



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Wesley Bruno da Silva Machini

**MECANISMOS DE INTERAÇÃO DE FÁRMACOS E
PROTEÍNAS COM DNA DETETADOS *IN SITU* COM O
BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO MODIFICADO COM
NANOESTRUTURAS DE DNA**

Tese no âmbito do Doutoramento em Química, ramo de Eletroquímica, orientada pela Professora Doutora Ana Maria Coelho Ferreira de Oliveira-Brett e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Julho de 2019

Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra

MECANISMOS DE INTERAÇÃO DE
FÁRMACOS E PROTEÍNAS COM DNA
DETETADOS *IN SITU* COM O BIOSSENSOR
ELETROQUÍMICO MODIFICADO COM
NANOESTRUTURAS DE DNA

Wesley Bruno da Silva Machini

Tese no âmbito do Doutoramento em Química, ramo de Eletroquímica, orientada pela Professora Doutora Ana Maria Coelho Ferreira de Oliveira-Brett e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Julho de 2019



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

*“Podrán cortar todas las flores,
pero no podrán detener la primavera”*

Pablo Neruda

AGRADECIMENTOS

Mais um percurso da minha vida profissional e pessoal está por se encerrar e nada disso seria possível sem o auxílio e apoio de muitas pessoas, as quais gostaria de expressar a minha gratidão.

Primeiramente, expresso os meus sinceros e mais profundos agradecimentos à Professora Doutora Ana Maria Oliveira-Brett pela confiança depositada ao acolher-me no seu grupo de investigação. Ter cursado o doutoramento na Universidade de Coimbra deve-se principalmente por sua orientação e após estes 4 anos continuo com a certeza de que fiz a escolha correta. Para além dos conhecimentos científicos, a sua disponibilidade constante, o seu profissionalismo e a sua atenção para comigo foram fundamentais para minha evolução profissional e pessoal. Levarei seu exemplo sempre comigo.

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

Aos meus colegas do Laboratório de Eletroanálise e Corrosão do Instituto Pedro Nunes, Victor, Adrian, Catarina, Isaíde, Fátima, Lígia, Carlos, Isabel e João pelo companheirismo, pelos momentos de descontração e por estarem disponíveis quando necessário. Também, à Madi pelo auxílio com a impedância e à Dora com as imagens. À Ana por ter acompanhado toda minha trajetória no doutoramento e pela partilha de conhecimentos científicos.

Ao Ricardo, por ter me acolhido em sua vida, por ter me apoiado em cada passo, por ter sido minha inspiração e o motivo da minha felicidade depois de um dia difícil, por ter sido paciente na minha ausência, por sempre partilhar do seu amor e por ser minha família. Eu sou e sempre serei grato por tudo o que estamos a construir juntos.

Aos grandes amigos que encontrei em Coimbra e hoje estão espalhados pelo mundo, Jackson, Edir, João Adolfo, Adriana, Luísa, Caroline, Maurício, Madson,

Halisson, pela amizade, carinho e por terem aliviado a saudade do Brasil. Em especial, ao Eduardo e a Larissa, por terem me recebido na minha chegada a Portugal e por serem valiosos amigos nos bons e nem tão bons momentos. Onde quer que vocês estejam, estarei convosco em pensamento e coração.

À minha família, em especial meus pais, José Maurício e Juvenil, e minha irmã, Beatriz, que aprenderam a lidar com a minha ausência, com a saudade e com a distância, e ainda assim continuaram a apoiar minhas decisões, a incentivar meus sonhos e a vibrar com minhas conquistas.

Aos meus amigos do Brasil que mesmo após 4 anos distante continuam a fazer parte da minha vida e a torcer pelo meu sucesso.

Por fim, agradeço a CNPq/Brasil (232296/2014-6), por acreditar no potencial científico deste trabalho e apoiar seu desenvolvimento em todos os sentidos, especialmente no financeiro, e ao Instituto Pedro Nunes pelas condições disponibilizadas durante a realização dos trabalhos aqui apresentados.

RESUMO

O biossensor eletroquímico de DNA consiste num dispositivo em que o DNA é imobilizado na superfície de um transdutor eletroquímico, para detetar processos específicos de ligação com diferentes moléculas, monitorar as mudanças na estrutura conformacional do DNA após a interação com essas moléculas, e o aparecimento de resíduos das bases do DNA e dos seus produtos de oxidação, os biomarcadores do dano oxidativo do DNA. A interação entre o fármaco antiacne isotretinoína, o antibiótico daptomicina, o antileishmanial miltefosina, o antidiabético metformina, e o anticorpo monoclonal anticancro nivolumab com dsDNA foi investigada. Ademais, as interações do DNA bacterial da *Xylella fastidiosa* com o potencial agente pesticida Cu(II), bem como o DNA do timo de vitela e Cu(II) foram avaliadas. Inicialmente, o comportamento eletroquímico dos fármacos e proteína utilizados durante as interações com DNA foram investigados por meio de métodos eletroquímicos. As interações com DNA foram então avaliadas em soluções incubadas por voltametria de impulso diferencial, espectrofotometria no UV-Visível e/ou eletroforese em gel, e com biossensores eletroquímicos de dsDNA, poly[G] e poly[A], preparados na superfície dos elétrodos de diamante dopado com boro e carbono vítreo, por voltametria de impulso diferencial, espectroscopia de impedância eletroquímica e/ou microbalança de cristal de quartzo. Os métodos eletroquímicos mostraram-se eficientes tanto na investigação dos mecanismos de transferência de eletrões nos fármacos e proteína, como na interação destes com o DNA e com os biossensores eletroquímicos de dsDNA. Mudanças na conformação estrutural do dsDNA relacionadas com a condensação e/ou agregação, distorção e/ou abertura da dupla hélice, ligação das moléculas nos sulcos do DNA, libertação de resíduos de guanina e adenina, foram observadas e os mecanismos de interação foram propostos. Nas condições experimentais utilizadas todas as interações dos diferentes fármacos-dsDNA não foram eletroquimicamente detetados danos oxidativos na estrutura basal do DNA. Os biossensores eletroquímicos de DNA utilizados neste trabalho apresentam-se como uma metodologia de investigação rápida, *in situ* e em tempo real dos efeitos de diversas fontes de dano sobre o material genómico. Os estudos reportados poderão contribuir para uma melhor compreensão dos processos de interação que ocorrem *in vivo*, possibilitar o desenvolvimento de novas moléculas com potencial farmacológico e impulsionar o desenvolvimento de novos dispositivos voltados para a indústria, área da saúde, agricultura, baseados na deteção eletroquímica do DNA.

ABSTRACT

A DNA-electrochemical biosensor consists of a device in which the DNA is immobilized on the electrochemical transducer surface to detect specific binding processes with different molecules, to monitor changes in the DNA conformational structure after interaction with these molecules, and the appearance of DNA base residues and their oxidation products, the biomarkers of oxidative DNA damage. The interaction between the drugs, the antiacne isotretinoin, the antibiotic daptomycin, the antileishmanial miltefosine, the antidiabetic metformin, and the anticancer monoclonal antibody nivolumab with dsDNA was investigated. In addition, the interactions of the bacterial DNA from *Xylella fastidiosa* with the potential pesticidal agent Cu(II), as well as the calf thymus DNA and Cu(II) were evaluated. Initially, the electrochemical behaviour of the drugs and protein used during the DNA interactions were investigated using electrochemical methods. The interactions with DNA were then evaluated in incubated solutions by differential pulse voltammetry, UV-Visible spectrophotometry and/or gel electrophoresis, and with dsDNA-, poly[G]- and poly[A]-electrochemical biosensors, prepared on the boron-doped diamond and glassy carbon electrode surface, by differential pulse voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy and/or quartz crystal microbalance. Electrochemical methods proved to be efficient in the investigation of electron transfer mechanisms in drugs and protein, as well as in the interaction of these with dsDNA in incubated solutions and using dsDNA-electrochemical biosensors. Changes in the dsDNA structural conformation related to the condensation and/or aggregation, distortion and/or unwinding of the double helix, binding of the molecules in the DNA grooves, release of guanine and adenine residues were observed, and the interaction mechanisms were proposed. In the experimental conditions used during the different molecules-dsDNA and protein-dsDNA interactions oxidative damages in the DNA basal structure were not electrochemically detected. The DNA-electrochemical biosensors used in this work are presented as a methodology for rapid, *in situ* and real-time investigation of the effects of several sources of damage on the genomic material. The reported studies may contribute to a better understanding of the interaction processes occurring *in vivo*, to enable the development of new molecules with pharmacological potential and to promote the development of new devices aimed at industry, health and agriculture, based on the DNA electrochemical detection.

ÍNDICE

<i>Notação: Símbolos Principais</i>	IX
<i>Subscritos</i>	X
<i>Abreviaturas</i>	XI
<i>Constantes físicas fundamentais</i>	XII
1 Introdução	1
1.1 Contexto Histórico.....	4
1.2 Estrutura.....	5
1.3 Interações do DNA	8
1.4 Danos Oxidativos do DNA.....	10
1.5 Eletroquímica do DNA.....	11
1.6 Biossensores Eletroquímicos de DNA	21
1.7 Proteínas	25
1.7.1 Estrutura e Propriedades dos Aminoácidos	26
1.7.2 Propriedades Eletroquímicas dos Aminoácidos	32
1.7.3 Estrutura das Proteínas	34
1.7.4 Propriedades Eletroquímicas das Proteínas	39
1.8 Princípios da Eletroquímica.....	41
1.8.1 Técnicas de voltametria	45
1.8.1.1 Voltametria cíclica	47
1.8.1.2 Técnicas de degrau e impulso	53
1.8.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica.....	57
1.8.3 Microbalança de Cristal de Quartzo	62
2 Experimental	67
2.1 Materiais e Reagentes	69
2.2 Parâmetros Voltamétricos e Células Eletroquímicas.....	72
2.3 Pré-tratamento Eletroquímico da Superfície do BDDE.....	73
2.4 Pré-tratamento Mecânico e Eletroquímico do GCE.....	74
2.5 Preparação dos Biossensores Eletroquímicos de DNA	74
2.5.1 Biossensores eletroquímicos de dsDNA de camada fina em BDDE	75
2.5.2 Biossensores eletroquímicos de dsDNA de multicamada em GCE .	75
2.6 Preparação da Amostra e Determinação de 13- <i>cis</i> -RA em um Fármaco	76
2.7 Preparação da Amostra para Determinação de DPT em Fluido Biológico .	77
2.8 Oxidação eletroquímica do NIVO nativo e desnaturado.....	77
2.8.1 Oxidação Eletroquímica do NIVO Nativo em Solução.....	77
2.8.2 Oxidação Eletroquímica do Filme Espesso com Multicamadas de NIVO Nativo Adsorvido no GCE	78
2.8.3 Oxidação Eletroquímica do Filme Espesso com Multicamadas de NIVO Desnaturado Adsorvido no GCE	78
2.9 Cultura da bactéria e extração do DNA.....	79

2.10	Preparação e Incubação dos Biossensores Eletroquímicos de XF-dsDNA	80
2.11	Espectrofotometria na Região do Ultravioleta-Visível	81
2.12	Eletroforese em Gel.....	81
2.13	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica	81
2.14	Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo	82
2.15	Interações Fármacos-dsDNA e Proteína-dsDNA.....	82
2.15.1	Soluções incubadas	82
2.15.2	Biossensores eletroquímicos de dsDNA.....	83
2.16	Aquisição e Apresentação dos Dados	83
3	Antiacne Isotretinoína	85
3.1	Introdução	88
3.2	Estudo Eletroquímico e Analítico.....	91
3.2.1	Voltametria Cíclica.....	91
3.2.2	Voltametria de Impulso Diferencial	92
3.2.3	Voltametria de Onda Quadrada	94
3.2.4	Comportamento redox do <i>all-trans</i> -retinol e do ácido <i>all-trans</i> -retinóico	95
3.2.5	Determinação Espectrofotométrica	97
3.2.6	Curvas de Calibração.....	98
3.2.7	Determinação em Roacutan®	101
3.3	Investigação da Interação 13- <i>cis</i> -RA-dsDNA	102
3.3.1	Comportamento voltamétrico do 13- <i>cis</i> -RA, dsDNA, poly[G] e poly[A] revisado	102
3.3.2	Interação 13- <i>cis</i> -RA-dsDNA em Soluções Incubadas.....	103
3.3.2.1	Eletroquímica	103
3.3.2.2	Espectrofotometria UV-Visível.....	106
3.3.3	Interação 13- <i>cis</i> -RA-dsDNA utilizando Biossensores Eletroquímicos de dsDNA	107
3.3.4	Interação 13- <i>cis</i> -RA-dsDNA utilizando Biossensores Eletroquímicos de Poly[G] e Poly[A].....	109
3.4	Considerações Finais	114
4	Antibiótico Daptomicina.....	117
4.1	Introdução	120
4.2	Estudo Eletroquímico e Eletroanalítico	123
4.2.1	Voltametria Cíclica.....	123
4.2.2	Voltametria de Impulso Diferencial	124
4.2.3	Voltametria de Onda Quadrada	125
4.2.4	Efeito de Agentes Desnaturantes na Oxidação da Daptomicina	126
4.2.5	Comportamento Redox do Triptofano.....	127
4.2.6	Curvas de Calibração.....	129
4.2.7	Determinação em Fluido Biológico.....	130
4.3	Investigação da Interação DPT-dsDNA	131

4.3.1	Comportamento voltamétrico da DPT, dsDNA, poly[G] e poly[A] revisado.....	131
4.3.2	Interação DPT-dsDNA em Soluções Incubadas.....	132
4.3.2.1	Eletroquímica	132
4.3.2.2	Espectrofotometria UV-Visível.....	135
4.3.3	Interação DPT-dsDNA utilizando Biossensores Eletroquímicos de dsDNA.....	135
4.3.4	Interação DPT-dsDNA utilizando Biossensores Eletroquímicos de Poly[G] e Poly[A].....	137
4.4	Considerações Finais	141
5	Antileishmanial Miltefosina	145
5.1	Introdução	148
5.2	Estudo Eletroquímico	151
5.3	Investigação da Interação MTF-dsDNA.....	151
5.3.1	Interação MTF-dsDNA em Soluções Incubadas	151
5.3.1.1	Eletroquímica	151
5.3.1.2	Espectrofotometria UV-Visível.....	154
5.3.2	Interação MTF-dsDNA utilizando Biossensores Eletroquímicos de dsDNA	156
5.3.3	Interação MTF-dsDNA utilizando Biossensores Eletroquímicos de Poly[G] e Poly[A].....	159
5.4	Considerações Finais	162
6	Antidiabético Metformina	165
6.1	Introdução	168
6.2	Estudo Eletroquímico	171
6.3	Investigação da Interação MET-dsDNA	171
6.3.1	Interação MET-DNA em Soluções Incubadas	171
6.3.1.1	Eletroquímica	171
6.3.1.2	Espectrofotometria UV-Visível.....	174
6.3.2	Interação MET-dsDNA utilizando Biossensores Eletroquímicos de dsDNA.....	176
6.3.3	Interação MET-dsDNA utilizando Biossensores Eletroquímicos de Poly[G] e Poly[A].....	178
6.4	Considerações Finais	182
7	Anticorpo Monoclonal Anticancro Nivolumab	183
7.1	Introdução	186
7.2	Estudo Eletroquímico	190
7.2.1	Oxidação Eletroquímica do NIVO Nativo em Solução.....	190
7.2.2	Oxidação Eletroquímica do Filme Espesso com Multicamadas de NIVO Nativo Adsorvido em GCE.....	191
7.2.3	Oxidação Eletroquímica do Filme Espesso com Multicamadas de NIVO Desnaturado Adsorvido em GCE	193

7.2.4	CV do Filme Espesso com Multicamadas de NIVO Nativo e Desnaturado Adsorvido em GCE	198
7.2.5	EIS do Filme Espesso com Multicamadas de NIVO Nativo e Desnaturado Adsorvido em GCE	201
7.3	Investigação da Interação NIVO-dsDNA.....	204
7.3.1	Interação NIVO-dsDNA em Soluções Incubadas	204
7.3.1.1	Eletroquímica	206
7.3.1.2	Espectrofotometria UV-Vis.....	209
7.3.1.3	Eletroforese em gel.....	211
7.3.2	Interação NIVO-dsDNA utilizando Biossensores Eletroquímicos de dsDNA	213
7.3.2.1	Eletroquímica	213
7.3.2.2	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....	215
7.3.2.3	Microbalança de Cristal de Quartzo.....	221
7.3.3	Interação NIVO-dsDNA utilizando Biossensores Eletroquímicos de Poly[G] e Poly[A].....	223
7.4	Considerações Finais	225
8	<i>Xylella fastidiosa</i> e Cobre(II)	233
8.1	Introdução	236
8.2	Comportamento do Biossensor Eletroquímico de XF-dsDNA Bacterial..	239
8.3	CV dos Biossensores Eletroquímicos de XF- e CT-dsDNA	240
8.4	Investigação da Interação Cu(II)-dsDNA.....	243
8.4.1	Interação Cu(II)-XF-dsDNA utilizando Biossensores Eletroquímicos de XF-dsDNA.....	244
8.4.1.1	Eletroquímica	244
8.4.1.2	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....	246
8.4.2	Interação Cu(II)-CT-dsDNA utilizando Biossensores Eletroquímicos de CT-dsDNA.....	248
8.4.2.1	Eletroquímica	248
8.4.2.2	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....	250
8.5	Considerações Finais	253
9	Conclusões.....	255
10	Referências.....	261
11	Artigos Publicados	283

Notação: Símbolos Principais

		<i>Unidades</i>
A	área	m^2
Abs	Absorbância	a.u.
C	concentração	$mol\ cm^{-3}$ (M)
C	capacidade da dupla camada	F
e	carga do elétron	C
E	campo elétrico	$V\ m^{-1}$
E	potencial do eletrodo	V
	E^{θ} potencial formal	
	E_p potencial de pico	
	ΔE_s degrau de potencial	
E_F	energia de Fermi	eV
E_{redox}	energia do par redox	eV
f	frequência	Hz
	f_0 frequência fundamental do cristal de quartzo	
I	corrente elétrica	A
	I_b corrente inversa (<i>backward current</i>)	
	I_C corrente capacitiva	
	I_f corrente faradaica	
	I_f corrente direta (<i>forward current</i>)	
	I_p corrente de pico	
	I_t corrente total	
k	constante de velocidade homogénea	$m\ s^{-1}$
	k_0 constante de velocidade padrão	
	k_a constante de velocidade de oxidação	
	k_a constante de velocidade de redução	
n	número de elétrons transferidos	
Q	carga elétrica	C
Q	elemento de fase constante	F
R	resistência	Ω
	R_{ct} resistência à transferência de carga	

	R_{Ω}	resistência da solução numa célula	
t		tempo	s
T		temperatura	K
$W_{1/2}$		largura a meia-altura do pico	mV
X		reactância	Ω
Z		impedância	Ω
	Z'	parte real da Z	
	Z''	parte imaginária da Z	
α		coeficiente de transferência de carga	
α		parâmetro da rugosidade do eléctrodo	
Γ		concentração da espécie eletroativa	mol m ⁻²
θ		$\exp[(nF/RT)(E - E^0)]$	
μ		modo de cisalhamento do cristal de quartzo	g cm ⁻¹ s ⁻¹
ρ		densidade do cristal de quartzo	g cm ⁻³
σ		$\nu(nF/RT)$	
ν		velocidade de varrimento	V
λ		comprimento de onda	nm
	λ_{\max}	comprimento de onda na absorção máxima	
Φ		diâmetro	m
φ		ângulo de fase	
ω		frequência radial	rad s ⁻¹

Subscritos

a	anódico
c	catódico
f	final
i	inicial
max	valor máximo
min	valor mínimo
p	pico

Abreviaturas

13- <i>cis</i> -RA	Isotretinoína
2,8-DHA	2,8-dihidroxiadenina
2,8-oxoAde	2,8-oxoadenina
8-OHdG	8-hidroxi-2-desoxiguanosina
8-oxoGua	8-oxoguanina
A ou Ade	Adenina
AMP	Adenosina-5-monofosfato
AFM	Microscopia de força atômica
ATR	<i>All-trans</i> -retinol
ATRA	Ácido <i>all-trans</i> -retinol
BDDE	Eléctrodo de diamante dopado com boro
C	Citosina
CMP	Citidina-5-monofosfato
CV	Voltametria cíclica
CT	Timo de vitela
Cys	Cisteína
dAdo	Adenosina
dGuo	Guanosina
dsDNA	Ácido desoxirribonucleico de dupla hélice
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Impulso diferencial
DPT	Daptomicina
DTT	Ditiotreitol
EIS	Espectroscopia de impedância eletroquímica
GCE	Eléctrodo de carbono vítreo
G ou Gua	Guanina
GMP	Guanosina-5-monofosfato
GuaHCl	Hidrocloreto de guanidina
His	Histidina
HOPG	Grafite pirolítica altamente ordenada
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão

mAb	Anticorpo monoclonal
Met	Metionina
MET	Metformina
MTF	Miltefosina
NIVO	Nivolumab
NOS	Espécies reativas de nitrogénio
Poly[A]	Ácido poliadenílico
Poly[G]	Ácido poliguanílico
QCM	Balança de cristal de quartzo
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigénio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
ssDNA	Ácido desoxirribonucleico de simples hélice
SW	Onda quadrada
T	Timina
TMP	Timina-5-monofosfato
TCEP	Tris-(2-carboxietil)-fosfina
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
XF	<i>Xyllela fastidiosa</i>

Constantes físicas fundamentais

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

CAPÍTULO 1

Introdução

Passados mais de 60 anos desde a descoberta da estrutura do ácido desoxirribonucleico, mais comumente conhecido como DNA, uma molécula até então considerada obscura com funções acessórias ou estruturais presumidas dentro do núcleo e hoje considerada um ícone da biociência moderna, sua investigação permanece constante e progressivamente desafiadora.

A especificidade da sequência de DNA desempenha um papel crítico em vários processos biológicos e influencia uma gama diversa de fenômenos de reconhecimento molecular, incluindo interações fármacos-DNA, proteínas-DNA, oligômeros-DNA e ligandos-DNA.

