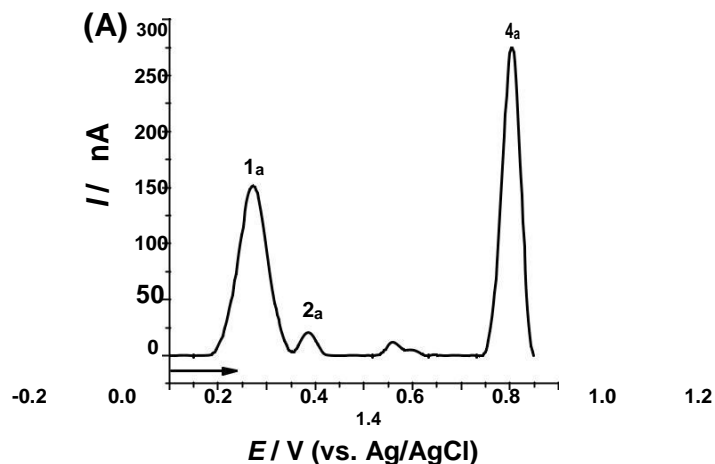


Fig. 4. DP voltammograms in freshly prepared solution of PCZ 100 μM in (A) 0.1 M phosphate buffer pH = 7.0 (B) 0.1 M acetate buffer, pH = 4.5, $m = 5$ mV/s.

experiments, Fig. 2A. The oxidation of PCZ in acid media in a potential range from 0.15 to 1.40 V, showed clearly all four oxidation processes, Fig. 4B. And during the successive DP scans a decrease of all anodic peaks current was observed, due to a strong adsorption of PCZ oxidation products on the GCE surface.

When compared DP voltammograms of PCZ in 0.1 M phosphate buffer pH = 7.0, Fig. 4A, to those ones obtained in 0.1 M acetate buffer pH = 4.5, Fig. 4B, a large decrease in peak heights can be seen for the peaks 2a and 3a in neutral pH, which can be explained considering that PCZ and some PCZ oxidation products are more stable in acid media [23].

3.3. Square wave voltammetry

Great advantages of SW voltammetry are the high speed of analysis, reduced problems with the poisoning of the electrode surface and the possibility to evaluate in a single scan the reversibility of the electrochemical process [7,22].

The SW voltammograms recorded in freshly prepared solutions of PCZ 100 μM in different electrolytes showed similar features to the DP voltammograms, exhibiting four oxidation peaks and the decrease in peak heights for the peaks 2a and 3a in buffer support-ing electrolytes with pH > 5, Fig. 5. In the second scan (not shown) a new reversible peak (5a, at $E_{\text{p}5\text{a}} = 0.12$ V) appeared related to the product formed in peak 1a or 2a, in agreement with CV results, Fig. 1B. The irreversibility of all peaks 1a, 2a, 3a and 4a was con-firmed by plotting the forward and backward components of the

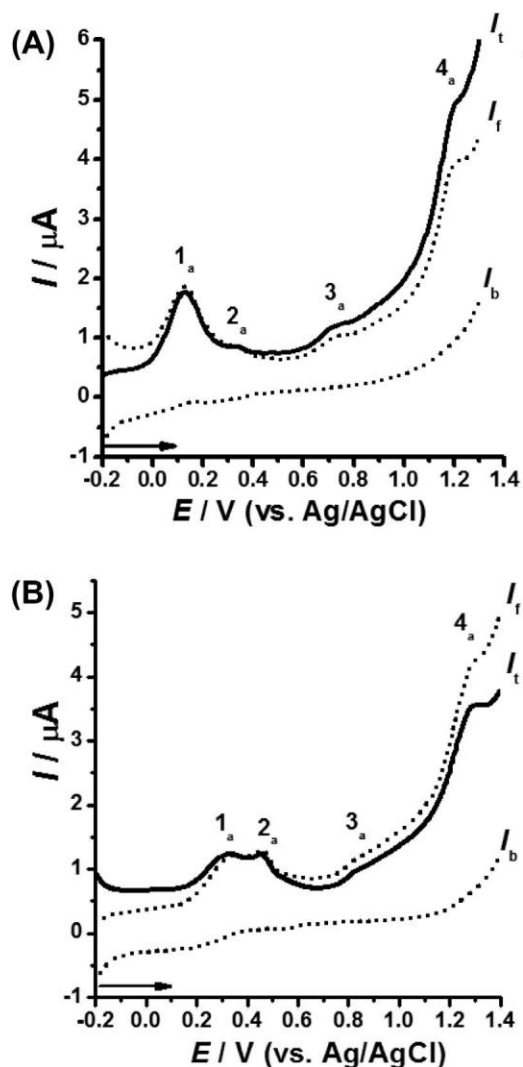


Fig. 5. SW voltammograms in freshly prepared solution of PCZ 100 μM in: (A) 0.1 M phosphate buffer, pH = 7.0 and (B) 0.1 M acetate buffer, pH = 4.5, $m_{\text{effective}} = 50 \text{ mV/s}$.

total current obtained in a solution of 100 μM PCZ prepared in pH = 7.0, Fig. 5A, and in pH = 4.5, Fig. 5B. Whereas the forward component showed all peaks at similar potentials as found by DP voltammetry and the backward component showed no cathodic peak.

In another experiment, successive SW voltammograms were recorded for a 100 μM solution of PCZ in a potential range from 0.00 to 0.30 V, in acid media, pH = 4.5 acetate buffer, inverting the scan direction before reaching the peak 2_a, where the peak 5_a was detected. So, the peak 5_a was assigned to PCZ oxidation products yielded in the oxidation processes associated to peak 1_a.

3.4. Oxidation mechanism of PCZ

Based on the electrochemical results discussed above and taking into account the well-known pathways for the chemical oxidation behaviour of PCZ [6], a four electrons oxidation mechanism for the oxidation of PCZ can be proposed. The mechanism involves three oxidation steps involving one-electron and one proton (peaks 1_a, 2_a and 3_a) and finally an oxidation step involving only one electron (peaks 4_a), Scheme 1.

In the first and second step, peak 1_a and 2_a, the oxidation process occurs on the hydrazine group with the production of azo-

procarbazine [6,26], following isomerization to hydrazo-procarbazine and after hydrolysis to benzaldehyde-procarbazine, Scheme 1. In acetate buffer pH = 4.5 an electroactive product was detected, peak 5_c, associated with the electroreduction of the azo-procarbazine, Scheme 1, since in acid media it is more stable, hydrolyzing only partially and enabling its reduction on the GCE surface. Considering the electrochemical results and that isomerization of azo derivatives to hydrazine and, after the hydrolysis, to aldehyde are favorable in aqueous media [6,23–25], the third and fourth steps, peaks 3_a and 4_a, are associated with the oxidation of the benzaldehyde-procarbazine with the production of the N-isopropylterephthalic acid, Scheme 1. This proposed mechanism was based on the CV, DP and SW voltammetry results taking into account the electron-donor character of the functional groups of the procarbazine molecule [26] and with data reported to PCZ by using other techniques [3,6,23–25,27,28].

4. Conclusion

The study shows that PCZ, a molecule with large range of clinical applications, undergoes oxidation in aqueous media at glassy carbon electrode giving rise to four oxidation waves.

The oxidation of PCZ is an irreversible adsorption-controlled process, where the first, second and third oxidation steps are pH dependent and occur with the transfer of one electron and one proton, leading to the formation of an electroactive product in acid media. The last anodic process is pH-independent and occurs with the transfer of one electron. The first and second peaks are associated with the oxidation of the hydrazine group, while the third and the last one are associated with the oxidation of the benzaldehyde-procarbazine derivative.

The electrochemical oxidation mechanism at GCE seems to follow pathways very similar to the chemical oxidation pathways early known in the literature, from in vitro and in vivo studies. Such agreement reinforces the importance of electrochemical studies of drugs on obtaining additional information to studies of their molecular biochemistry.