Mas o que, exatamente, é o DNA? Quais elementos menores compõem essa molécula complexa, como estão organizados e como as informações são extraídas deles? Quais são suas atuais aplicações? Neste capítulo introdutório são apresentados os principais conceitos relacionados ao DNA, entre outros, os quais são fundamentais para o desenvolvimento e compreensão da investigação efetuada.

1.1 Contexto Histórico

O ácido desoxirribonucleico (DNA) foi descoberto em 1869 por Friedrich Miescher [1], porém seu papel fundamental na genética só foi reconhecido em meados do século XX. Os estudos realizados antes de 1900 já evidenciavam que os cromossomos são compostos de ácidos nucleicos e proteínas. No entanto, a aparente composição orientou os primeiros geneticistas que os ácidos nucleicos seriam apenas um componente estrutural dos cromossomos. O conceito sobre o armazenamento da informação genética estava associado a arranjos de diferentes proteínas ao longo do cromossomo. Esta ideia foi mantida até meados do século XX, quando foi então fortemente contestada por evidências resultantes de dois trabalhos fundamentais.

Em 1944, Oswald Avery, Maclyn McCarty e Colin MacLeod, continuando os trabalhos pioneiros de Frederick Griffith (1928) [2] e de Richard Sia e Martin Dawson (1931) [3], descobriram que o “ácido nucleico tipo desoxirribose purificado é o princípio transformante”, responsável pela transformação da forma não patogénica na forma patogénica da bactéria *Streptococcus Pneumoniae* [4].

Alguns anos mais tarde, em 1952, Al Hershey e Marta Chase [5] demonstraram definitivamente que são os ácidos nucleicos e não as proteínas os únicos capazes de infectar a bactéria *Escherichia Coli*. Este trabalho constituiu o segundo marco decisivo para a identificação do DNA como a macromolécula responsável pelo armazenamento e transmissão da informação genética.

Apenas com a descoberta da estrutura de dupla hélice do DNA em 1953 por James Watson e Francis Crick [6], foi possível esclarecer os mecanismos envolvidos na conservação, replicação e transcrição da informação genética. Esta descoberta impulsionou e renovou o interesse no estudo dos ácidos nucleicos, o que levou, entre outros avanços, à descoberta do código genético e fundou as bases da engenharia genética.

1.2 Estrutura

O ácido desoxirribonucleico (DNA) e o ácido ribonucleico (RNA) são biopolímeros, constituídos por unidades monoméricas denominadas nucleotídeos. Tanto o DNA como o RNA são formados por apenas quatro nucleotídeos diferentes. Cada nucleotídeo é composto por três fragmentos moleculares: um grupo fosfato, um açúcar e uma base heterocíclica. A unidade base-açúcar chama-se nucleosídeo. O açúcar, na forma cíclica furanósica, é a β -D-ribose no RNA e a β -D-2'-desoxiribose no DNA, sendo ligado ao fosfato pelo grupo hidroxilo do C5' e a uma das quatro bases heterocíclicas, por intermédio de uma ligação β na posição C1', **Figura 1.1**.

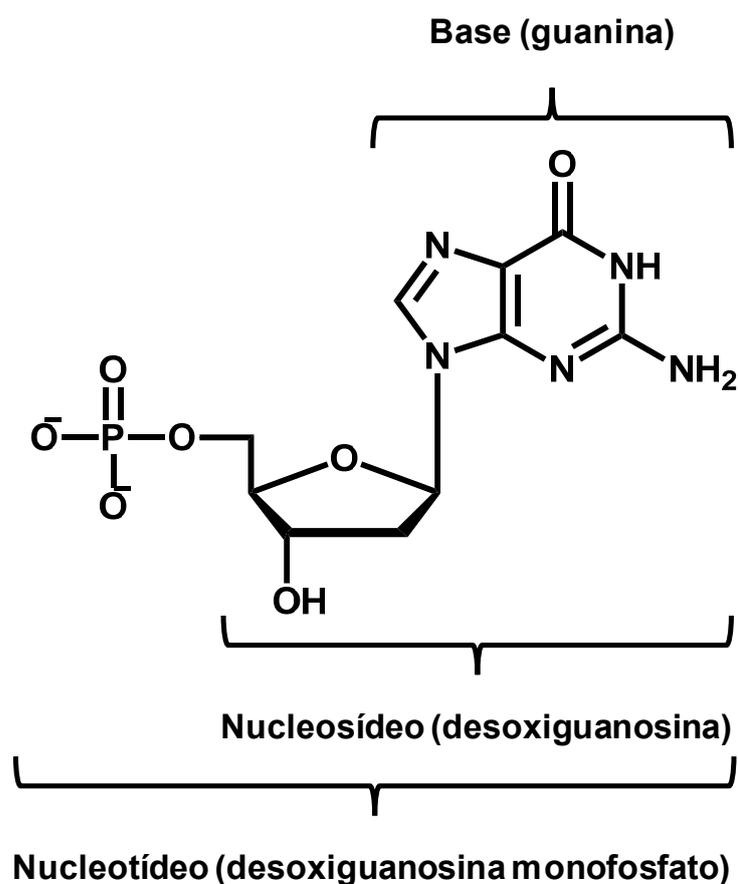


Figura 1.1. Representação estrutural de um nucleotídeo: a base (guanina), o nucleosídeo (desoxiguanosina) e o nucleotídeo (desoxiguanosina monofosfato).

As bases purínicas, adenina (6-aminopurina) e guanina (2-amino-6-oxopurina), e as bases pirimidínicas, citosina (4-amino-2-oxopirimidina) e timina (5-metil-2,4-dioxopirimidina), fazem parte da constituição do DNA, enquanto que no RNA a timina é substituída por uracil (2,4-dioxopirimidina), **Figura 1.2**. Além dos nucleosídeos básicos, derivados das bases heterocíclicas (adenina, guanina, citosina, timina e uracil), existe uma variedade de nucleosídeos modificados, de ocorrência natural ou modificados quimicamente, que além do papel estrutural podem apresentar funções independentes.

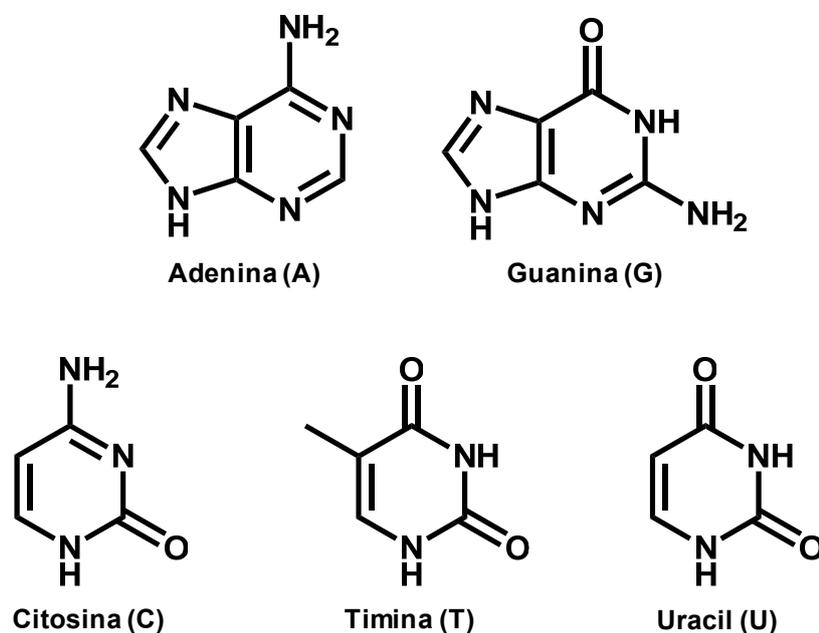


Figura 1.2. Representação estrutural das bases do DNA e RNA.

As unidades nucleotídicas estão ligadas por intermédio de ligações 3',5'-fosfodiéster formando a cadeia polinucleotídica, **Figura 1.3**. As partes açúcar-fosfato representam o esqueleto dos ácidos nucleicos com função apenas estrutural. Os grupos fosfato são carregados negativamente, o que confere ao DNA uma carga global negativa.

O trabalho publicado em 1953 por James Watson e Francis Crick [6] apresenta um modelo para a estrutura do DNA, proposto a partir dos estudos por difração de raios-X de cristais de um sal de DNA, efetuado por Rosalind Franklin e Maurice Wilkins [7].

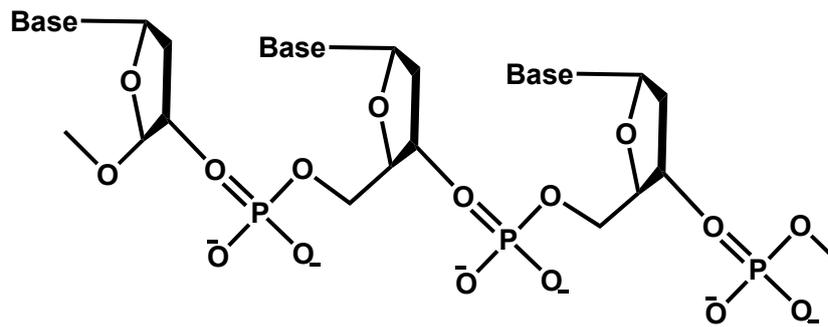


Figura 1.3. Representação estrutural de uma cadeia de DNA.

De acordo com o modelo proposto, o DNA apresenta duas cadeias de polinucleotídeos que se dispõem ao longo de um eixo comum, formando uma dupla hélice dextrógira (rodada sobre o eixo longitudinal da esquerda para a direita) regular. As duas cadeias estão dispostas de tal forma que as bases purínicas e pirimidínicas se encontram orientadas para o eixo longitudinal da dupla hélice, e dispostas num plano perpendicular a esse mesmo eixo, **Figura 1.4.**

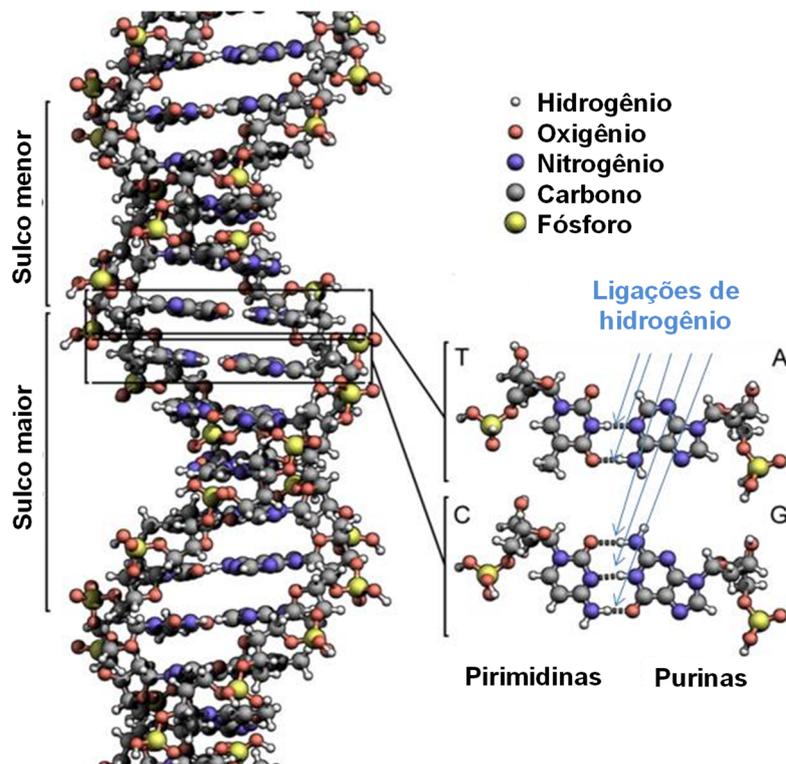


Figura 1.4. Representação da dupla hélice de DNA.

As bases purínicas e pirimídicas estão suficientemente próximas umas das outras conectadas por ligações de hidrogénio, o que confere a estabilidade da dupla hélice, e podem ser reversivelmente separadas quando as ligações de hidrogénio são rompidas.

Na dupla hélice é possível identificar topologicamente um sulco maior e outro menor. O sulco menor possui maior densidade de carga negativa quando comparado ao sulco maior. As ligações glicosídicas que ligam as bases aos esqueletos açúcar-fosfato encontram-se na configuração *cis* uma relativa à outra, resultando na existência de menos grupos funcionais de um lado do par de bases (expostos no sentido do sulco menor) do que no outro (exposto no sulco maior), **Figura 1.4**.

1.3 Interações do DNA

Considerando sua alta reatividade, diversas moléculas podem interagir reversível ou irreversivelmente com o DNA por meio de ligações covalentes, através da ligação direta da molécula ao DNA por suas bases nitrogenadas ou pelo grupo fosfato, de forma não-covalente através de interações eletrostáticas, interações com os sulcos do DNA, ou através da intercalação, **Figura 1.5**.

As principais formas de interação baseiam-se na intercalação, na qual pequenas moléculas se intercalam entre as bases heterocíclicas e aromáticas do DNA e induzem distorções estruturais, na ligação nos sulcos, onde as moléculas se ligam aos ácidos nucleicos através dos sulcos maiores ou menores, e por atração eletrostática, na qual a molécula carregada positivamente interage com os grupos fosfatos carregados negativamente dos nucleotídeos do DNA.

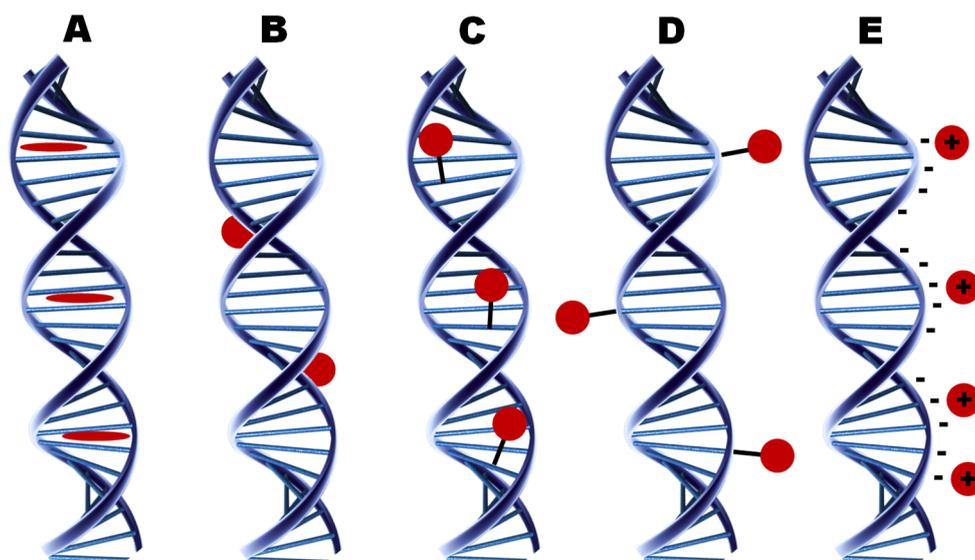


Figura 1.5. Representação esquemática de possíveis modos de interação entre o dsDNA e as espécies; **(A)** intercalação, **(B)** ligação aos sulcos, **(C)** ligação às bases nitrogenadas, **(D)** ligação aos grupos fosfatos e **(E)** interação eletrostática [8].

Diferentes métodos têm sido utilizados para caracterizar a natureza da interação de diferentes moléculas com DNA, bem como para elucidar as implicações das modificações estruturais do DNA e os aspetos mecanísticos e citotóxicos da ação fisiológica destas moléculas. Métodos como microscopia de força atómica (AFM) [9-11], eletroforese capilar [12] e em gel [13-15], espectrometria de massa-tandem [16, 17], espectroscopia de fluorescência [18-21], UV-Visível [18-20, 22], de ressonância magnética nuclear (NMR) [23, 24], Raman [19], de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) [18, 22, 25], ressonância plasmónica de superfície [26], viscosimetria [18] e eletroquímica [27-30].

O uso de métodos eletroquímicos na investigação dos mecanismos de interação entre as moléculas de interesse e o DNA é muito relevante, uma vez que as técnicas eletroquímicas apresentam resposta rápida, alta sensibilidade e utilizam uma pequena quantidade de amostra. Além disso, os métodos eletroquímicos têm a vantagem de melhorar a relação sinal-ruído em comparação com as técnicas de estado estacionário e, na maioria dos casos, maior seletividade.

1.4 Danos Oxidativos do DNA

As moléculas de DNA sofrem constantemente danos em consequência da ação de agentes genotóxicos. No entanto, a fim de salvaguardar sua integridade genética, as células fazem uso de complexos mecanismos que evitam alterações na sequência de bases do DNA, os quais atuam a substituir nucleotídeos erroneamente incorporados durante a replicação do DNA ou nucleotídeos que sofreram alterações químicas no decorrer da vida da célula.

A alteração de qualquer sequência nucleotídica do DNA pode ser classificada como mutação. As mutações podem ocorrer pela simples substituição de um par de bases, pela remoção e inserção de uma ou algumas bases ou ainda corresponder a alterações maiores na estrutura de um cromossoma.

Nos últimos anos diversos estudos têm relatado a existência de uma correlação entre o crescimento desordenado de células (tumores) e a existência de danos de natureza oxidativa no DNA [31]. Elevadas concentrações de vários produtos resultantes de danos oxidativos no DNA foram detetadas em tecidos de cancro de mama, pulmão, cólon, estômago, ovário e cérebro, em relação aos respetivos níveis presentes no DNA de áreas adjacentes [32].

No entanto, os níveis detetados de danos oxidativos variam de acordo com a metodologia utilizada, sendo as mais comuns: cromatografia líquida de alta eficiência com deteção eletroquímica (HPLC-EC) ou com espectrometria de massa tandem, cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massa (GC/MS), métodos enzimáticos e de marcação com fósforo radioativo (P^{32}), o que ainda causa grande debate na área [33].

O principal produto de oxidação do DNA, o qual é mais detetado e quantificado no processo de monitorização, é o produto da oxidação da base guanina, a 8-oxoguanina (8-oxoGua) [34], uma vez que de todas as bases é a mais facilmente oxidável, sendo por isso o alvo primordial dos danos causados por oxidação do DNA dentro da célula [35].

Investigações acerca das propriedades da 8-oxoGua foram realizadas e revelaram que a 8-oxoGua é uma lesão mutagénica em bactérias e células de mamíferos, que ocasiona principalmente transversões. Transversões são mutações pontuais significativas uma vez que, caso os danos não sejam reparados por uma das enzimas reparadoras específicas, ocorre a incorporação errada de uma base purínica em vez de uma base pirimidínica no lado oposto ao dano oxidativo durante a replicação do material genético e são muito encontradas em genes supressores de tumor e proto-oncogenes mutados [36]. Outros estudos de mutagénese sítio-específica mostraram que 2,8-dihidroxiadenina, timina glicol, 5-hidroxiuracila, uracilo glicol e 5-hidroxi-desoxicitidina, entre outros, também conduzem a lesões mutagénicas [31].

A natureza dos agentes oxidantes que ocasionam os danos oxidativos no DNA e principalmente os seus mecanismos de reação é objeto de estudo em diversas investigações, que incluem produtos normais do metabolismo celular, como espécies reativas de oxigénio (ROS), produtos da peroxidação lipídica, agentes alquilantes estrógenos, espécies reativas de nitrogénio (NOS) e certos intermediários de algumas vias metabólicas, e fontes exógenas inevitáveis, tais como a radiação UV, a radiação ionizante, radioisótopos de ocorrência natural e numerosas substâncias químicas presentes naturalmente ou como contaminantes na dieta e no ar [37-39].

1.5 Eletroquímica do DNA

As técnicas eletroquímicas são imprescindíveis na análise qualitativa e quantitativa de muitos compostos orgânicos e na investigação da composição e estrutura de iões e moléculas eletroquimicamente ativas em níveis de concentração muito baixos. Sendo, portanto, importantes na análise estrutural dos ácidos nucleicos, como também em sua determinação em baixos níveis de concentração.

A compreensão do comportamento redox do DNA e dos seus componentes é fundamental para a conceção de novos dispositivos tecnológicos e nas suas aplicações bem-sucedidas. Diante disto, estudos eletroquímicos das bases do DNA, purínicas e pirimidínicas [40, 41], além de oligonucleotídeos [42], bem como DNA, têm sido realizados utilizando diferentes técnicas eletroquímicas nos mais diversos tipos de transdutores eletroquímicos, como por exemplo, mercúrio [43], prata [44, 45], grafite pirolítica [46, 47], carbono vítreo [48-51], diamante dopado com boro [52-54], entre outros [40, 55, 56].

As investigações do comportamento redox das bases do DNA evidenciaram que todas as bases, adenina, guanina, citosina e timina, são oxidadas em solução aquosa em elétrodos de carbono por um mecanismo de transferência de eletrão dependente do pH [51, 57]. A oxidação eletroquímica da guanina ocorre mais facilmente, portanto para potenciais menos positivos, seguida pela oxidação da adenina. A oxidação eletroquímica das bases pirimidínicas, timina e citosina, ocorre para potenciais mais elevados [51], sendo os picos influenciados pela evolução do oxigénio e consequentemente mais difíceis de serem detetados, **Figura 1.6**.

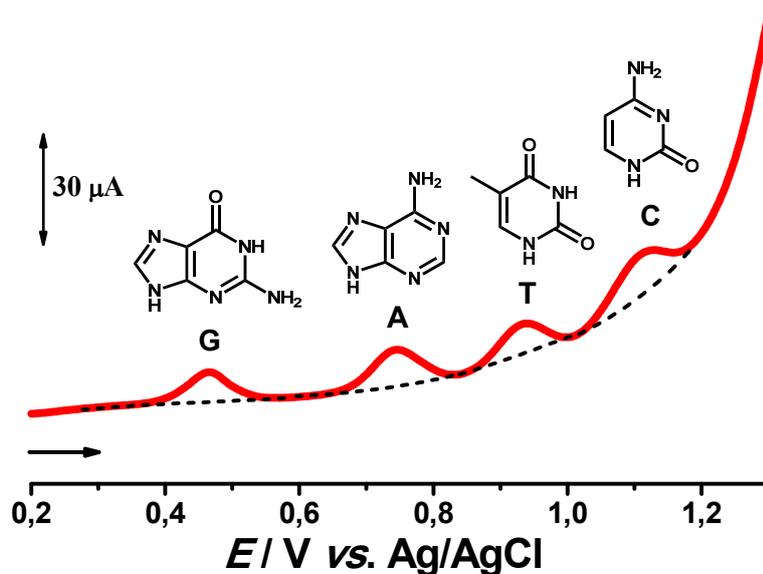


Figura 1.6. Voltamogramas de DP para (—) 20 μM de guanina (G), adenina (A), timina (T) e citosina (C), em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 utilizando elétrodo de carbono vítreo. Amplitude de impulso 50 mV, largura do impulso 70 ms, velocidade de varrimento 5 $mV s^{-1}$ [51].

A oxidação da guanina é um processo irreversível que ocorre em duas etapas, **Figura 1.7 (A)**. O primeiro passo é a oxidação da guanina à 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoGua), que é um processo irreversível envolvendo dois prótons e dois elétrons. A 8-oxoGua é considerada um biomarcador de danos no DNA por estresse oxidativo [58, 59] e pode ser facilmente detetada por voltametria de pulso diferencial [60, 61].

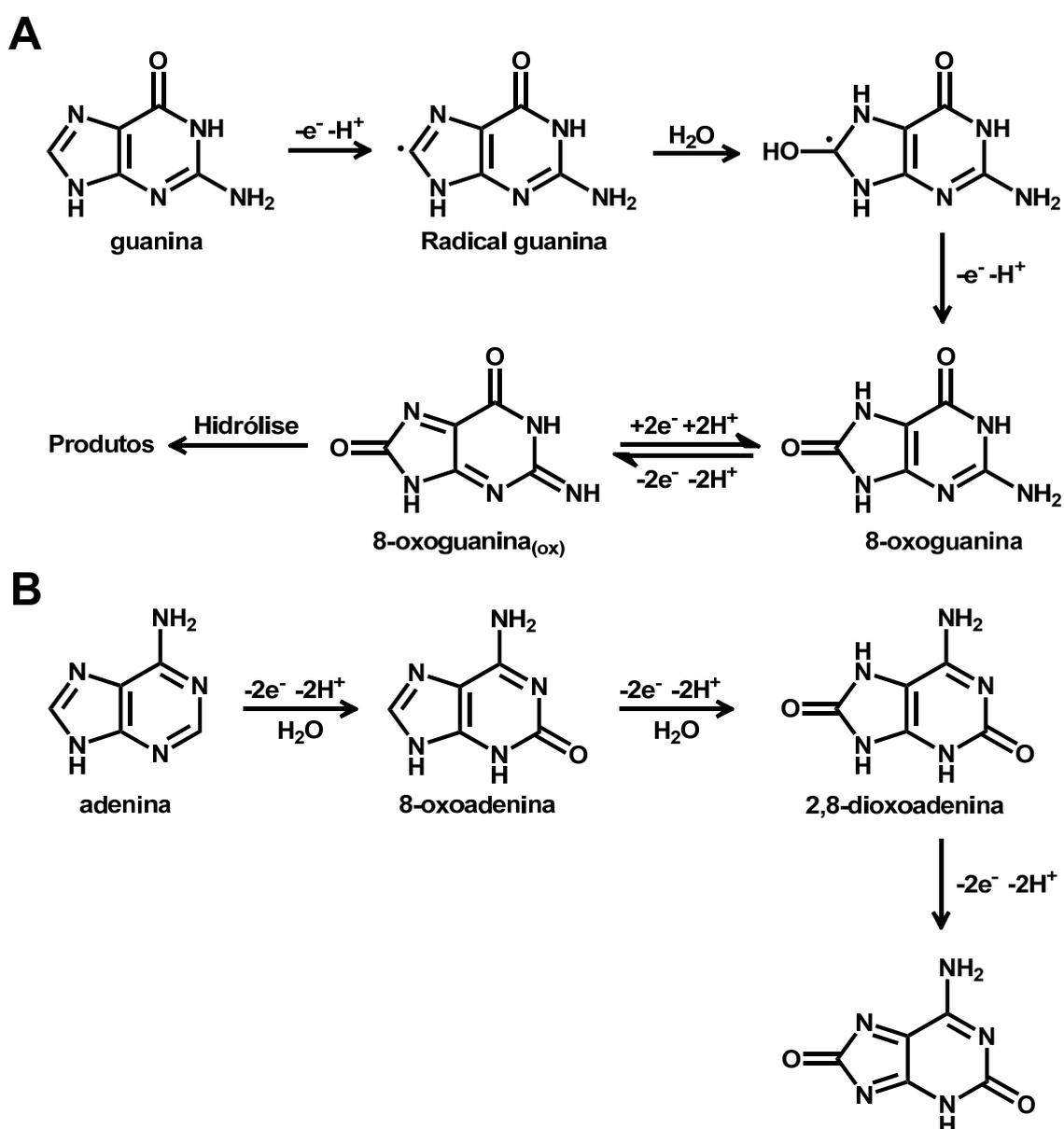


Figura 1.7. Mecanismos de oxidação eletroquímica das bases purínicas (A) guanina e (B) adenina em solução aquosa [62].

O segundo passo é a oxidação da 8-oxoGua à 8-oxoGua_(ox) em uma reação reversível envolvendo dois prótons e dois elétrons, que é rapidamente hidrolisada. Sendo assim, o mecanismo da oxidação completo da guanina ocorre em duas etapas envolvendo quatro prótons e quatro elétrons, **Figura 1.7 (A)**.

No caso da adenina, sua oxidação eletroquímica é um processo irreversível que ocorre em três etapas, **Figura 1.7 (B)**. O primeiro passo é a oxidação da adenina à 8-oxoadenina (8-oxoAde) em um processo irreversível envolvendo dois prótons e dois elétrons. O segundo passo é a oxidação da 8-oxoAde à 2,8-dioxoadenina (2,8-oxoAde) em um processo irreversível envolvendo dois prótons e dois elétrons. A 2,8-oxoAde é outro biomarcador de danos oxidativos no DNA e pode ser detectada por voltametria de impulso diferencial [61]. Por fim, a 2,8-oxoAde é oxidada à 2,8-oxoAde_(ox) em um processo irreversível envolvendo dois prótons e dois elétrons. Dessa forma, o mecanismo completo de oxidação da adenina ocorre em três etapas irreversíveis envolvendo seis elétrons e seis prótons [61].

Os mecanismos da oxidação das bases pirimidínicas citosina e timina, **Figura 1.8 (A) e (B)**, são semelhantes e envolvem o ataque nucleofílico da água aos cátions radicais, produzindo os cátions radicais de citosina e timina, e as vias de desprotonação dos cátions radicais para formar os radicais das bases de citosina e timina, levando as espécies radicais à oxidação da citosina [49, 63] e à oxidação da timina [64]. A oxidação subsequente da citosina ou timina oxidada levará a reações radicais com espécies oxigenadas ou até mesmo oxigênio molecular para fornecer produtos estáveis ou reações de decomposição adicionais.

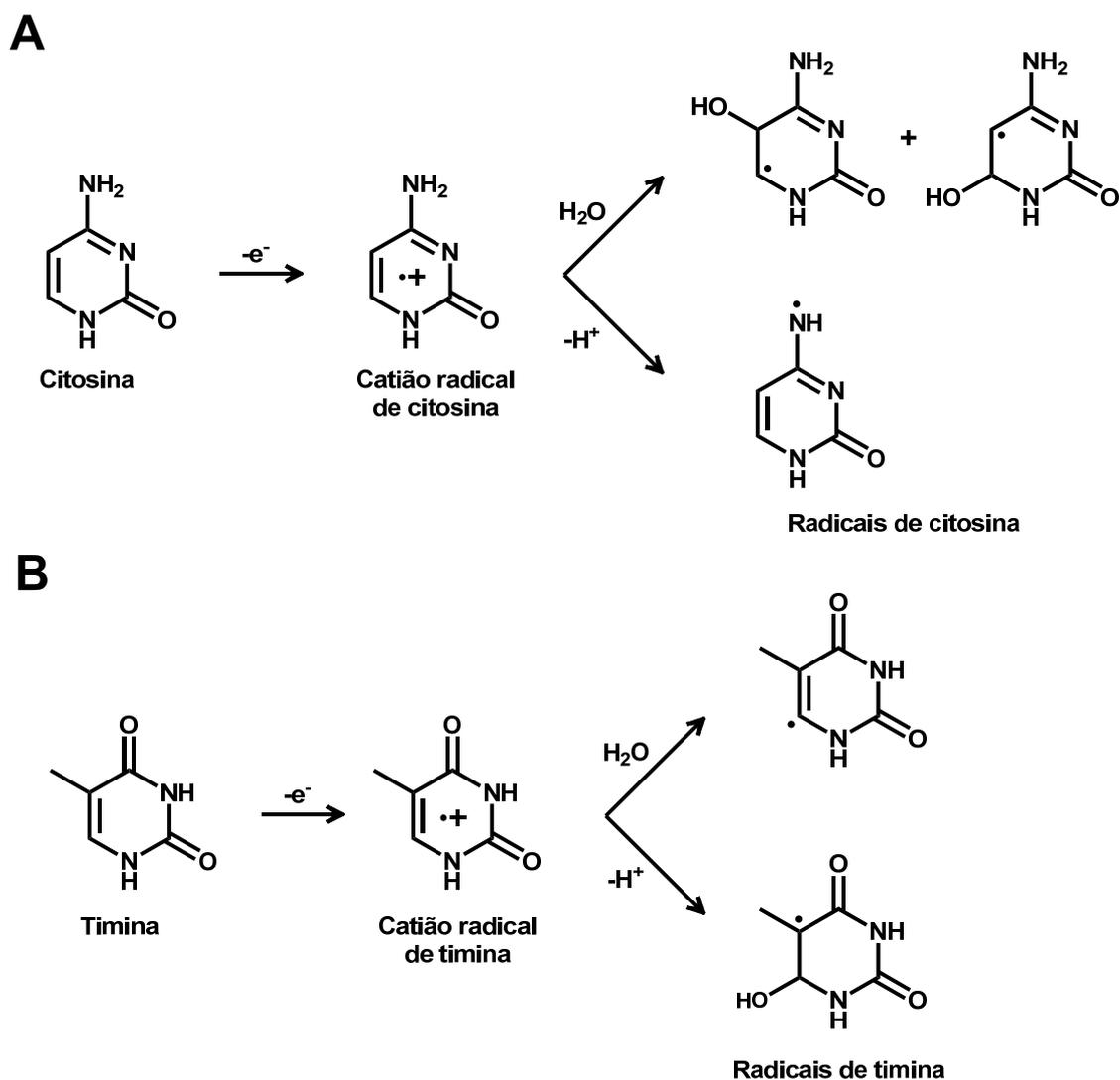


Figura 1.8. Mecanismos de oxidação eletroquímica das bases pirimidínicas **(A)** citosina e **(B)** timina em solução aquosa [62].

Misturas equimolares de todas as quatro bases e também dos seus nucleosídeos e nucleotídeos foram analisadas em pH próximo ao fisiológico, **Figura 1.9**, e as intensidades de corrente observadas para as bases pirimidínicas são menores do que as observadas para as bases purínicas [51]. Os respectivos nucleosídeos e nucleotídeos purínicos e pirimidínicos são todos eletroativos e oxidam-se a potenciais aproximadamente 200 mV mais positivos que as bases livres [51], o que sugere que a oxidação dos nucleosídeos e nucleotídeos é influenciada pela presença do grupo açúcar.

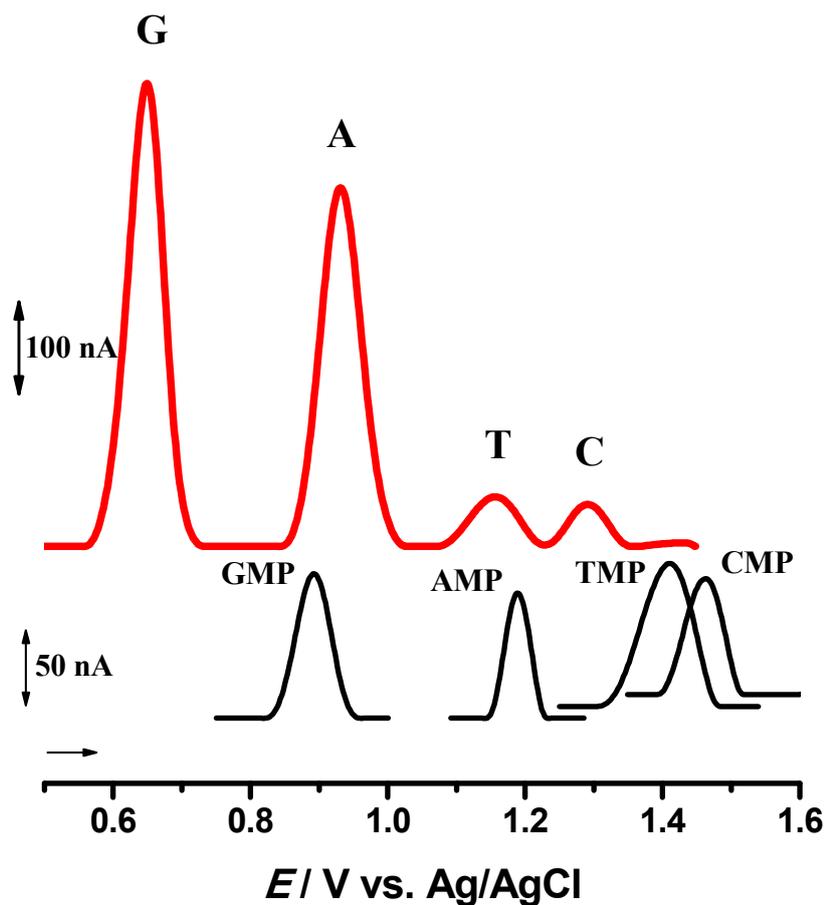


Figura 1.9. Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, para (—) 20 μM mistura equimolar de guanina (G), adenina (A), timina (T) e citosina (C), (—) 20 μM guanosina-5-monofosfato (GMP), (—) 20 μM adenosina-5-monofosfato (AMP), (—) 500 μM timina-5-monofosfato (TMP), (—) 500 μM citidina-5-monofosfato (CMP) em solução tampão fosfato 0,1 M pH7,4 utilizando elétrodo de carbono vítreo. Amplitude de impulso 50 mV, largura do impulso 70 ms, velocidade de varrimento 5 mV s^{-1} [51].

Devido à complexidade da estrutura dos ácidos nucleicos é importante investigar moléculas semelhantes a fim de obter informações sobre o comportamento eletroquímico dos mesmos, por exemplo, os polihomonucleotídeos sintéticos, cujas estruturas são semelhantes às estruturas do DNA. Nos polihomonucleotídeos apenas uma base purínica ou pirimidínica está presente em sua estrutura, **Figura 1.10**, o que facilita a interpretação dos dados e permite esclarecer o comportamento do DNA pela comparação de ambos os resultados obtidos.

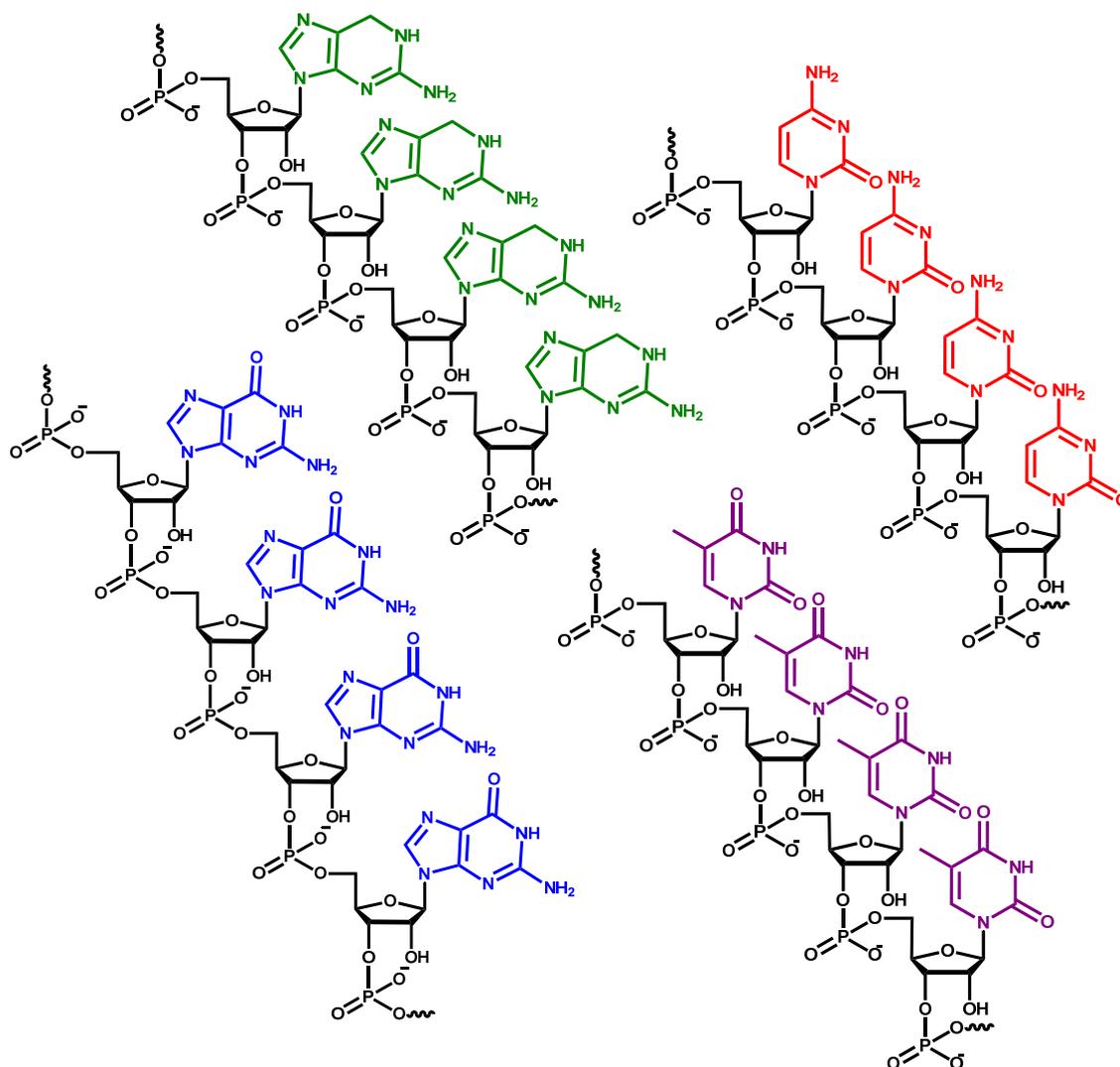


Figura 1.10. Representação estrutural dos polihomonucleotídeos: poliguanosina em azul, poliadenosina em verde, policitidina em vermelho, politimina em roxo.

A oxidação eletroquímica dos polihomonucleotídeos de todas as bases, nomeadamente poly[G], poly[A], poly[C], poly[T] e poly[U] foi investigada utilizando eletrodo de carbono, **Figura 1.11**, e os resultados obtidos indicaram que, os polihomonucleotídeos são oxidados eletroquimicamente em potenciais iguais aos seus correspondentes nucleotídeos [64].

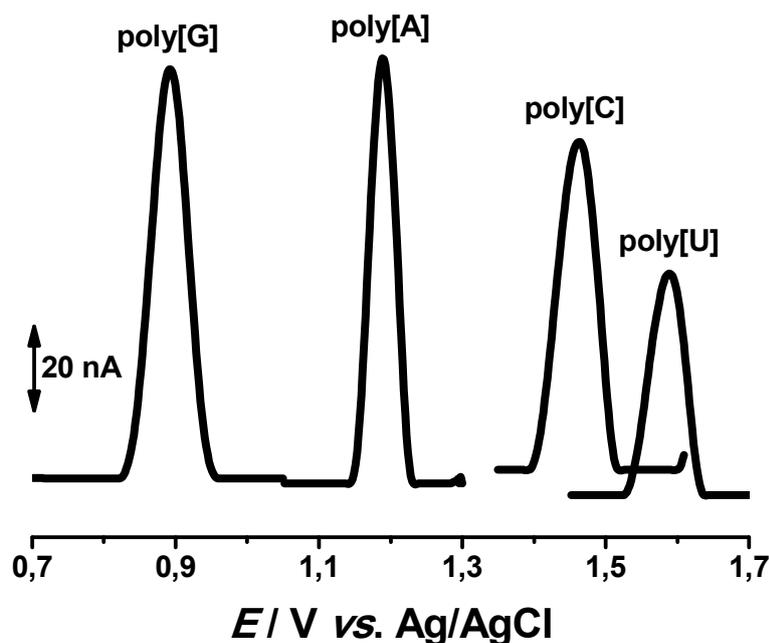


Figura 1.11. Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, para $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ poly[G], $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ poly[A], $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ poly[C] e $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ poly[U], em solução tampão fosfato $0,05 \text{ M}$ pH 7,1 utilizando eletrodo de carbono vítreo. Amplitude de impulso 50 mV , largura do impulso 70 ms , velocidade de varrimento 5 mV s^{-1} [64].

A oxidação eletroquímica do DNA por voltametria de impulso diferencial em tampão acetato pH 4,5 utilizando eletrodo de carbono vítreo, resulta no aparecimento de dois picos de oxidação bem separados e definidos, os quais podem ser usados como sondas individuais dos pares adenina-timina (AT) e guanina-citosina (GC) na dupla hélice do DNA [48, 65]. O primeiro pico, em potencial menos positivo, está associado à oxidação eletroquímica dos resíduos de desoxiguanosina, em $E_{pa} = +0,99 \text{ V}$, enquanto o segundo pico deve-se à oxidação eletroquímica dos resíduos de desoxiadenosina, em $E_{pa} = +1,26 \text{ V}$, oriundos das cadeias nucleotídicas do DNA, **Figura 1.12 (—)**. Com o aumento do pH, os picos de oxidação são deslocados linearmente no sentido menos positivo.

Uma diferença na intensidade das correntes dos picos de oxidação do DNA de cadeia simples (ssDNA) em relação ao DNA de cadeia dupla (dsDNA) pode ser observada, **Figura 1.12**, a qual está relacionada com a maior dificuldade na transferência de carga a partir do interior da dupla hélice na superfície do eletrodo, em comparação com uma única

hélice com resíduos em estreita proximidade com a superfície do elétron. Sendo assim, uma amostra contendo DNA pode ser facilmente distinguida em dupla hélice ou em cadeia simples. Consequentemente, o comprimento das cadeias dos ácidos nucleicos influenciam diretamente a corrente dos picos de oxidação das bases purínicas, onde as cadeias menores apresentam maiores correntes de pico [66].