Acknowledgements

The authors wish to thank Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) from Brasil, for the financial support to this work.

References

- [1] C.D. Weekes et al., *J. Clin. Oncol.* 20 (2002) 1087.
- [2] K. Ogawa, Y. Hiraku, S. Oikawa, M. Murata, Y. Sugimura, J. Kawamura, S. Kawanishia, *Mutat. Res.* 539 (2003) 145.
- [3] B.K. Sinha, *Biochem. Pharmacol.* 33 (1984) 2777.
- [4] V. Pletsa, C. Valavanis, J.H.M. van Delft, M.J.S.T. Steenwinke, S.A. Kyrtopoulos, *Carcinogenesis* 18 (1997) 2191.
- [5] X. Hea, T.T. Batchelora, S. Grossmanb, J.G. Supkoa, *J. Chromatogr. B* 799 (2004) 281.
- [6] R.J. Wieinkam, D.A. Shiba, *Life Sci.* 22 (1978) 937.
- [7] C.M.A. Brett, A.M.O. Brett, *Electrochemistry: Principles, Methods and Applications*, Oxford Science University Publications, Oxford, 1993.
- [8] S.C.B. Oliveira, V.B. Nascimento, *Electroanalysis* 25 (2013) 2117.
- [9] S.C.B. Oliveira, I.B. Santarino, T.A. Enache, C. Nunes, J. Laranjinha, R.M. Barbosa, A.M. Oliveira-Brett, *Bioelectrochemistry* 94 (2013) 30.
- [10] T.A. Enache, A.M. Oliveira-Brett, *Bioelectrochemistry* 101 (2015) 46.
- [11] V. Dorc'ak, V. Ostatná, E. Palec'ek, *Electrochem. Commun.* 31 (2013) 80.
- [12] A. Rauf et al., *Spectrochim. Acta Mol. Biomol.* 138 (2015) 58.
- [13] W.F. Ribeiro et al., *Analyst* 138 (2013) 4565.
- [14] J. Rikhie, S. Sampath, *Electroanalysis* 17 (2005) 762.
- [15] F. Jelen, A. Erdem, E. Palec'ek, *Bioelectrochemistry* 55 (2002) 165.
- [16] A.D.R. Pontinha, C.M. Lombardo, S. Neidle, A.M. Oliveira-Brett, *Bioelectrochemistry* 101 (2015) 97.
- [17] S.C.B. Oliveira, I.B. Santarino, A.M. Oliveira-Brett, *Electroanalysis* 25 (2013) 1029.

- [18] A.D.R. Pontinha, S.M.A. Jorge, V.C. Diculescu, M. Vivan, A.M. Oliveira-Brett, *Electroanalysis* 24 (2012) 917.
- [19] J.P. McCue, J.H. Kennedy, *Bioinorg. Chem.* 7 (1977) 5.
- [20] R. Beynon, J. Easterby, *The Basics Buffer Solutions*, Oxford University Press, Oxford, 1996.
- [21] E. Laviron, *J. Electroanal. Chem.* 100 (1979) 263.
- [22] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, second ed., Wiley, New York, 2001.
- [23] D.L. Dunn, R.A. Lubet, R.A. Prough, *Cancer Res.* 39 (1979) 4555.
- [24] K. Florey, *Analytical Profiles of Drug Substances*, in: R.J. Rucki (Ed.), Academic Press, New York, 1976.
- [25] F.N. Dost, D.J. Reed, *Biochem. Pharmacol.* 16 (1967) 1741.
- [26] H. Lund, O. Hammerich (Eds.), *Organic Electrochemistry*, fourth ed., Marcel Dekker, New York, 2001.
- [27] A. Delipetar-Grudl, S. Solar, N. Getoff, *Anticancer Res.* 26 (2006) 405.
- [28] R.J. Rucki, A. Ross, S.A. Moros, *J. Chromatogr. A* 190 (1980) 359.