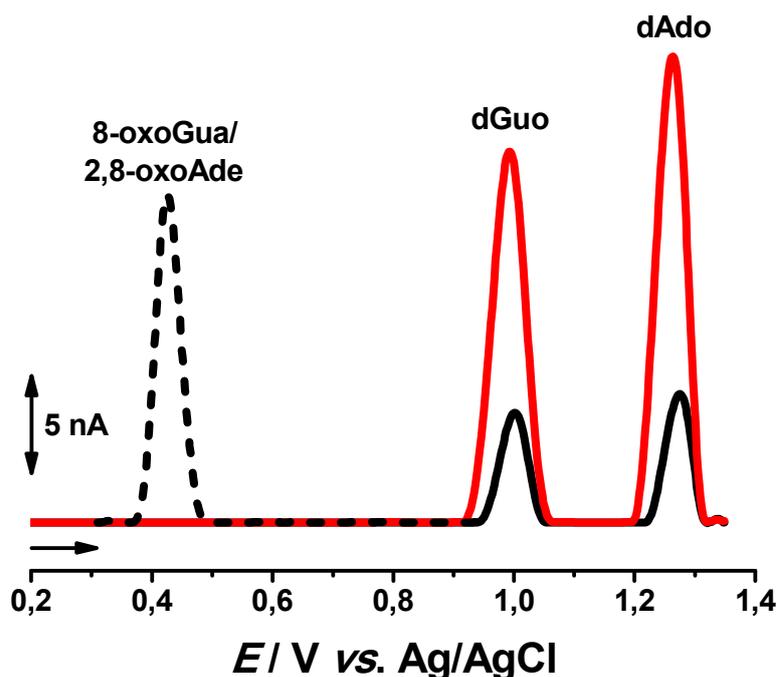


Figura 1.12. Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, obtidos com elétron de carbono vítreo, em tampão acetato 0,1 M pH 4,5, para (—) $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ ssDNA, (—) $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA e (- - -) $5 \mu\text{M}$ 8-oxoGua ou 2,8-oxoAde. Amplitude de impulso 50 mV, largura do impulso 70 ms, velocidade de varrimento 5 mV s^{-1} [67].

A presença dos biomarcadores do dano oxidativo do DNA, o produto da oxidação da guanina, 8-oxoGua, e/ou o produto da oxidação da adenina, 2,8-oxoAde, pode ser detetada por voltametria de DP [60, 68], após a interação com as moléculas de interesse. O potencial de oxidação para ambos biomarcadores é semelhante, $E_{\text{pa}} = +0,45\text{V}$ em tampão acetato 0,1 M pH 4,5, o qual é menor do que os potenciais de oxidação do DNA ou seus componentes em separado, **Figura 1.12** (- - -), sugerindo assim que é possível detetar simultaneamente, em um único ensaio voltamétrico, se o DNA se encontra em cadeia simples, dupla ou se sofreu danos oxidativos basais.

A 8-oxoguanina em solução aquosa apresenta formas tautoméricas das quais, de acordo com estudos de RMN [69], o 6,8-diceto (I) é predominante, **Figura 1.13** e **Figura 1.14 (A)**.

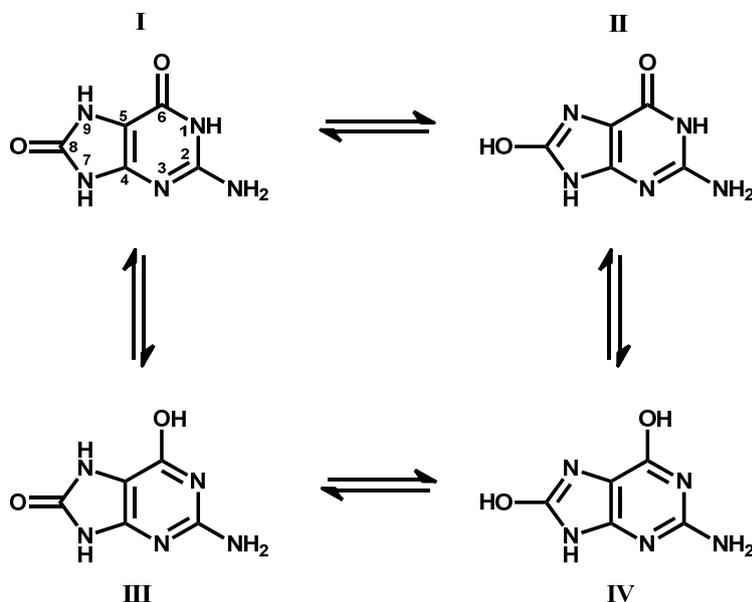


Figura 1.13. Formas tautoméricas da 8-oxoguanina em solução aquosa.

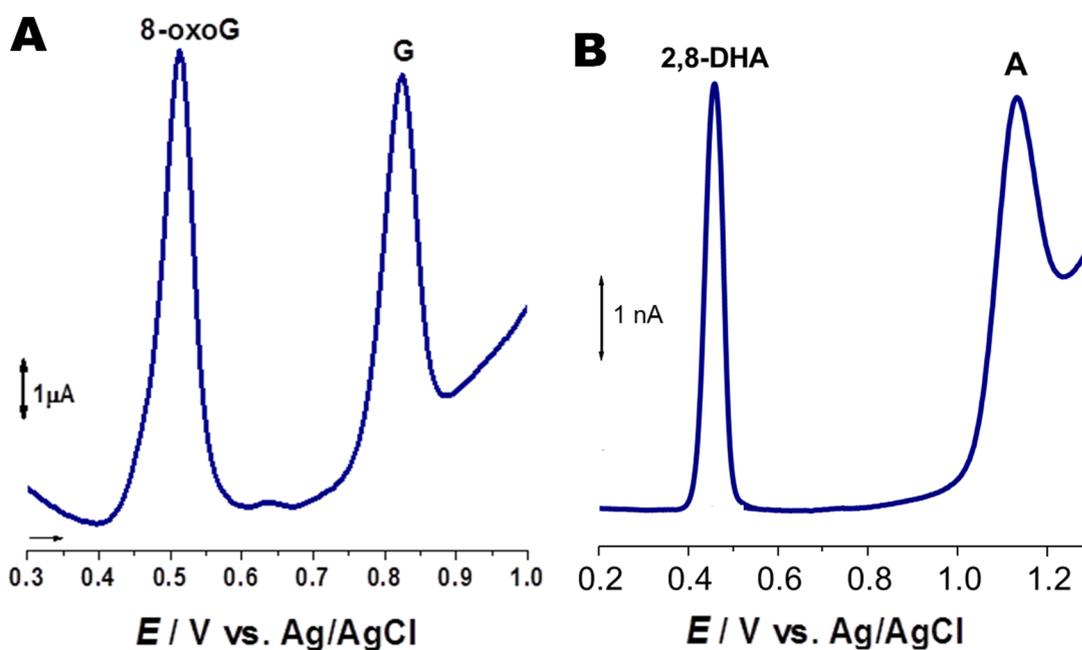


Figura 1.14. Voltamogramas de DP para (A) 0,10 mM 8-oxoguanina (8-oxoG) e 0,09 mM guanina (G) e (B) 50 µM 2,8-dihidroxiadenina (2,8-DHA) em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5 utilizando elétrodo de carbono vítreo. Amplitude de impulso 50 mV, largura do impulso 70 ms, velocidade de varrimento 5 mV s⁻¹ [60, 68].

O mecanismo de oxidação eletroquímica da 8-oxoGua é um processo de múltiplos passos no qual se observa um pico principal correspondente à oxidação da 8-oxoGua, em $E_{pa} = +0,45$ V, seguido por outros pequenos picos devido aos seus produtos de oxidação, **Figura 1.14 (A)**. Um dos produtos poderia ser 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FAPyG), que corresponde à quebra da ligação N7–C8 da 8-oxoGua [70].

A oxidação da adenina é um processo irreversível que envolve dois elétrons e dois prótons com a formação de produtos intermediários, 2-hidroxiadenina ou 8-hidroxiadenina. Estes produtos intermediários podem sofrer oxidação, com a transferência de dois elétrons e dois prótons formando a 2,8-dihidroxiadenina [68], a qual pode ser observada por um pico de oxidação em $E_{pa} = +0,45$ V, **Figura 1.14 (B)**.

1.6 Biossensores Eletroquímicos de DNA

Os biossensores são dispositivos que podem usar elementos de reconhecimento biológico juntamente com um elemento de transdução e têm a capacidade de fornecer informações com base em uma análise quantitativa ou qualitativa.

Considerando a construção e o desenvolvimento de novos dispositivos em nanotecnologia e tecnologia de biossensores, o DNA apresenta-se como uma molécula estável, de baixo custo e de fácil acoplamento em elementos transdutores, o que a torna um componente biológico de reconhecimento ideal. Diante disso, os biossensores de DNA têm sido aplicados no diagnóstico molecular, farmacogenômica, diagnóstico médico, triagem de drogas, análise de alimentos, bioterrorismo, monitoramento ambiental, poluição, entre outros [29].

Devido às características estruturais da molécula de DNA, a qual pode ser imobilizada na superfície de elétrodos na forma de simples [71, 72], dupla [72, 73] ou tripla

hélices [72, 74, 75], pela capacidade dos ácidos nucleicos formarem pares complementares com precisão, por suas propriedades e por apresentarem alta especificidade de interação com diversos tipos de moléculas, vários trabalhos relatam a utilização de biossensores eletroquímicos de DNA.

O desenvolvimento de biossensores eletroquímicos de DNA baseia-se na imobilização de DNA na superfície do eléctrodo, sendo que, diferentes procedimentos experimentais podem ser seguidos para a construção de diferentes biossensores eletroquímicos de DNA [76] e os mesmos são dependentes da aplicação requerida.

A formação e a estabilidade dos filmes de DNA, bem como a resposta eletroquímica dos biossensores dependem das características e condições de pré-tratamento da superfície do eléctrodo, do método de imobilização, do tempo de adsorção, da sequência de bases de DNA, do comprimento da cadeia, da concentração, do pH, da força iónica e da composição dos eletrólitos de suporte utilizados.

Sendo assim, o desempenho, a sensibilidade e a confiança na resposta eletroquímica dos biossensores eletroquímicos de DNA estão relacionados com o procedimento escolhido para a construção destes. Dessa forma, pretende-se ao utilizar os biossensores eletroquímicos de DNA obter uma fácil preparação, alta sensibilidade, custo efetivamente baixo e permitir *in situ* a geração de intermediários reativos e a deteção dos danos no DNA. Dentre os diferentes métodos utilizados na preparação de biossensores eletroquímicos de DNA, os seguintes podem ser destacados:

a) Adsorção eletrostática através da aplicação de +0,3 V durante 2 minutos numa solução contendo dsDNA. Procedimento este onde o biossensor de dsDNA de camada fina é depois mergulhado numa solução que contém o agente danificador.

b) Simples imersão da superfície do eletrodo numa solução contendo dsDNA durante diferentes períodos de tempo, seguido pela secagem e posterior incubação do biossensor de dsDNA de camada fina com a substância de interesse.

c) Cobertura, camada por camada, do eletrodo com três gotas sucessivas de 5 μL de uma solução 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA. Entre cada gota adicionada, a superfície do eletrodo é seca com fluxo constante de nitrogênio e depois de completamente seco, o biossensor de DNA é incubado com o composto a ser analisado.

d) Cobertura da superfície do eletrodo com uma gota de uma solução concentrada de dsDNA, a qual é seca em atmosfera normal durante 24 horas e por fim o biossensor é hidratado em solução tampão pH 4,5 por cerca de 30 minutos. Depois de hidratado o biossensor é incubado com a espécie a ser investigada.

As superfícies dos biossensores eletroquímicos de dsDNA preparados em grafite pirolítica altamente orientada (HOPG) pelos diferentes métodos apresentados acima foram caracterizadas por AFM, **Figura 1.15**, e a influência de cada componente, das bases purínicas e pirimídicas, do açúcar e dos grupos fosfatos foi investigada [77-79].

A interação entre o DNA e diferentes moléculas pode eventualmente causar alterações na estrutura do DNA, como distorção da dupla hélice, abertura e/ou quebra da cadeia ou causar danos às bases, o que pode ser acompanhado pelo aparecimento de novos sinais eletroquímicos, ou pela alteração dos sinais eletroquímicos característicos do DNA. Para a melhor compreensão e interpretação dos sinais eletroquímicos e conseqüentemente dos resultados de interação, é de grande importância o conhecimento do comportamento eletroquímico da molécula investigada nas mesmas condições experimentais do biossensor eletroquímico de DNA.

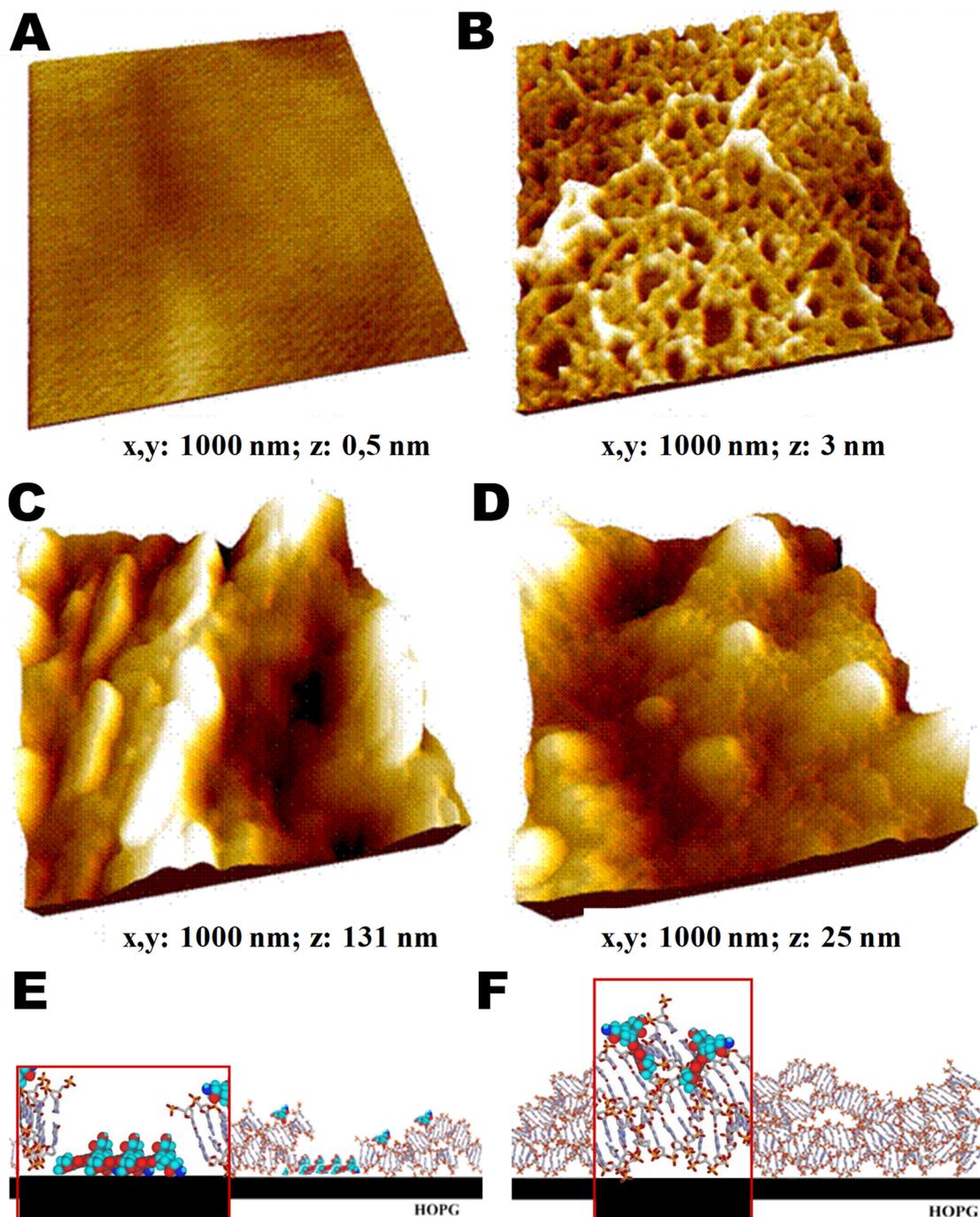


Figura 1.15. Imagens topográficas obtidas em ar com o modo MAC de AFM para: (A) a superfície do eletrodo de HOPG limpa; (B) um biossensor de dsDNA de camada fina com uma solução de dsDNA em tampão acetato pH 4,5; (C) um biossensor de dsDNA multicamada com uma solução de dsDNA em tampão acetato pH 4,5 (D) um biossensor de dsDNA de camada espessa com uma solução de dsDNA em tampão acetato pH 4,5; (E, F) Modelo esquemático para a interação dsDNA-droga antineoplásica usando um biossensor eletroquímico de dsDNA (E) de camada fina e (F) de camada espessa [77-79].

Com simples e fácil construção, rapidez no ensaio sem necessidade de amplificação das amostras de DNA (via reação em cadeia de polimerase – PCR), alta sensibilidade e

elevada especificidade, bem como outros aspetos não menos importantes, tais como a eliminação de marcadores radioativos e fluorescentes, os biossensores eletroquímicos de DNA têm sido aplicados com sucesso em diversos estudos.

Entre as aplicações dos biossensores eletroquímicos com DNA destacam-se a investigação e avaliação dos mecanismos de interação de fármacos e DNA [14, 76, 80-90], a deteção e quantificação dos danos oxidativos nas bases do DNA causados por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio no diagnóstico clínico e laboratorial [67], a rápida monitorização da interação com metais potencialmente tóxicos [91-93] ou agentes poluentes no ambiente [94-96], a deteção de organismos patogênicos nos alimentos, a monitorização direta dos processos de hibridização [97].

Muitos compostos, como por exemplo, fármacos, tendem a interagir com o DNA causando alterações na sua estrutura ou modificando a sequências de bases, as quais originam a perturbação na replicação do DNA. Os produtos de oxidação das bases do DNA induzem substituições, eliminações ou inserções na sequência de DNA, um processo conhecido como mutagénese. Semelhantemente, proteínas, na forma de anticorpos monoclonais (mAbs), com suas propriedades terapêuticas específicas e eficazes no tratamento do cancro, tendem a interagir com o DNA, o que desperta o interesse no estudo da interação entre mAbs e DNA, com intuito de prever os seus mecanismos de ação e compreender as suas atividades biológicas e toxicidades *in vivo*.

1.7 Proteínas

As proteínas são moléculas grandes e complexas que desempenham papéis importantes nos sistemas biológicos. Elas realizam a maior parte do trabalho nas células e são necessárias para a estrutura, função e regulação dos organismos vivos.

Uma vez que neste trabalho foi estudado o comportamento eletroquímico de um peptídeo e de uma proteína para posterior investigação de suas interações com DNA faz-se necessária uma breve introdução acerca da composição das proteínas, estruturas dos aminoácidos e suas respectivas propriedades físico-químicas e eletroquímicas.

1.7.1 Estrutura e Propriedades dos Aminoácidos

Os aminoácidos são as unidades estruturais básicas das proteínas. São moléculas derivadas de ácidos orgânicos cuja estrutura geral é constituída por um grupo amina ($-\text{NH}_2$), um grupo carboxílico ($-\text{COOH}$) e uma cadeia lateral ($-\text{R}$), de dimensões e características variáveis, ligadas a um carbono central saturado ($\text{C}\alpha$), **Figura 1.16**. Na natureza mais de 700 tipos de aminoácidos foram descobertos, dos quais apenas 20 aminoácidos fazem parte da composição das proteínas. Estes são denominados de α -aminoácidos porque, à exceção da prolina, **Tabela 1.1**, todos têm os grupos amina e ácido carboxílico substituídos no mesmo carbono α .

Todos os α -aminoácidos contêm carbono, hidrogénio, nitrogénio e oxigénio em sua composição, no entanto existem dois, cisteína e metionina, que também contêm enxofre [98, 99]. Os α -aminoácidos partilham com outros monómeros bioquímicos uma propriedade essencial que lhes permite formar polímeros, ou seja, os grupos NH_3^+ e COO^- podem reagir com outros grupos e formar ligações covalentes.

O comportamento ácido-base dos aminoácidos é importante porque influencia a sua reatividade e, conseqüentemente também influencia as propriedades das proteínas. Além disso, a identificação dos diferentes aminoácidos depende das propriedades ácido-base de cada um deles [99].

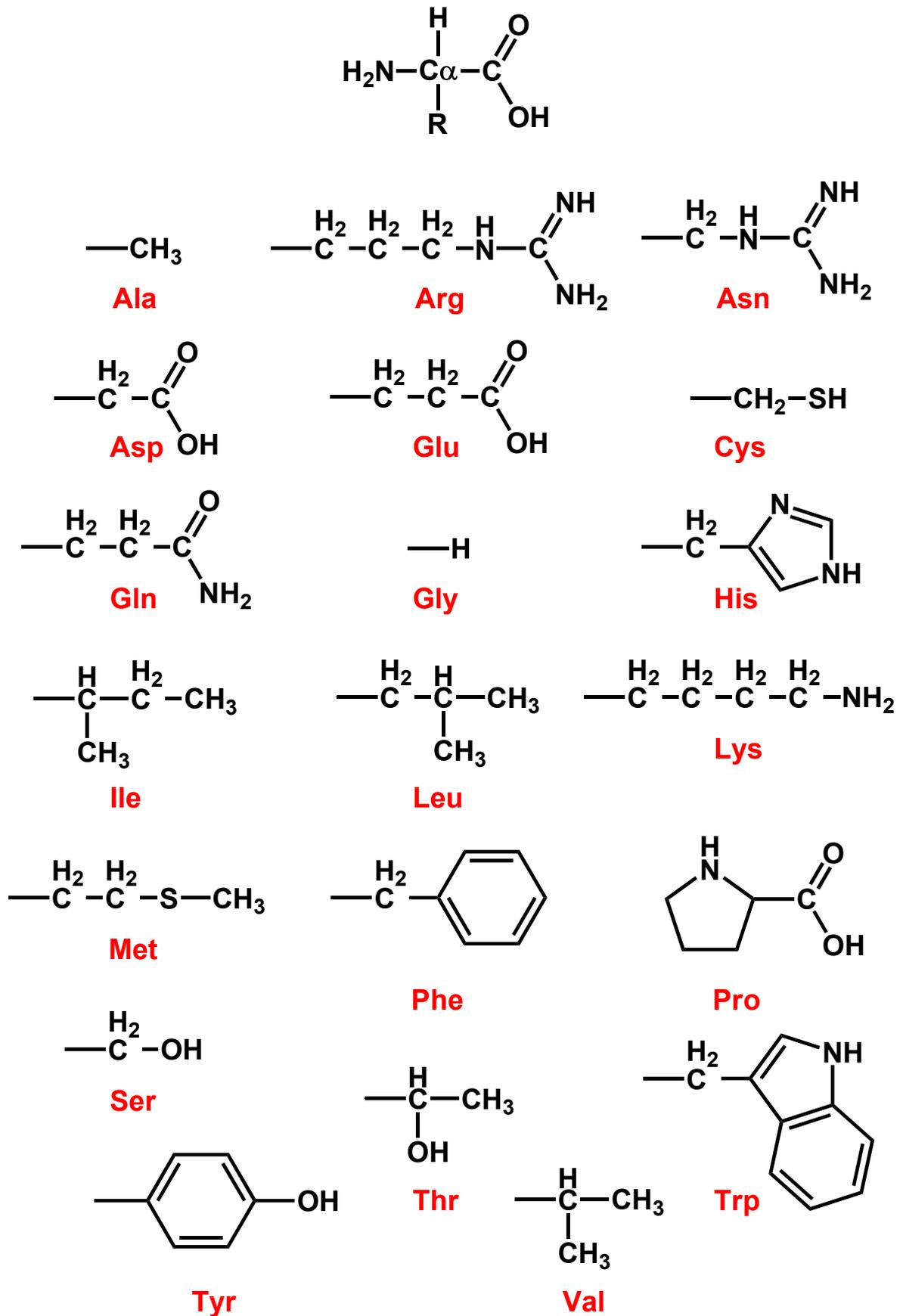


Figura 1.16. Estrutura geral dos aminoácidos.

Tabela 1.1 Estrutura e propriedades químicas dos α -aminoácidos.

Aminoácido (Abreviatura) [100]	Polaridade da cadeia lateral	Carga da cadeia lateral (pH 7,0)	Índice de hidropaticidade [101]
Alanina – Ala (A)	apolar	Neutra	1,8
Arginina – Arg (R)	polar	Positiva	-1,4
Asparagina – Asn (N)	polar	Neutra	-3,5
Ác. Aspártico – Asp (D)	polar	Negativa	-3,5
Ác. Glutâmico – Glu (E)	polar	Negativa	-3,5
Cisteína – Cys (C)	apolar	Neutra	2,5
Glutamina – Gln (Q)	polar	Neutra	-3,5
Glicina – Gly (G)	apolar	Neutra	-0,4
Histidina – His (H)	polar	Neutra	-3,2
Isoleucina – Ile (I)	apolar	Neutra	4,5
Leucina – Leu (L)	apolar	Neutra	3,8
Lisina – Lys (K)	polar	Positiva	-3,9
Metionina – Met (M)	apolar	Neutra	1,9
Fenilalanina – Phe (F)	apolar	Neutra	2,8
Prolina – Pro (P)	apolar	Neutra	-1,6
Serina – Ser (S)	polar	Neutra	-0,8
Treonina – Thr (T)	polar	Neutra	-0,7
Triptofano – Trp (W)	apolar	Neutra	-0,9
Tirosina – Tyr (Y)	polar	Neutra	-1,3
Valina – Val (V)	apolar	Neutra	4,2

Em pH neutro (pH 7,0) os grupos carboxilo e amina encontram-se carregados, no entanto, na ampla faixa de pH de 1 a 14 estes grupos apresentam uma série de equilíbrios que envolvem reações de ligação ou dissociação de um próton. Para pH ~ 2,0 ocorre a ligação de um próton, que neutraliza a carga do grupo carboxilo, enquanto que para pH ~ 12 ocorre a dissociação de um próton do grupo carboxilo, neutralizando-se o grupo amina. As estruturas de ionização dos aminoácidos em função do pH estão representadas na **Figura 1.17**.

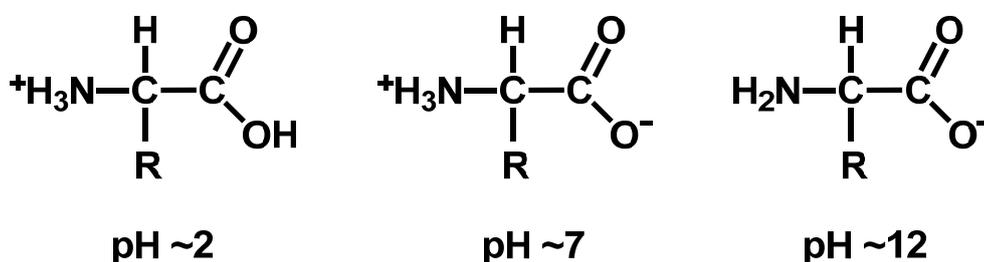


Figura 1.17. Estruturas principais dos aminoácidos em função do valor de pH.

Em ambas as situações ocorre a ionização dos grupos carboxilo e amina, sendo o grupo doador de prótons $-\text{COOH}$ ou $-\text{NH}_3^+$, e o grupo aceitador de prótons $-\text{COO}^-$ ou $-\text{NH}_2$ [99]. A extensão da ionização depende da constante de equilíbrio da reação. Os valores das constantes de acidez ($\text{p}K_1$, $\text{p}K_2$ e $\text{p}K_R$) para os 20 α -aminoácidos, de acordo com os grupos ácido carboxílico, amina e grupo funcional, respetivamente, são apresentados na **Tabela 1.2**.

Os grupos carboxilo com valores de $\text{p}K_1 \sim 2,2$, são ácidos fracos, e para $\text{pH} > 3,5$ estes grupos encontram-se na forma de carboxilatos. Os grupos amina com valores de $\text{p}K_2 \sim 9,4$ são bases fracas, e para $\text{pH} < 8,0$ os aminoácidos encontram-se na forma de iões amónia. No intervalo de pH fisiológico, ambos os grupos carboxílico e amina encontram-se completamente ionizados, na forma de iões dipolares ou *zwitterions*, **Figura 1.17**. Os aminoácidos são substâncias anfotéricas, podendo atuar como ácido ou como base [98].

Tabela 1.2. Valores de pK_1 , pK_2 e pK_R dos α -aminoácido [98].

Aminoácidos	pK_1 (α -COOH)	pK_2 (α -NH ₃ ⁺)	pK_R
Alanina	2,35	9,87	-
Arginina	1,82	8,99	12,48
Asparagina	2,14	8,72	-
Ác. Aspártico	1,99	9,90	3,90
Ác. Glutâmico	2,10	9,47	4,07
Cisteína	1,92	10,70	8,37
Glutamina	2,17	9,13	-
Glicina	2,35	9,78	-
Histidina	1,80	9,33	6,04
Isoleucina	2,32	9,76	-
Leucina	2,33	9,74	-
Lisina	2,16	9,06	10,54
Metionina	2,13	9,28	-
Fenilalanina	2,20	9,31	-
Prolina	1,95	10,64	-
Serina	2,19	9,21	-
Treonina	2,09	9,10	-
Triptofano	2,46	9,41	-
Tirosina	2,20	9,21	10,46
Valina	2,29	9,74	-

A cadeia lateral R é responsável pelas diferentes propriedades de cada um dos aminoácidos e também pode conter grupos funcionais com características de doador ou aceitador de prótons, como é o caso dos aminoácidos arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina, cisteína, histidina e tirosina, que nestes casos envolve um pK_R adicional [99]. Uma vez que as proteínas são constituídas por aminoácidos, as propriedades dos grupos

da cadeia lateral R contribuem consideravelmente para as propriedades físico-químicas das proteínas.

Considerando as estruturas da cadeia lateral R, **Figura 1.16**, as principais diferenças observadas verificam-se em relação ao tamanho, à carga e à hidrofobicidade dos aminoácidos [99]. Os aminoácidos encontram-se divididos em classes de acordo com as características químicas do grupo R. Sendo assim, de acordo com a polaridade da cadeia lateral temos três classes distintas de aminoácidos que são: (a) os que possuem grupos R não polares, (b) os que possuem grupos R polares não carregados e (c) os que possuem grupos R polares carregados [98].

Os aminoácidos com cadeias laterais tendo grupos hidrocarbonetos alquílicos ou aromáticos são considerados não polares e incluem alanina, glicina, isoleucina, leucina, metionina, prolina, triptofano e valina [98]. No caso de aminoácidos com cadeia lateral contendo diferentes grupos polares como amidas, ácidos e álcoois são classificados como polares, entre eles estão a asparagina, cisteína, glutamina, serina, tirosina e treonina [98]. Os aminoácidos com cadeias polares carregadas incluem a lisina, arginina e histidina, que estão carregados positivamente em pH fisiológico, e o ácido aspártico e ácido glutâmico, carregados negativamente para $\text{pH} > 3,0$ [98].

Outra característica importante dos aminoácidos está relacionada com o carbono α ($C\alpha$) central, assimétrico e que dá origem a um centro quiral e dois isômeros. À exceção da glicina, todos os aminoácidos são moléculas quirais e podem existir em duas formas diferentes, as configurações absolutas L- ou D-. Todos os aminoácidos naturais que se encontram nas proteínas pertencem à configuração absoluta L-, à exceção da glicina que não é uma molécula quiral.

1.7.2 Propriedades Eletroquímicas dos Aminoácidos

Considerando que dos 20 aminoácidos comumente encontrados na composição das proteínas apenas cisteína (Cys), histidina (His), metionina (Met), tirosina (Tyr) e triptofano (Trp) são eletroativos, estudos acerca dos seus comportamentos eletroquímicos em diferentes materiais têm sido reportados [102-105], com destaque para os elétrodos de carbono. Os mecanismos de oxidação eletroquímica para cada aminoácido eletroativo em elétrodos de carbono encontram-se minuciosamente discutidos na literatura [105-108]. O perfil voltamétrico e os potenciais de oxidação estão apresentados na **Figura 1.18** e na **Tabela 1.3**, respectivamente.

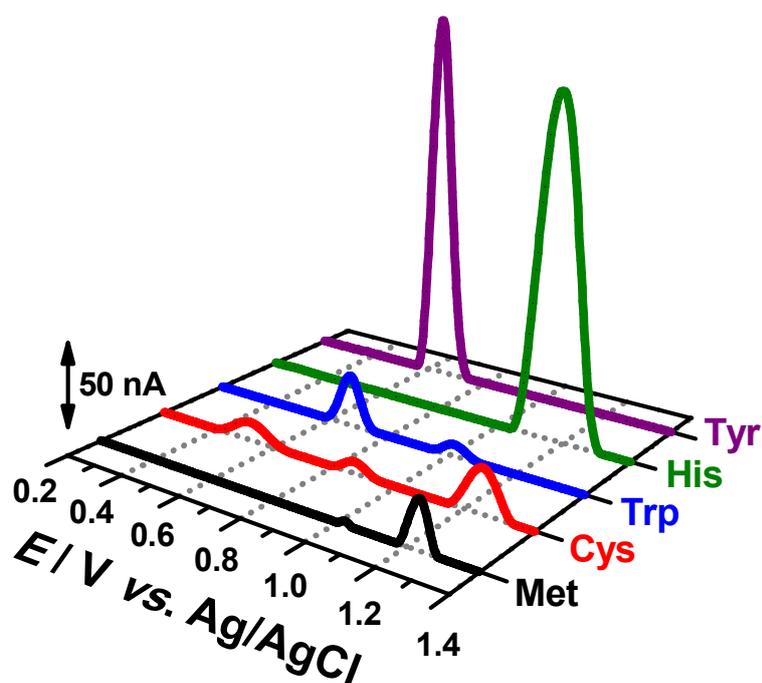


Figura 1.18. Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, utilizando GCE, em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 para soluções de (—) 50 μ M metionina, (—) 50 μ M cisteína, (—) 25 μ M triptofano, (—) 50 μ M histidina e (—) 25 μ M tirosina [106, 107, 109].

Os aminoácidos tirosina e triptofano possuem na cadeia lateral os grupos fenol e indol que podem sofrer oxidação eletroquímica. A oxidação eletroquímica do aminoácido histidina, cisteína e metionina ocorre devido às propriedades eletrônicas das suas cadeias

laterais que, no caso da histidina é o grupo imidazol, da cisteína é o grupo tiol, e no caso da metionina é o átomo de enxofre.

A oxidação eletroquímica da tirosina na superfície do eletrodo de carbono vítreo, **Figura 1.18** (—), ocorre em um mecanismo pH dependente de uma etapa, em $E_{pa} = +0,65$ V, a qual está relacionada com a oxidação do grupo fenol e envolve a formação de um radical fenóxido, que é estabilizado pelo ataque nucleofílico da água, dando origem a um produto de oxidação eletroativo [106].

O mecanismo de oxidação eletroquímica do aminoácido triptofano, **Figura 1.18** (—), ocorre em duas etapas, em $E_{p1a} = +0,65$ V e em $E_{p2a} = +1,05$ V, e está relacionado com a oxidação do grupo indol. A primeira etapa corresponde à oxidação do carbono C2 do anel pirrol e de seguida ocorre uma hidroxilação na posição C7 do anel benzeno, com formação de produtos eletroativos fortemente adsorvidos na superfície do eletrodo, que também são oxidados reversivelmente [109].

A oxidação do aminoácido histidina na superfície do eletrodo de carbono vítreo, **Figura 1.18** (—), ocorre num único passo irreversível, em $E_{pa} = +1,15$ V, que envolve a formação de um radical instável, o qual sofre um ataque nucleofílico da água, de modo a formar a 2-oxohistidina [107, 110].

O aminoácido cisteína é oxidado em um processo que envolve três reações consecutivas na superfície do eletrodo de carbono vítreo, em $E_{p1a} = +0,52$ V, $E_{p2a} = +0,88$ V e $E_{p3a} = +1,27$ V, **Figura 1.18** (—). A primeira reação envolve a oxidação do grupo sulfidrilo e a formação de radicais, os quais sofrem ataque nucleofílico da água, originando espécies intermediárias, cuja oxidação leva à formação do ácido cisteico. Por outro lado, pode ocorrer a dimerização dos radicais da primeira reação, formando cistina, a qual sofre oxidação para potenciais mais positivos devido à ligação forte covalente da ponte dissulfeto [104, 108].

Tabela 1.3. Potenciais de oxidação dos aminoácidos eletroativos, em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0.

Aminoácidos	$E_{pa} / V \text{ vs. Ag/AgCl}$			
Tirosina (Tyr)	+0,65	–	–	–
Triptofano (Trp)	+0,65	–	+1,05	–
Histidina (His)	–	–	+1,15	–
Cisteína (Cys)	+0,52	+0,88	–	+1,27
Metionina (Met)	–	–	+1,12	+1,35

Por fim, a oxidação eletroquímica do aminoácido metionina, **Figura 1.18 (—)**, ocorre em um mecanismo de dois passos, levando à formação do sulfóxido de metionina, em $E_{p1a} = +1,12 \text{ V}$, e da metionina sulfona, em $E_{p2a} = +1,35 \text{ V}$, envolvendo a adsorção e protonação/desprotonação do grupo tiol [104, 107, 108].

1.7.3 Estrutura das Proteínas

As proteínas são componentes essenciais dos organismos vivos e estão envolvidas em diversas funções biológicas, as quais estão relacionadas com suas estruturas e propriedades químicas. Em geral, as proteínas são formadas por uma ou mais cadeias polipeptídicas constituídas por 20 aminoácidos, no entanto, para cada proteína, tanto a sua composição como a ordem dos aminoácidos na cadeia polipeptídica é diferente, o que faz com que exista uma diversidade e complexidade de moléculas, podendo cada uma apresentar múltiplas funcionalidades de acordo com suas propriedades [99].

A polimerização dos 20 aminoácidos em cadeias polipeptídicas ocorre através de reação de condensação entre o grupo amina de um dos aminoácidos e o grupo carboxilo de outro, com a libertação de uma molécula de água [99], **Figura 1.19**. As extremidades da cadeia formada são designadas por “terminal amino” (ou N-terminal) e “terminal carboxílico” (ou C-terminal).

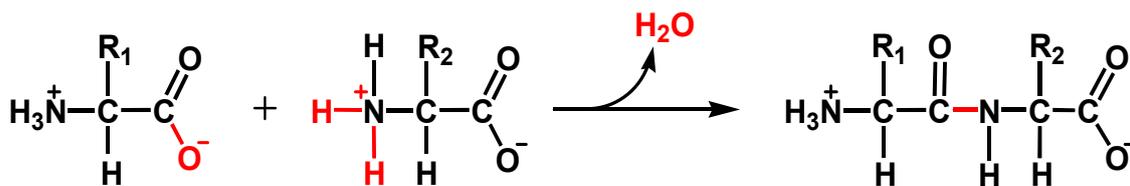


Figura 1.19. Reação de condensação entre dois aminoácidos para formação de um dipéptido [98].

Como forma de distinguir os aminoácidos livres daqueles que estão nas proteínas, os aminoácidos nas cadeias peptídicas que estão ligados em série, são denominados como resíduos ou unidades peptídicas. Todas as proteínas são constituídas por resíduos de aminoácidos ligados entre si e com uma sequência gerada através da informação genética.

As proteínas exercem uma variedade de funções que se encontram divididas em dois grandes grupos, as funções dinâmicas e as estruturais [99].

As funções dinâmicas estão relacionadas com: (i) a função hormonal, na qual se incluem proteínas específicas para estimular ou inibir a atividade de alguns órgãos; (ii) a função de defesa do organismo, que é efetuada por proteínas denominadas de anticorpos que atuam no combate de infeções bacterianas e virais; (iii) a função enzimática, na qual as proteínas, neste caso as enzimas, funcionam como catalisadores de reações bioquímicas; (iv) a função de transporte e armazenamento de substâncias biológicas importantes, como é o caso da hemoglobina, proteína responsável pelo transporte do oxigénio no sangue e (v) a função reguladora de diversos processos bioquímicos [99].

As funções estruturais ou citoesqueléticas das proteínas estão relacionadas com a construção de estruturas celulares e histológicas, conferindo resistência aos órgãos e tecidos, como por exemplo a queratina, que está presente no cabelo, unhas e pele [99].

Uma vez que as proteínas são constituídas por sequências de aminoácidos, as propriedades físico-químicas dos aminoácidos são responsáveis pela reatividade química das proteínas que tem influência direta nas características funcionais e nos seus mecanismos de

ação nos organismos vivos. O conhecimento da estrutura das proteínas, bem como das suas propriedades, que são determinadas pelas cadeias laterais dos aminoácidos, e que variam de acordo com a polaridade, a acidez, a aromaticidade, a hidrofobicidade, a flexibilidade conformacional, a capacidade de formar ligações de hidrogénio e a reatividade com outras moléculas, é essencial para compreensão de suas interações [98].

As cadeias laterais das proteínas podem sofrer alterações consoante as reações dos aminoácidos com grupos químicos mais simples (hidroxilo, metilo, etc.) ou com grupos maiores, que incluem outros aminoácidos, através de ligações covalentes e não covalentes, lípidos (lipoproteínas), carboidratos (glicoproteínas), ácidos nucleicos, grupos fosfato, iões metálicos (metaloproteínas), grupos heme, entre outros.

A estrutura das proteínas é um fator fundamental na sua atividade biológica e se for alterada pode levar à inativação de suas funções. A desnaturação é o processo de alteração de estrutura da proteína e pode ocorrer devido a temperaturas elevadas, alterações de pH, interação com determinados reagentes químicos, entre outros fatores.

As ligações peptídicas covalentes formadas entre os diferentes aminoácidos suportam a cadeia polipeptídica. Estas ligações apresentam propriedades mistas, das ligações simples C–N e das ligações duplas C=N, resultando em uma ligação com caráter de dupla ligação parcial, rígida e planar. Como consequência desta característica, a ligação peptídica é mais curta do que o esperado para uma ligação simples C–N e o caráter de dupla ligação C=N é o suficiente para impedir a livre rotação [99]. Dessa forma, os átomos tendem a adotar preferencialmente a configuração *trans*, devido ao impedimento estereoquímico entre as cadeias laterais dos resíduos adjacentes [99].

As proteínas possuem estruturas espaciais complexas que podem ser organizadas em quatro níveis de organização estrutural.

A estrutura primária das proteínas é dada pela sequência específica de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica, pelas ligações peptídicas da molécula e, se existirem, pela localização das pontes dissulfeto. A sequência de aminoácidos nas proteínas é definida pela informação codificada na sequência de nucleotídeos de um gene do DNA.

A estrutura secundária das proteínas está relacionada com o arranjo espacial dos aminoácidos, próximos entre si na sequência primária da proteína, através das ligações de hidrogénio que poderão ocorrer entre os grupos $-NH$ e $C=O$ da cadeia principal.

A cadeia polipeptídica tem grande mobilidade rotacional, uma vez que as ligações entre o carbono α dos resíduos do aminoácido e os grupos carboxilo ($C\alpha-C$) e amina ($C\alpha-N$) possuem rotação livre sobre os seus eixos, definindo assim três eixos de rotação (ω , ϕ , ψ), **Figura 1.20**. Daí existirem as mais variadas conformações espaciais que uma cadeia peptídica pode assumir [99].

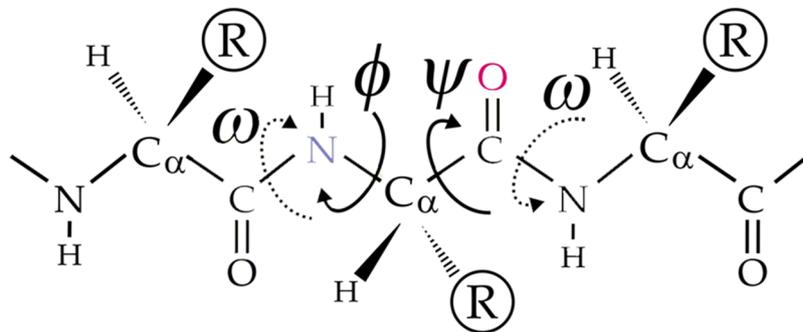


Figura 1.20. Representação dos eixos de rotação (ω , ϕ , ψ) definidos pelas ligações químicas entre os átomos do aminoácido.

Nas proteínas globulares existem essencialmente três tipos de arranjos estruturais resultantes das rotações em torno das ligações adjacentes à ligação peptídica que são a estrutura α -hélice, quando a rotação se dá no mesmo sentido, a estrutura folha- β , quando a rotação se dá em sentidos opostos, **Figura 1.21**, e as voltas [99].

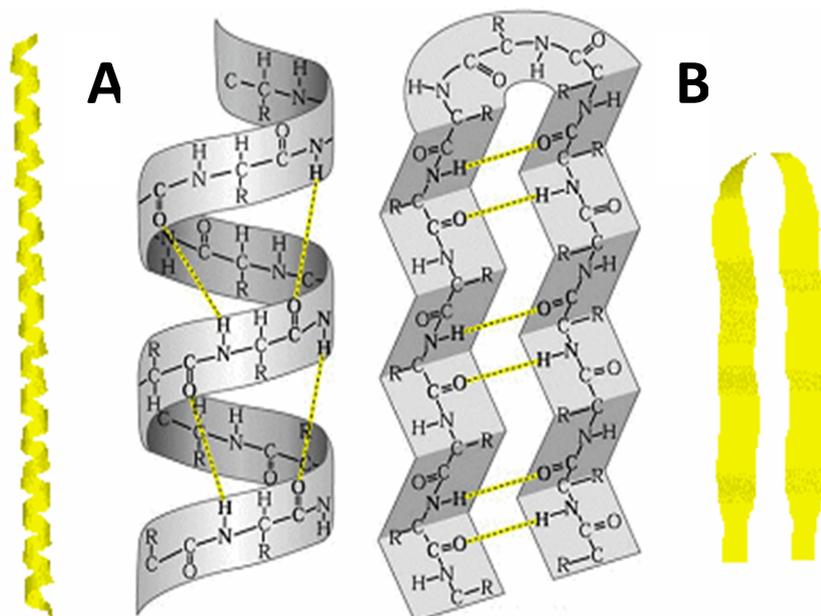


Figura 1.21. Estruturas secundárias das proteínas: **(A)** α -hélice e **(B)** folha- β .

A estrutura terciária das proteínas é dada pelo arranjo espacial de aminoácidos distantes entre si na sequência polipeptídica, o qual é determinado e estabilizado por todas as interações covalentes e não covalentes que poderão ocorrer, como pontes dissulfeto, interações de carga, forças hidrofóbicas, ligações de hidrogénio e interações de *Van der Waals* entre os aminoácidos da proteína e a água, e que levam à junção e ao empacotamento da proteína. O arranjo tridimensional dos átomos na estrutura terciária coincide na maioria dos casos com a estrutura nativa que é responsável pela função biológica, específica de cada proteína [99].

Muitas proteínas são constituídas por uma ou mais cadeias polipeptídicas, as subunidades. A estrutura quaternária das proteínas é determinada pelo arranjo espacial das subunidades da estrutura terciária [98, 99], resultante das ligações dissulfeto, interações hidrofóbicas, interações de carga e ligações de hidrogénio, entre as subunidades. A estrutura quaternária aumenta a versatilidade de funções das proteínas, permite a formação de espaços catalíticos ou de ligação na interface das subunidades favorecendo a interação com outras moléculas, de modo a regular a sua atividade biológica [99].

1.7.4 Propriedades Eletroquímicas das Proteínas

O estudo dos processos de transferência direta de elétrons, entre as proteínas e os eletrodos, não permite apenas avaliar os mecanismos redox, envolvendo troca de elétrons e que ocorrem nas proteínas durante os processos metabólicos, como também permite obter informações sobre a relação estrutura/função das proteínas [111-116].

As aplicações biológicas baseadas na eletroquímica direta de proteínas tem crescido, principalmente no que se diz respeito ao desenvolvimento de vários tipos de biossensores que utilizam proteínas imobilizadas na superfície de eletrodos como elementos de reconhecimento biológico, para medições de indicadores bioquímicos [117-119], biobaterias e células combustíveis [120], sistemas biocatalíticos [121, 122], entre outros.

Embora a área esteja em expansão, seja na investigação dos processos de transferência de elétrons, como no desenvolvimento de biossensores que necessitam da imobilização da proteína na superfície do eletrodo, ainda é um grande desafio obter uma transferência eletrônica eficiente entre as proteínas e a superfície do eletrodo devido a diferentes fatores [123, 124].

Os centros eletroativos das proteínas, ou seja, os centros ativos redox e/ou os aminoácidos eletroativos, encontram-se normalmente no interior das cadeias polipeptídicas e, se a orientação das proteínas na superfície do eletrodo não for a mais adequada, a distância entre estes centros eletroativos e a superfície do eletrodo aumenta, o que dificulta ainda mais a transferência eletrônica [124].

A fim de ultrapassar os problemas no estudos dos processos de transferência direta de elétrons entre as proteínas e os eletrodos, pequenas moléculas adsorvidas na superfície do eletrodo que induzem a transferência de elétrons ou espécies condutoras que modificaram quimicamente a proteína, de modo a favorecer a sua orientação foram relatadas [113, 123,

125]. No entanto, os resultados obtidos não foram totalmente satisfatórios uma vez que apresentaram desnaturação das proteínas na superfície do eletrodo, difusão lenta das proteínas maiores e adsorção de moléculas na superfície do eletrodo.

Também, outros recursos como a utilização de mediadores redox, eletrodos revestidos com filmes ou camadas de surfactantes, polímeros redox, nanomateriais ou pequenas moléculas quimioadsorvidas, foram utilizados com o intuito de melhorar a transferência de elétrons no estudo eletroquímico de proteínas [124-126]. Os mediadores redox, ao alternarem os seus estados de oxidação, facilmente interagem com os aminoácidos eletroativos das proteínas possibilitando a transferência de elétrons, minimizando os efeitos de atração e repulsão entre as proteínas e o eletrodo [126, 127]. Todavia, em alguns casos, o mediador pode interferir com os processos de eletrodo e dificultar a transferência de elétrons [125].

Como alternativa ao uso de mediadores, a investigação eletroquímica de proteínas pode ser feita através da imobilização da proteína diretamente na superfície do eletrodo, o que faz com que as interações entre o filme da proteína e o eletrodo sejam controladas, facilitando a transferência de elétrons, eliminando a difusão e simplificando a obtenção dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos [125, 128].

O processo de adsorção das proteínas pode ser afetado pelas propriedades da superfície do eletrodo, pela natureza das proteínas e pelas condições da solução nomeadamente a temperatura, pH, força iônica e a composição da solução tampão [129, 130].

A maior parte dos estudos eletroquímicos diretos de proteínas, sem mediadores redox, referiam-se inicialmente à investigação de proteínas que possuem centros ativos redox, tais como citocromos, ferredoxinas, proteínas que contêm elementos como cobre, ferro, enxofre, entre outros [119, 131, 132].

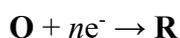
Recentemente, o estudo eletroquímico dos diferentes aminoácidos eletroativos constituintes das proteínas, nomeadamente tirosina, triptofano, cisteína, metionina e histidina, veio permitir avaliar as propriedades redox de outras proteínas. Os estudos eletroquímicos de proteínas que têm por base as propriedades redox dos aminoácidos eletroativos foram realizados com elétrodos de carbono vítreo (*glassy carbon electrode* – GCE) [133], pasta de carbono (*carbon paste electrode* – CPE) [133, 134], grafite [133], fibra de carbono (*carbon fiber electrode* – CFE) [134], diamante dopado com boro (*boron-doped diamond electrode* – BDDE) [135] e elétrodos impressos de carbono (*screen-printed carbon electrodes* – SPCE) [136].

A investigação das propriedades de proteínas sem centros ativos redox, que são a maior parte das proteínas, através da avaliação da resposta eletroquímica direta dos seus aminoácidos oxidáveis representa uma excelente metodologia, conduzindo a diversas aplicações importantes, em especial na área dos biossensores e da biotecnologia.

1.8 Princípios da Eletroquímica

A eletroquímica envolve o estudo dos fenómenos químicos que estão associados à separação de cargas num determinado sistema [137, 138]. Os processos de transferência de carga podem ser classificados como heterógenos, quando a transferência de eletrões ocorre na superfície do eléctrodo, ou homogéneos, quando a transferência de eletrões ocorre em solução.

A maioria dos processos de transferência de carga envolve a transferência de eletrões e no caso das espécies oxidadas O, e reduzidas R, a reação redox pode ser esquematicamente representada:



em que **O** (espécie oxidada) recebe n elétrons e transforma-se em **R** (espécie reduzida). O par redox $O | R$ tem uma energia associada a energia redox, E_{redox} , que pode ser relacionada com o potencial de eletrodo. A aplicação de um potencial ao eletrodo influencia o nível eletrônico ocupado mais elevado no eletrodo, o nível de Fermi, E_F . Num eletrodo de trabalho, os elétrons são sempre transferidos de e para o nível de Fermi.

A fim de assegurar a eletroneutralidade do sistema, ocorrem sempre duas meias-reações de transferência de carga, em direções opostas. Exceto no caso de reações redox homogêneas, as reações de transferência de carga estão separadas espacialmente e, normalmente ocorrem em eletrodos diferentes, imersos em solução dentro da mesma célula eletroquímica [137]. Os eletrodos por sua vez estão conectados por meios condutores, externamente através de fios condutores (fios elétricos), e no interior da solução através do eletrólito inerte (transporte iônico), de tal modo que a carga pode ser transportada.

Em todos os processos eletroquímicos heterogêneos, a reação eletroquímica ocorre sempre no *eletrodo de trabalho*, na interface eletrodo-eletrólito inerte. O potencial deste eletrodo é controlado através do *eletrodo de referência* com a ajuda de um potenciostato. O eletrodo de referência utilizado na experiência eletroquímica deve possuir uma impedância elevada de modo a não passar corrente por ele. A corrente da célula eletroquímica flui entre o eletrodo de trabalho e o *eletrodo auxiliar* através do eletrólito inerte.

Uma vez que, durante uma experiência eletroquímica, um potencial conhecido é aplicado ao eletrodo de trabalho, várias espécies eletricamente carregadas, as quais podem sofrer reações eletroquímicas, vão ser atraídas electrostaticamente para a superfície do eletrodo. Simultaneamente, as outras espécies presentes na solução também podem interagir com a superfície do eletrodo de trabalho através da adsorção. Como consequência desta interação, numa experiência eletroquímica é necessário considerar o transporte das espécies

do interior da solução para a superfície do eletrodo e a reação de transferência de elétron então resultante, que ocorre na superfície do eletrodo.

O movimento das espécies em solução, dentro de uma célula eletroquímica, é denominado de transporte de massa e pode ocorrer por difusão, migração e convecção. A concentração de espécies na interface depende do transporte de massa do interior da solução para a superfície do eletrodo.

O transporte de massa por convecção é provocado pelo movimento da solução e conseqüentemente das espécies devido a forças mecânicas, e pode ser controlado quando se agita a solução.

A migração consiste no movimento das espécies carregadas resultante do efeito do campo elétrico, criado pela deslocalização das cargas entre os eletrodos. A migração só afeta espécies carregadas e o seu efeito é minimizado com recurso a uma quantidade elevada de eletrólito inerte.

Por fim, a difusão consiste no movimento natural das espécies em solução devido a um gradiente de concentração e ocorre para todas as espécies, segundo as Leis de Fick. Este processo ocorre em todas as medições eletroquímicas.

Na proximidade da superfície do eletrodo (*camada de difusão*) as espécies são transportadas apenas por difusão, **Figura 1.22**, [137, 138]. Sendo importante distinguir os seguintes parâmetros:

- k_d – coeficiente de transferência de massa que descreve o processo de difusão da solução para a proximidade da superfície do eletrodo. Este processo é descrito pelas leis de Fick;

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

$$k_a = k_0 \exp[\alpha_a nF(E - E^{\theta'})/RT]$$

$$k_c = k_0 \exp[\alpha_c nF(E - E^{\theta'})/RT]$$

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

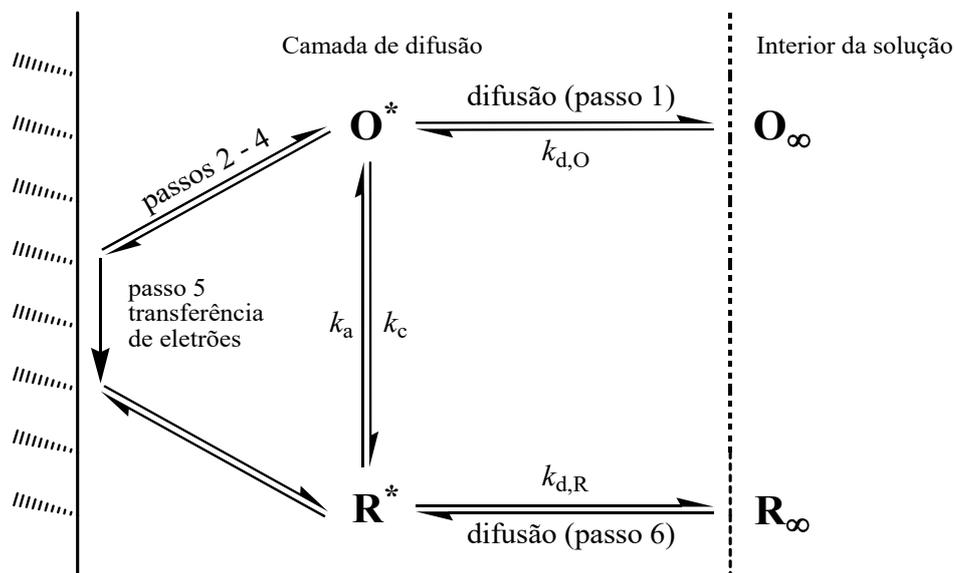


Figura 1.22. Esquema da transferência de elétron numa superfície de eletrodo; *passo 1* – difusão; *passo 2* – rearranjo da atmosfera iônica; *passo 3* – reorientação dos dipolos do solvente; *passo 4* – alterações nas distâncias entre o íon central e os ligandos; *passo 5* – transferência do elétron [137].

- $k_{d,O}$ e $k_{d,R}$ – coeficientes de transferência de massa das espécies O e R, que geralmente são diferentes, uma vez que os coeficientes de difusão também são diferentes;
- a formação da *dupla camada eletrolítica*. A dupla camada eletrolítica é a região interfacial onde ocorrem as reações eletroquímicas e onde o valor do potencial eletrostático difere do interior da solução. O conceito básico consiste num ordenamento de cargas na superfície do eletrodo e num ordenamento de uma quantidade igual de carga oposta para neutralizar a carga do eletrodo. A constante de proporcionalidade entre o potencial aplicado ao eletrodo e a carga devida às espécies ordenadas na região interfacial na solução é a *capacidade da dupla camada* [137, 138].

As constantes de velocidade de transferência de carga k_a e k_c dependem do potencial e da constante de velocidade padrão, o que conduz aos seguintes casos extremos:

- $k_d \ll k_0$ – *sistema reversível*, para qualquer potencial há sempre equilíbrio na superfície do eletrodo. A corrente é determinada apenas pelas diferenças de energia eletrônica entre o eletrodo e as espécies na solução e a sua velocidade para alcançar a superfície do eletrodo.
- $k_d \gg k_0$ – *sistema irreversível*, quando são atingidos potenciais mais elevados para que a reação ocorra, o transporte de massa não influencia a constante de transferência de carga e o processo é controlado pela cinética lenta da reação.

Considera-se por convenção, em todas as experiências eletroquímicas, que durante a reação de oxidação, o eletrodo de trabalho funciona como recetor de elétrons transferidos e a corrente anódica (I_a) tem um valor positivo. Contrariamente, durante a reação de redução, o eletrodo de trabalho funciona como dador de elétrons e a corrente catódica (I_c) tem um valor negativo.

As propriedades do eletrodo de trabalho têm uma grande importância uma vez que influenciam os resultados das medidas eletroquímicas. A escolha de um material de eletrodo depende de alguns fatores, principalmente do intervalo de potenciais úteis no solvente utilizado e da qualidade e pureza do material [137].

1.8.1 Técnicas de voltametria

Embora diversas técnicas possibilitem estudar os processos de eletrodo, as mais utilizadas são as técnicas de voltametria, as quais são usadas para identificar espécies presentes em solução, obter dados quantitativos e qualitativos e também estudar a natureza e os mecanismos das reações que ocorrem no sistema eletroquímico [139-141].

A voltametria consiste na medição da corrente que flui através do eletrodo de trabalho em função de um potencial aplicado. A aplicação de um potencial a um eletrodo origina uma corrente faradaica (I_f), que está diretamente relacionada com a transferência de carga, e uma corrente capacitiva (I_c), que é necessária para organizar as moléculas e os íons presentes na dupla camada do eletrodo. Dessa forma, a corrente total registrada é:

$$I_t = I_c + I_f$$

A corrente faradaica (I_f) devido à reação do eletrodo, é registrada no intervalo relevante de potencial onde se dá a reação de transferência de elétrons, porém também há uma contribuição capacitiva devido à variação de carga da dupla camada com o aumento do potencial e da velocidade de varrimento.

Em cada experiência voltamétrica o potencial aplicado, tal como a corrente medida, variam com o tempo. A curva de corrente em função do potencial registrada no decorrer do ensaio voltamétrico designa-se por *voltamograma* ou *onda voltamétrica*. A variação de potencial com o tempo é designada por *velocidade de varrimento* (v).

As técnicas de voltametria mais usadas são:

- *técnicas de varrimento cíclico de potencial* – consistem na aplicação de um potencial ao eletrodo de trabalho, que varia ciclicamente com o tempo e para diferentes velocidades.
- *técnicas de degrau e impulso* – consistem na aplicação ao eletrodo de trabalho de um degrau de potencial ou de corrente que altera instantaneamente o sistema eletroquímico e é medida a diferença. Entre elas, destacam-se a voltametria de impulso diferencial e de onda quadrada.

1.8.1.1 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (*Cyclic Voltammetry* – CV) é a técnica normalmente utilizada para iniciar o estudo eletroquímico de uma determinada espécie eletroativa, uma vez permite obter informações sobre a cinética das reações de transferência de eletrões, sobre as reações químicas acopladas e sobre os processos de adsorção [137].

A principal utilização tem sido para investigar mecanismos de reações eletroquímicas, identificar espécies presentes em solução através do estudo dos seus potenciais redox e para a análise semiquantitativa de velocidades de reações. Não é uma técnica recomendada para determinações analíticas uma vez que não apresenta a sensibilidade requerida para determinações quantitativas, sendo facilmente superada pelas técnicas de degrau e impulso.

A voltametria cíclica envolve a aplicação de um potencial ao eléctrodo de trabalho, que se altera em função do tempo, **Figura 1.23 (A)**. O potencial aplicado varia de forma linear a uma velocidade de varrimento constante, $v = dE / dt$, entre um potencial inicial (E_i) e um potencial final (E_f) previamente escolhidos.

Depois de iniciado o varrimento de potencial, o sentido deste é invertido quando se atinge um valor de potencial máximo (E_{max}), e novamente é invertido quando a seguir se atinge um valor de potencial mínimo (E_{min}), e assim sucessivamente de uma forma cíclica, o que caracteriza o nome da técnica. O sentido do varrimento de potencial pode ser positivo ou negativo. Os parâmetros essenciais a serem definidos são: o potencial inicial (E_i), a direção de varrimento inicial, a velocidade de varrimento (v), o potencial máximo (E_{max}), o potencial mínimo (E_{min}) e o potencial final (E_f).

O voltamograma cíclico apresentado na **Figura 1.23 (B)** corresponde a um processo de transferência de carga reversível, no qual o produto da oxidação (ou redução) é

posteriormente reduzido (ou oxidado) assim que ocorre a inversão do sentido do varrimento de potencial.

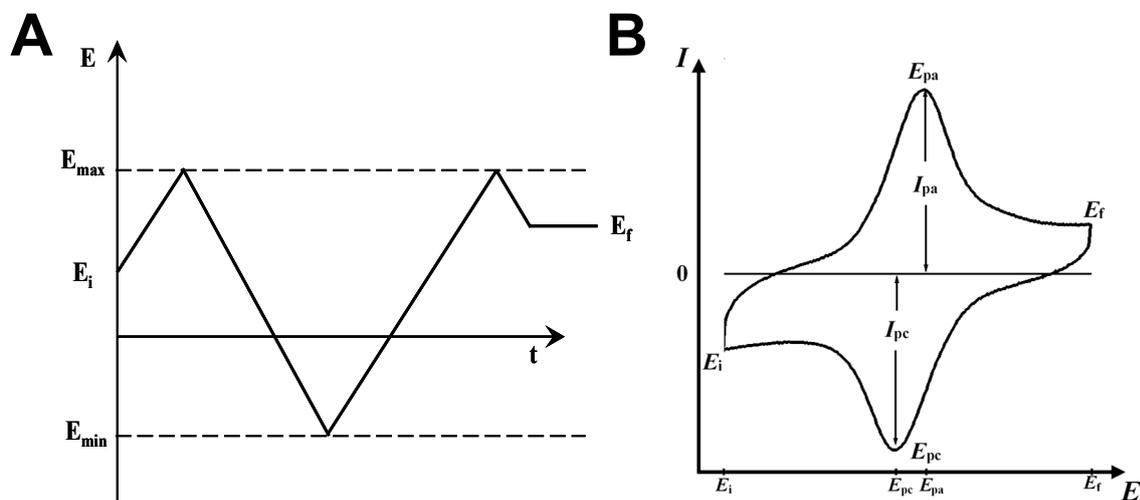


Figura 1.23. (A) Representação esquemática da variação de potencial com o tempo em voltametria cíclica. E_i – potencial inicial, E_f – potencial final, E_{max} – potencial máximo, E_{min} – potencial mínimo. (B) Voltamograma cíclico para uma reação reversível [137].

Para uma reação descrita pela equação $O + ne^- \rightleftharpoons R$, inicialmente só com espécies O em solução, durante o varrimento são geradas electroquimicamente espécies R, quando o potencial aplicado se torna suficiente “negativo”. Depois de invertida a direção do varrimento para o sentido positivo, as espécies R são oxidadas para O, conforme indica a corrente anódica. Sendo assim, a voltametria cíclica permite gerar rapidamente novas espécies durante o varrimento e, de seguida, analisa a espécie gerada no varrimento em sentido contrário, um pormenor muito importante atribuído a esta técnica [137, 138].

Os parâmetros importantes que permitem a caracterização do processo de eletrodo do sistema em estudo são: o potencial do pico anódico (E_{pa}), a intensidade máxima de corrente que resulta da reação de oxidação ou pico de corrente anódica (I_{pa}), o potencial do pico catódico (E_{pc}), e a intensidade máxima de corrente que resulta da reação de redução ou pico de corrente catódica (I_{pc}).

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

Por exemplo, as condições necessárias para que num determinado sistema eletroquímico ocorra uma transferência eletrônica com comportamento reversível são:

$$I_p \sim v^{1/2}$$

$$E_p \text{ independente de } v$$

$$|E_p - E_{p/2}| = 56,6 / n \text{ mV}$$

$$E_{pa} - E_{pc} = 57 / n \text{ mV}$$

$$|I_{pa} / I_{pc}| = 1$$

A aplicação das condições de reversibilidade permite calcular o número de elétrons transferidos na reação eletroquímica. Se a reação for reversível, pode também calcular-se o potencial formal de redução, $E^{0'}$, pela equação:

$$E^{0'} = \frac{E_{pc} - E_{pa}}{2}$$

Quando essas condições não são verificadas, o sistema pode ser considerado como *quasi-reversível* ou *irreversível*. A extensão da irreversibilidade de um sistema intensifica-se com o aumento da velocidade de varrimento, e os valores de I_{pa} e I_{pc} tornam-se bastante diferentes. Sendo assim, um sistema que para velocidades de varrimento baixas apresenta comportamento reversível, pode apresentar-se como não-reversível quando a velocidade de varrimento aumenta. No caso de uma reação irreversível o perfil voltamétrico é o mesmo, mas quando se inverte a direção do varrimento não vão aparecer picos de corrente no varrimento inverso.

Assim sendo, as condições necessárias para que ocorra uma transferência eletrônica com comportamento irreversível são:

$$|E_p - E_{p/2}| = 47,7/(\alpha n') \text{ (mV)}$$

$$\left. \frac{\partial E_{pa}}{\partial \log v} \right| = \frac{29,6}{\alpha n} \text{ mV}$$

E_p dependente de v

onde n' é o número de elétrons transferidos no passo determinante da velocidade da reação e α é o coeficiente de transferência de carga eletroquímica.

Desde que $\alpha \approx 0,5$ para ambos os processos, então $|I_{pa} / I_{pc}| \approx 1$ e o potencial formal pode ser aproximadamente dado pela equação utilizada para sistemas reversíveis.

A região de escala de tempo (ou de v) intermédia entre os processos reversível e irreversível é denominada de *quasi-reversíveis* e, nestes casos, a cinética das reações de oxidação e de redução tem que ser considerada simultaneamente. Em sistemas *quasi-reversíveis*, observa-se um pico reverso, mas com $\Delta E_p > 57 / n$ mV.

Outro fator que influencia substancialmente a resposta voltamétrica de um sistema eletroquímico é a adsorção de reagentes ou dos seus produtos de redox na superfície do eletrodo de trabalho.

As moléculas orgânicas, devido ao caráter hidrofóbico, adsorvem facilmente na superfície de eletrodos sólido e orientam-se na superfície do eletrodo seguindo uma geometria específica, consoante o potencial aplicado ao eletrodo ou a concentração da substância na solução. Independentemente da orientação das moléculas adsorvidas, o fenómeno tem uma grande influência sobre os resultados eletroquímicos [137].

Os efeitos da adsorção na resposta voltamétrica são vários, desde o efeito catalítico da reação redox até ao fenómeno mais comum que é o bloqueamento da superfície do eletrodo, o que conseqüentemente altera a forma da onda voltamétrica. Diversos estudos sobre os efeitos da adsorção de espécies na superfície de eletrodos foram investigados e

descritos por Laviron [142-144]. A corrente de pico, o potencial de pico e a forma analítica de um voltamograma cíclico para reações irreversíveis foram teoricamente calculadas, para situações em que as espécies em estudo estão adsorvidas na superfície do eletrodo.

No caso particular da adsorção de um reagente ou de um produto de uma reação de eletrodo o voltamograma cíclico apresenta-se simétrico, com o potencial dos picos de oxidação e redução coincidentes, **Figura 1.24**. Nesta reação reversível, só as espécies adsorvidas O e R contribuem para a reação total.

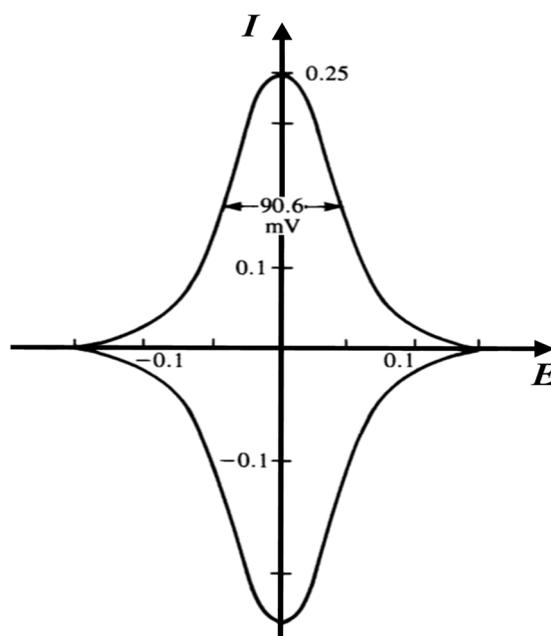


Figura 1.24. Voltamograma cíclico para um sistema reversível de espécies adsorvidas na superfície do eletrodo.

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

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

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

varrimento. Esta equação é válida apenas para sistemas reversíveis, em que a velocidade de varrimento é inferior a 10 mV s^{-1} e, nestes casos é possível determinar o número de elétrons transferidos pela largura a meia altura do pico de corrente $W_{1/2} = 90,6 / n \text{ mV}$, **Figura 1.24** [137].

Para valores baixos de velocidade de varrimento, o potencial do pico (E_{pa}) não sofre alteração, mas à medida que a velocidade aumenta, o sistema perde a sua reversibilidade e a curva corrente-potencial perde a simetria devido ao afastamento progressivo dos picos anódico e catódico para potenciais mais positivos ou mais negativos, respetivamente. Nesta situação, é possível determinar a constante de velocidade padrão (k_0) utilizando a equação:

$$k_0 = (\alpha n) F v_c (RT)^{-1}$$

onde o v_c é a velocidade de varrimento para a qual o sistema perde a reversibilidade.

O aumento da complexidade de um sistema eletroquímico reflete-se no voltamograma cíclico correspondente, que pode apresentar um ou vários picos anódicos e catódicos, consoante o número de reações eletroquímicas sucessivas ou os diferentes passos consecutivos que ocorrem na reação. A posição do segundo pico está relacionada com a primeira reação eletroquímica, se é energeticamente mais fácil ou mais difícil do que a primeira. A escolha do intervalo de potencial e de potenciais de inversão diferentes, depois do primeiro pico e antes do segundo, permite identificar quais os picos que aparecem no varrimento inverso e quais os que aparecem no varrimento inicial. Estas informações permitem identificar as espécies em solução e efetuar propostas relativamente aos seus mecanismos redox [137].

A transferência de carga no eléctrodo pode estar associada a reações químicas homogéneas acopladas na solução, que podem anteceder ou seguir a reação de transferência eletrónica.

O voltamograma cíclico é influenciado pela existência de uma reação química após o passo de transferência eletrônica (*Electrochemical-Chemical* – EC). Neste caso, verifica-se um desvio do pico de redução para valores menos negativos que pode levar ao desaparecimento do pico reverso, em consequência da remoção da espécie pela reação química subsequente em solução. Este deslocamento pode estar diretamente relacionado com a cinética da reação [145]. As condições necessárias para se verificar um reação EC são [145]:

$I_p / \nu^{1/2}$ decresce ligeiramente com o aumento de ν

E_{pc} é mais positivo do que $E^{0'}$

$|I_{pa} / I_{pc}| > 1$ e aumenta com o aumento de ν

Se a reação homogênea acoplada ocorrer antes da transferência eletrônica (*Chemical-Electrochemical* – CE) os voltamogramas cíclicos também sofrem alterações [137].

1.8.1.2 Técnicas de degrau e impulso

Um degrau de potencial (ou impulso) aplicado representa uma alteração instantânea no sistema eletroquímico. A análise da evolução do sistema depois desta perturbação permite fazer deduções sobre as reações de eletrodo e as suas velocidades.

O degrau de potencial é a base da voltametria de impulsos. A ideia principal no desenvolvimento das técnicas de impulso diferencial é a de minimizar a contribuição da corrente capacitiva na corrente total registada. Após a aplicação de um impulso de potencial a corrente capacitiva extingue-se mais rapidamente do que a corrente faradaica, deste modo a corrente é medida perto do fim do impulso.

Estes métodos são bastante úteis para elucidar processos de eletrodo devido ao aumento da sensibilidade e apresentam melhores características para aplicações analíticas [137].

A voltametria de impulso diferencial (*Differential Pulse Voltammetry – DPV*) consiste na aplicação de pequenos impulsos de potencial sucessivos, de amplitude ΔE_p (amplitude de impulso), em intervalos periódicos de tempo (τ), sobre uma rampa ou escada de potencial com degrau de ΔE_s .

As medições de corrente são efetuadas imediatamente antes da aplicação do impulso (I_1) e depois da aplicação do impulso (I_2), **Figura 1.25 (A)**, que representa o tipo de onda de potencial aplicado ao eletrodo de trabalho. A diferença entre estas duas correntes é o valor de corrente registado num voltamograma de impulso diferencial, **Figura 1.25 (B)** [137].

O tempo τ' , durante o qual o impulso de potencial é aplicado define a *largura do impulso*. O tempo τ é o intervalo entre duas aplicações sucessivas de impulso e determina conjuntamente com o valor de ΔE_s , a velocidade de varrimento $\nu = \tau \Delta E_s$. Nesta técnica a velocidade de varrimento efetiva varia normalmente entre 1 e 10 mV s⁻¹ [137].

Como a voltametria de DP é uma técnica diferencial, a resposta é semelhante à primeira derivada de um voltamograma diferencial, ou seja, um pico. O potencial do pico (E_p) pode ser identificado aproximadamente com $E_{1/2}$. Com o aumento da irreversibilidade do sistema, E_p afasta-se de $E_{1/2}$ (sistema reversível), simultaneamente aumenta a largura do pico e a sua altura diminui [137].

A amplitude escolhida para o impulso de potencial (ΔE_p) deve ter em consideração a reação em estudo e a sensibilidade exigida, uma vez que grandes amplitudes geram correntes capacitivas residuais que podem impossibilitar a deteção da corrente faradaica, conduzindo a uma perda de resolução.

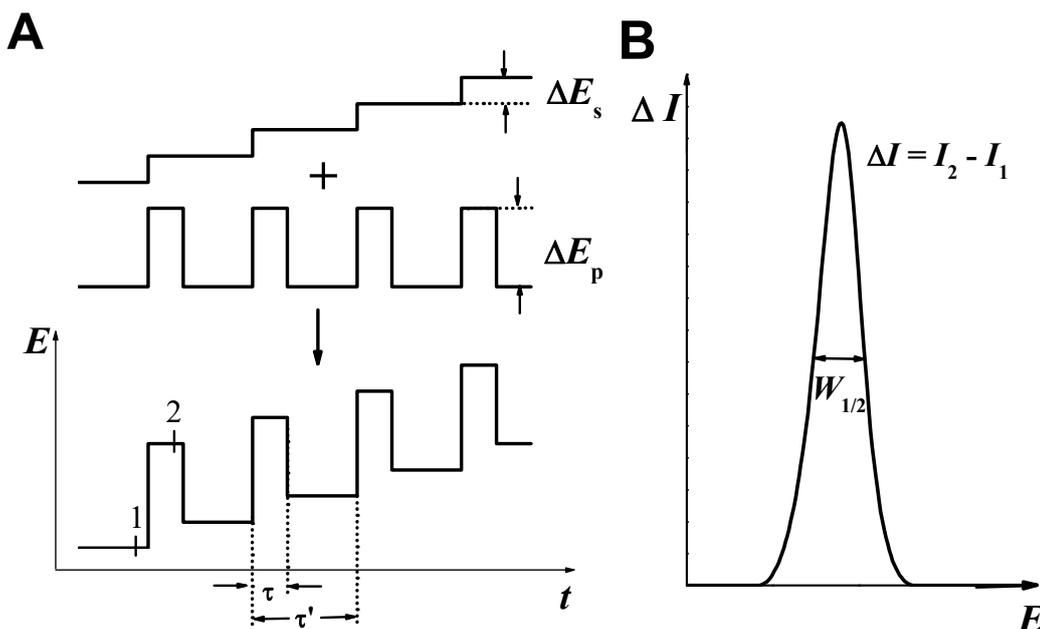


Figura 1.25. (A) Esquema da aplicação de potenciais em voltametria de DP; (B) Voltamograma I vs. E típico de voltametria de DP [137].

Para amplitudes de impulso pequenas, quando $\Delta E \rightarrow 0$, a largura a meia altura do pico de corrente ($W_{1/2}$) é inversamente proporcional ao número de elétrons transferidos:

$$W_{1/2} = \frac{3,52RT}{nF} = \frac{91}{n}$$

o que permite caracterizar o mecanismo da reação de transferência de carga. [245]. A intensidade do pico de corrente (I_p) é proporcional à concentração do analito, mas depende da velocidade da reação eletroquímica.

Na voltametria de onda quadrada (*Square Wave Voltammetry* – SWV) a forma da onda gerada resulta da adição de uma onda quadrada de amplitude de impulso (ΔE_p) a uma escada de potencial com degraus de amplitude (ΔE_s), e com um período τ . O tipo de onda de potencial gerado para um sistema reversível está representado na **Figura 1.26**.

Na construção da onda, durante cada ciclo de frequência $f = \tau^{-1}$, um impulso de potencial positivo é aplicado ao elétrodo durante metade do ciclo a que se segue, na restante metade, aplica-se um impulso de potencial negativo [137].

As medições realizam-se antes do fim de ambos os impulsos, positivo e negativo, após cada metade de ciclo. A corrente total, ΔI ou I_t que é registada, corresponde à diferença entre a corrente $I(1)$ registada no final do impulso de potencial direto – corrente direta (*forward current* – I_f), e a corrente $I(2)$ registada no final do impulso inverso – corrente inversa (*backward current* – I_b), logo $I(2)$ possui sinal contrário a $I(1)$. Sendo assim, para sistemas reversíveis, $\Delta I = I(1) - I(2)$ e é maior do que $I(1)$, **Figura 1.26** [137].

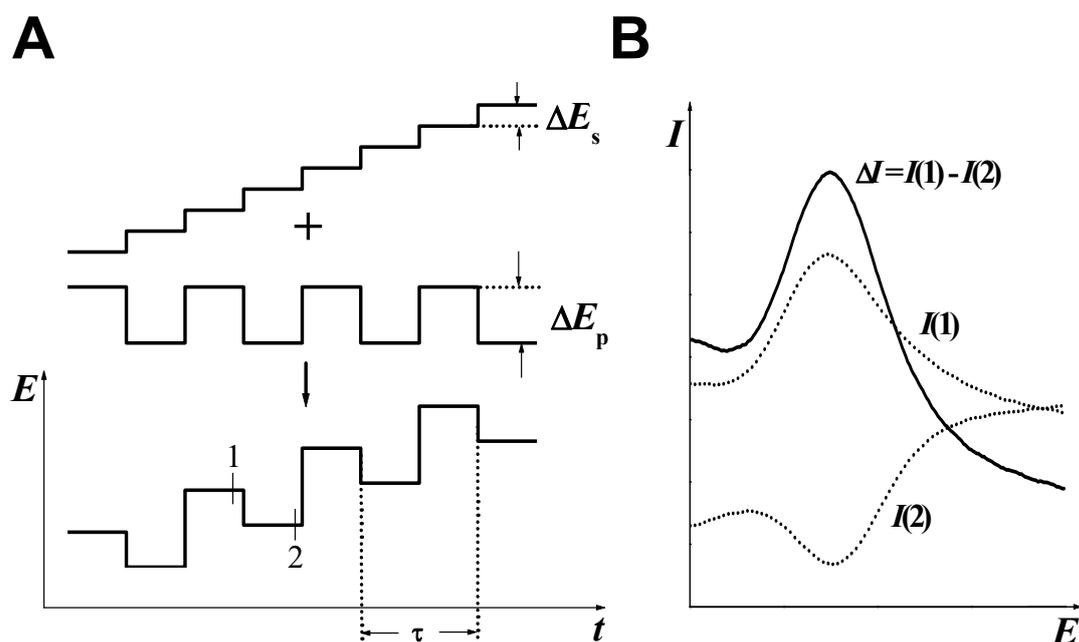


Figura 1.26. (A) Esquema da aplicação de potenciais em voltametria de SW; (B) Voltamograma I vs. E típico de voltametria de SW [137].

A subtração das correntes direta e inversa permite realizar determinações eletroanalíticas sem necessidade de desoxigenação da amostra, uma vez que é possível remover a corrente resultante da redução do oxigénio dissolvido, tornando a análise mais rápida e menos dispendiosa [137].

Este tipo de amostragem e tratamento da corrente é responsável pelo aumento da sensibilidade apresentado por esta técnica, relativamente à voltametria de DP, no caso de sistemas reversíveis.

Outro aspecto importante está relacionado com a velocidade de varrimento, enquanto outras técnicas funcionam com velocidades de varrimento efetivas entre 1 e 10 mV s⁻¹, a voltametria de SW pode alcançar 1 V s⁻¹. A maior velocidade na análise leva a um menor consumo de espécies eletroativas relativamente à voltametria de DP e, deste modo, reduz os problemas relacionados com o bloqueamento da superfície do elétrodo. A velocidade efetiva (v_{ef}) é calculada pela expressão $v_{ef} = \Delta E_s \times f$. Sendo assim, tempos experimentais muito curtos podem ser obtidos utilizando-se frequências moderadas, de maneira que os dados obtidos possam oferecer informações sobre a cinética do processo eletrónico.

1.8.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica

A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (*Electrochemical Impedance Spectroscopy* – EIS) tem sido amplamente utilizada na análise de processos eletroquímicos que ocorrem na interface-solução eletrolítica [146].

Esta técnica baseia-se no princípio de aplicação de uma pequena perturbação de potencial ou de corrente no sistema eletroquímico, enquanto nos métodos voltamétricos, baseados em varrimento de potencial ou degrau de potencial, o sistema é perturbado longe do equilíbrio.

Geralmente, a resposta à perturbação aplicada na EIS é sinusoidal e pode diferir em fase e amplitude do sinal aplicado. A medição da diferença de fase e de amplitude, ou seja, impedância, permite a avaliação do processo de elétrodo em relação às contribuições da difusão, da cinética, da dupla camada, de reações homogéneas acopladas, etc.

Diante das suas potencialidades, a EIS tem sido aplicada em estudos de corrosão, de membranas, de sólidos iónicos, de eletrólitos sólidos, de polímeros condutores e de interface líquido/líquido, biossensores [147-150]. A obtenção das informações a partir dos

dados de impedância eletroquímica pode ser através de diferentes métodos, sendo o mais usual o uso de circuitos elétricos análogos ou circuitos equivalentes.

A aplicação de circuitos equivalentes tem como fundamento as semelhanças entre o comportamento eletroquímico e um circuito elétrico, composto tipicamente por resistências e capacitâncias, na sua maioria os fenômenos estudados em eletroquímica ocorrem em regiões de frequências bem determinadas, baixas e altas, compreendidas entre 0,01-100 kHz.

Para um processo de eletrodo simples as combinações usadas normalmente para reações faradaicas incluem: uma componente que representa o transporte por difusão, uma componente que representa a cinética e uma componente que representa a capacidade da dupla camada. Considerando a aplicação de um sinal perturbador sinusoidal da forma:

$$E(t) = E_0 \sin(\omega t)$$

onde ω representa a frequência da perturbação (rad s^{-1}). A resposta é:

$$I(t) = \frac{E_0}{|Z|} \sin(\omega t + \varphi)$$

onde φ é o ângulo de fase entre a perturbação e a resposta. O fator de proporcionalidade, Z , entre a perturbação e a resposta é definido como a impedância elétrica de um sistema.

No caso de uma resistência pura, R , a resposta do sistema é dada pela lei de Ohm:

$$I(t) = \frac{E(t)}{R} = \frac{E_0}{R} \sin(\omega t)$$

A impedância é caracterizada pela amplitude e ângulo de fase e pode ser descrita como:

$$Z = Z' + iZ''$$

$$Z' = (E_0 / I_0) \cos \varphi$$

$$Z'' = (E_0 / I_0) \sin \varphi$$

e então:

$$\{ (Z')^2 + (Z'')^2 \}^{1/2} = |Z| = E_0 / I_0$$

Sendo assim, qualquer célula eletroquímica pode ser representada em termos de um circuito elétrico equivalente, designado por circuito de Randles [137], **Figura 1.27**.

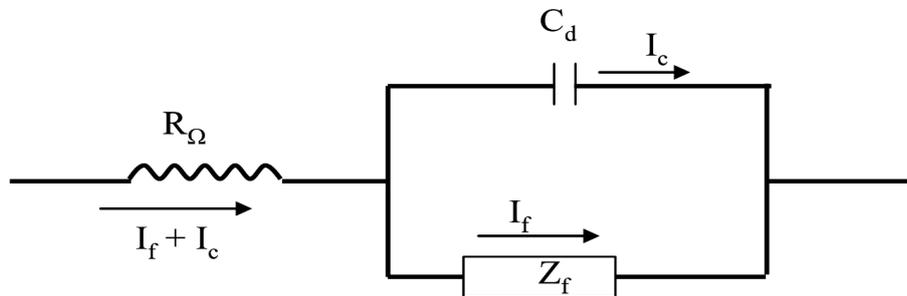


Figura 1.27. Circuito elétrico equivalente de uma célula eletroquímica para um processo de eletrodo simples [137].

O circuito de Randles inclui os seguintes parâmetros:

- a dupla camada: um condensador de capacidade (C_d);
- a impedância do processo faradaico (Z_f);
- a resistência não compensada, R_{Ω} , que é a resistência da solução entre os

elétrodos de trabalho e de referência.

A impedância (Z_f) pode ser subdividida em dois modos equivalentes:

- uma resistência (R_s) em série com uma pseudo-capacitância (C_s);
- uma resistência de transferência de carga (R_{ct}) e uma impedância que mede a

dificuldade de transporte de massa das espécies eletroativas, chamada de impedância de Warburg (Z_w).

A representação dos dados mais utilizada é o diagrama em plano complexo, onde se representa Z' em função de Z'' . Uma alternativa de representação é o diagrama de Bode onde se representa $\log |Z|$ ou φ vs. $\log(\omega)$.

Para o circuito equivalente de Randles completo de uma reação de transferência de carga simples, separando os componentes de impedância em fase e fora de fase, pode mostrar-se que:

$$Z' = R_{\Omega} + \frac{R_{ct} + \sigma\omega^{-1/2}}{(\sigma\omega^{1/2}C_d + 1)^2 + \omega^2 C_d^2 (R_{ct} + \sigma\omega^{-1/2})^2}$$

$$-Z'' = \frac{\omega C_d (R_{ct} + \sigma\omega^{-1/2})^2 + \sigma^2 C_d + \sigma\omega^{-1/2}}{(\sigma\omega^{1/2}C_d + 1)^2 + \omega^2 C_d^2 (R_{ct} + \sigma\omega^{-1/2})^2}$$

Estes componentes estão representados por um gráfico no plano complexo na **Figura 1.28**, denominado gráfico de Sluyters ou Cole-Cole. As duas formas-limite destas equações são:

$$\omega \rightarrow 0$$

$$Z' = R_{\Omega} + R_{ct} + \sigma\omega^{-1/2}$$

$$Z'' = -\sigma\omega^{-1/2} - 2\sigma^2 C_d$$

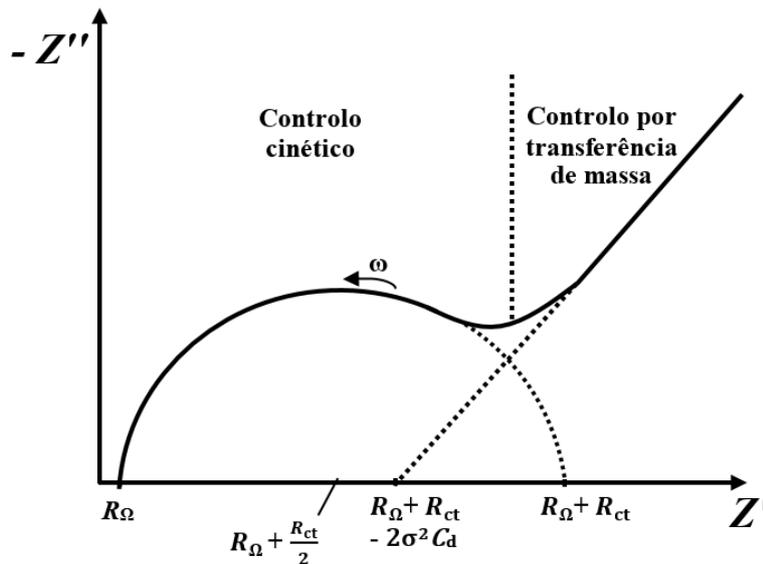


Figura 1.28. Gráfico de impedância no plano complexo de um sistema eletroquímico simples [137].

Este limite de baixa frequência é uma linha reta de inclinação unidade, que extrapolada para o eixo real, dá uma interceção de $(R_{\Omega} + R_{ct} - 2\sigma^2 C_d)$. A linha corresponde a uma reação controlada somente por difusão, e a impedância é a impedância de Warburg, sendo o angulo de fase $\pi/4$.

$$\omega \rightarrow \infty$$

No limite de altas frequências, o controle é puramente cinético e $R_{ct} \gg Z_w$. A analogia elétrica é uma combinação paralela RC . Assim as equações tornam-se:

$$Z' = R_{\Omega} + \frac{R_{ct}}{1 + \omega^2 C_d^2 R_{ct}^2}$$

$$Z'' = - \frac{\omega^2 C_d R_{ct}^2}{1 + \omega^2 C_d^2 R_{ct}^2}$$

Conforme pode ser observado nas equações acima, na região de altas frequências a componente real da impedância tende a R_{Ω} , enquanto nas regiões de baixa frequência tende a $R_{\Omega} + R_{ct}$. Este comportamento permite obter informações sobre a resistência da célula à transferência de carga, na região de altas frequências e na região de baixas frequências.

Ao eliminar a frequência nas expressões anteriores obtém-se a relação entre a componente imaginária e a componente real da impedância, de acordo com:

$$\left(Z' - R_{\Omega} - \frac{R_{ct}}{2} \right)^2 + (Z'')^2 = \left(\frac{R_{ct}}{2} \right)^2$$

Esta expressão representa graficamente um círculo de raio $R_{ct} / 2$ com interseção no eixo dos Z' de R_{Ω} ($\omega \rightarrow \infty$) e de $R_{\Omega} + R_{ct}$ ($\omega \rightarrow 0$).

Neste contexto, a representação gráfica da componente imaginária da impedância Z'' , vs. a componente real da impedância Z' pode fornecer informações sobre as possíveis naturezas dos elementos que constituem a impedância total do sistema.

A EIS é uma técnica utilizada para obter informação relativa às modificações que normalmente ocorrem na dupla camada eletrolítica durante a adsorção de várias espécies. Devido ao ordenamento das cargas elétricas na superfície do eletrodo, a dupla camada eletrolítica é comparável a um condensador clássico de placas paralelas cuja capacitância é dada por:

$$C = \epsilon_0 \epsilon_r \frac{A}{d}$$

onde ϵ_0 é a permissividade de vácuo, ϵ_r a permissividade relativa, A é a área de superfície do eletrodo e d a largura da dupla camada. Sendo assim, as medições de impedância fornecem

informações sobre a permitividade do meio dielétrico formado à superfície do eletrodo após a adsorção da respectiva substância, tal como sobre a largura da dupla camada eletrolítica.

A rugosidade e a porosidade, características de eletrodos sólidos, dão lugar ao chamado elemento de fase constante (CPE). Em sistemas reais, o CPE manifesta-se como um condensador não-ideal; no caso de uma interface bloqueada este elemento é descrito por:

$$Q_{\text{CPE}} = b(i\omega C)^\alpha$$

onde b é uma constante de proporcionalidade. Está demonstrado que para eletrodos porosos, o parâmetro de rugosidade é $\alpha = 0,5$ e para eletrodos lisos é $\alpha = 1$.

Estudos mais aprofundados podem ser realizados aplicando a técnica de EIS. Neste trabalho, a técnica foi utilizada com o intuito de caracterizar a superfícies dos eletrodos, sejam elas limpas ou modificadas, bem como após interações, na presença de sondas redox. Os resultados obtidos através desta técnica juntamente com as outras técnicas apresentadas anteriormente conduziram a importantes informações sobre o desenvolvimento de eletrodos modificados, biossensores eletroquímicos de DNA e suas aplicações.

1.8.3 Microbalança de Cristal de Quartzo

A microbalança de cristal de quartzo (*Quartz Crystal Microbalance* – QCM) é um instrumento composto por transdutores piezoelétricos e um circuito oscilador, que acoplado a um sistema de medição permite avaliar as variações de massa na ordem de microgramas a nanogramas por unidade de área [151].

Essas mudanças podem ser monitoradas em tempo real para obter informações úteis sobre interações moleculares ou reações que ocorrem na superfície do eletrodo, como o crescimento do filme, oxidação, corrosão, desadsorção e adsorção de monocamadas de filmes ultrafinos ou de moléculas.

O princípio operacional da QCM é baseado no efeito piezoelétrico que ocorre em materiais cristalinos com específicas cristalografias conhecidos como materiais “acêntricos” [152]. Piezoeletricidade é definida como a geração de eletricidade em resposta à deformação mecânica causada por estresse mecânico ou como a geração de deformação física na aplicação de eletricidade em tais cristais. Alguns minerais respondem à estas perturbações, como por exemplo, o quartzo que além de ser piezoelétrico, também possui uma combinação única de propriedades que o tornam um candidato ideal para dispositivos ultrasensíveis.

A análise da variação da espessura do cristal com a frequência foi descrita por Sauerbrey e relaciona as alterações de frequência de ressonância do cristal com a variação de massa rígida acoplada na superfície de elétrodos através da equação [153]:

$$\Delta f = - \frac{2f_0^2}{A \sqrt{\mu_q \rho_q}} \Delta m$$

onde f_0 é a frequência de ressonância do cristal (Hz), Δf é a variação de frequência (Hz), Δm é a variação de massa (g), A é a área piezoelétrica (cm^2), ρ_q a densidade do quartzo ($2,648 \text{ g cm}^3$) e μ_q é o módulo de cisalhamento do cristal de quartzo corte AT = $2.947 \times 10^{11} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

O sistema QCM típico consiste em um cristal de quartzo com elétrodos depositados em ambos os lados, **Figura 1.29**, um suporte de cristal para afixar o cristal e fornecer conexão elétrica, um oscilador que direciona o cristal para sua frequência de ressonância e um controlador ou monitor que traduz a mudança de frequência e armazena os parâmetros do processo.

A equação de Sauerbrey é válida sob as três condições seguintes: (i) a massa adicionada é pequena em comparação com a massa do próprio cristal, (ii) a massa adicionada é rigidamente adsorvida e (iii) a massa é distribuída uniformemente sobre a área ativa do cristal, **Figura 1.30**.

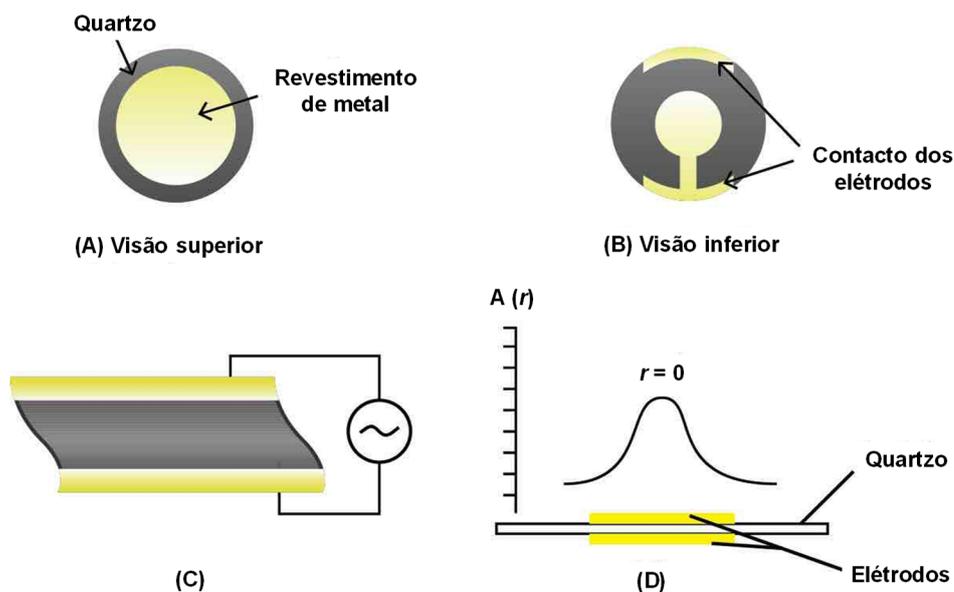


Figura 1.29. Representação do cristal de quartzo (cinza) com os elétrodo (amarelo); (A) visão superior, (B) visão inferior; (C) Representação esquemática da tensão induzida em um cristal de corte AT na aplicação de corrente alternada. (D) Representação esquemática de como a amplitude da vibração ($A(r)$) varia com a distância (r) do centro do sensor. A área de vibração é chamada de área de superfície ativa e é sensível a mudanças de massa [154].

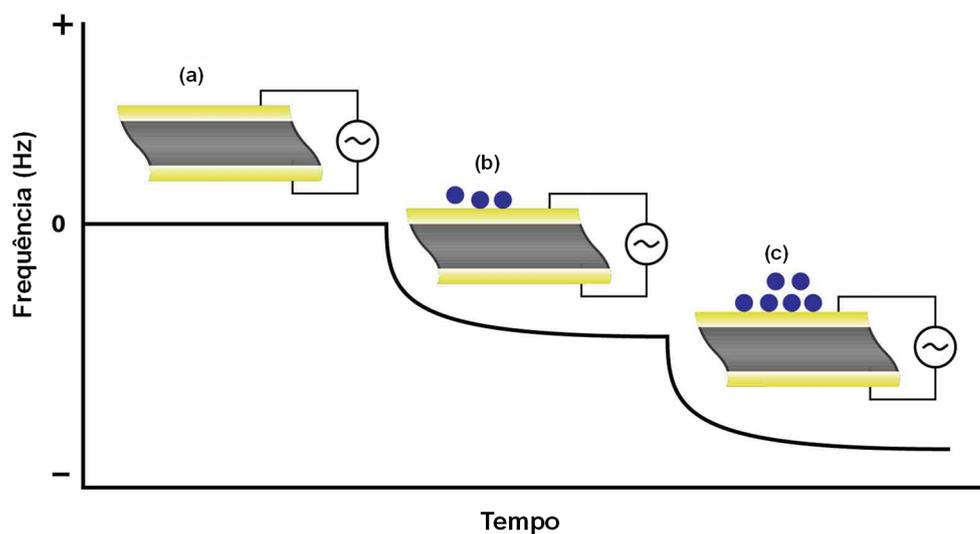


Figura 1.30. Representação esquemática das descobertas de Sauerbrey: (A) o cristal de quartzo oscila a uma frequência constante quando a voltagem apropriada é aplicada, (B) a frequência de oscilação começa a diminuir conforme as moléculas começam a se depositar na superfície do cristal, e (C) a frequência diminui como mais depósito de moléculas [155].

Nos últimos anos a QCM tem sido utilizada para estudar uma infinidade de interações moleculares em solução, uma vez que baseada na determinação de massa na

superfície do sensor, pode ser aplicada no estudos de processos físicos e químicos que ocorrem nas superfícies *in situ* e em tempo real [154, 156]. Ademais, a técnica é muito versátil e pode ser associada a outras técnicas, sendo elas óticas, eletroquímicas e de estudo de superfícies.

Neste trabalho, a técnica foi utilizada para auxiliar na compreensão do mecanismo de interação proteína-dsDNA. Os resultados obtidos através desta técnica juntamente com as outras técnicas utilizadas propiciaram importantes informações sobre o desenvolvimento biossensores eletroquímicos de DNA e suas aplicações.

CAPÍTULO 2

Experimental

Neste capítulo apresenta-se uma descrição dos reagentes, soluções, métodos de investigação, instrumentação, tratamento dos dados e condições experimentais utilizadas ao longo deste trabalho, no estudo eletroquímico das moléculas descritas nos próximos capítulos, por voltametria cíclica, voltametria de impulso diferencial e voltametria de onda quadrada, bem como na interação destas moléculas com dsDNA, por voltametria de impulso diferencial, espectroscopia de absorção no ultravioleta-visível, eletroforese em gel, espectroscopia de impedância eletroquímica e microbalança de cristal de quartzo.

2.1 Materiais e Reagentes

As soluções tampão de eletrólito inerte de diferentes pH foram preparadas de acordo com a **Tabela 2.1** [157], a partir de reagentes de alta pureza analítica. Todas as soluções foram preparadas em água purificada (condutividade $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$) pelo sistema Millipore Milli-Q System (Millipore S.A., Molsheim, França).

Tabela 2.1. Composição das soluções de eletrólito inerte.

Eletrólitos inertes					pH
Diluições para 100 mL					
0,2 M	KCl (25 mL)	+	0,2 M	HCl (42,5 mL)	1,2
0,2 M	KCl (25 mL)	+	0,2 M	HCl (6,5 mL)	2,0
0,2 M	NaOAc (3,7 mL)	+	0,2 M	HAcO (46,3 mL)	3,4
0,2 M	NaOAc (13,2 mL)	+	0,2 M	HAcO (36,8 mL)	4,3
1,0 M	NaOAc (7,2 mL)	+	1,0 M	HAcO (12,5 mL)	4,5
0,2 M	NaOAc (41,2 mL)	+	0,2 M	HAcO (8,8 mL)	5,4
0,2 M	Na ₂ HPO ₄ (6,15 mL)	+	0,2 M	NaH ₂ PO ₄ (43,85 mL)	6,1
0,2 M	Na ₂ HPO ₄ (30,5 mL)	+	0,2 M	NaH ₂ PO ₄ (19,5 mL)	7,0
0,2 M	Na ₂ HPO ₄ (47,35 mL)	+	0,2 M	NaH ₂ PO ₄ (2,65 mL)	8,0
0,025 M	Na ₂ B ₄ O ₇ (50 mL)	+	0,1 M	NaOH (3 mL)	9,2
0,2 M	KCl (25 mL)	+	0,2 M	NaOH (6 mL)	12,0
0,2 M	KCl (25 mL)	+	0,2 M	NaOH (42 mL)	2,8

Todos os compostos, **Tabela 2.2**, foram utilizados sem purificação adicional. As soluções estoque de cada uma das substâncias foram preparadas de acordo com suas solubilidades. As concentrações específicas utilizadas durante as medidas voltamétricas estão referidas no texto e foram obtidas com a célula eletroquímica após a diluição do composto no eletrólito inerte apropriado. As soluções estoque foram armazenadas no frigorífico a 4 °C.

A solução estoque de DPT foi preparada em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 e congelada a -20 °C, depois de descongelada esta solução não foi nunca utilizada por mais que um dia. Este procedimento foi seguido de acordo com a sugestão de armazenamento em longo prazo do documento de informações do produto fornecido pela Sigma-Aldrich, de forma que assegurasse a atividade do fármaco.

O nivolumab (OPDIVO® 40 mg/4 mL) é preparado pela Bristol-Myers Squibb Farmacêutica Portuguesa para administração intravenosa (IV) como um produto estéril,

isento de conservantes e não pirogênico em citrato de sódio desidratado, cloreto de sódio, manitol, ácido pentético, polissorbato 80, hidróxido de sódio (para ajuste do pH), ácido clorídrico (para ajuste do pH) e água para preparações injetáveis. Após reconstituição em pH 6,5, uma solução estoque de 10 mg mL⁻¹ de NIVO foi obtida e armazenada a 4° C.

Tabela 2.2. Substâncias utilizadas no desenvolvimento deste trabalho.

Substância	Procedência	Pureza (%)
Ácido 13- <i>cis</i> -retinóico	Sigma-Aldrich	≥98
Ácido <i>all-trans</i> -retinóico	Sigma-Aldrich	≥98
Ácido poliadenílico	Sigma-Aldrich	–
Ácido poliguanílico	Sigma-Aldrich	–
<i>All-trans</i> -retinol	Sigma-Aldrich	≥95
Brometo de Etídio	Sigma-Aldrich	–
CT-dsDNA	Sigma-Aldrich	–
CuSO ₄ .5H ₂ O	Sigma-Aldrich	≥ 98
Daptomicina	Sigma-Aldrich	≥90
Dimetilsulfóxido	Sigma-Aldrich	≥99.7
DL-ditiotreitól	Sigma-Aldrich	98
Dodecil sulfato de sódio	Sigma-Aldrich	≥ 98,5
K ₃ [Fe(CN) ₆]	Sigma-Aldrich	~ 99
K ₄ [Fe(CN) ₆]	Sigma-Aldrich	99,98
Metanol	Sigma-Aldrich	≥99.8
Metformina	Sigma-Aldrich	≥98
Miltefosina	Sigma-Aldrich	≥98
Nivolumab	OPDIVO®	–
Soro fetal bovino	Sigma-Aldrich	–
Triptofano	Sigma-Aldrich	≥99
Tris(5-carboxietil)fosfina	Sigma-Aldrich	≥ 98
Ureia	Sigma-Aldrich	–
XF-dsDNA	CIRM	–

Soluções estoque de $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ DNA dupla hélice (dsDNA), proveniente do timo de vitela (calf thymus – CT) tipo II (“altamente polimerizado” 62% de Na/13% de água e comprimento de 10,000-15,000 bp), foram preparadas em água desionizada e a concentração foi determinada por espectrofotometria de absorção no UV-Visível: 1 a.u. $\text{Abs}_{260 \text{ nm}} = 50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA. Semelhantemente, foram preparadas soluções estoque de $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ ácido poliguanílico (poly[G]) e ácido poliadenílico (poly[A]).

Os microvolumes das soluções preparadas e utilizadas ao longo das experiências foram medidos com auxílio de micropipetas ajustáveis Pipetman P1000, P200 e P20 (Gilson S. A., Villiers-le-Bel, França) e micropipetas computadorizadas EP-10 and EP-100 Plus (Rainin Instrument Co. Inc., Woburn, USA). As medidas dos valores de pH foram efetuadas utilizando o medidor de pH Crison microPH 2001 (Crison Instruments S.A., Barcelona, Espanha), com um eletrodo de vidro combinado Crison. Todas as medidas experimentais foram efetuadas à temperatura ambiente de $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.2 Parâmetros Voltamétricos e Células Eletroquímicas

Durante todos os ensaios voltamétricos a célula eletroquímica esteve ligada a um potenciostato/galvanostato Autolab (Autolab Electrochemical Instruments, Utrecht, Holanda) a funcionar no modo potenciostático, sendo o controlo dos parâmetros voltamétricos efetuado por intermédio do software GPES 4.9 (Echo-Chemie, Utrecht, Holanda).

As experiências foram realizadas utilizando uma célula eletroquímica de único compartimento com capacidade de 2 mL (eDAQ Europe) com um sistema de três eletrodos. Os ensaios foram realizados utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro (BDDE) $\{5 \times 5 \text{ mm}^2\}$, ou um eletrodo de carbono vítreo (GCE) de diâmetro $\Phi = 1,0 \text{ mm}$ (BAS Inc., Tóquio, Japão), como eletrodos de trabalho, um eletrodo de fio

de platina como contra elétrodo e um elétrodo de Ag/AgCl (3 M KCl) (eDAQ Europe) como elétrodo de referência.

Os filmes de diamante dopado com boro foram preparados no Centre Suisse de Electronique et de Microtechnique SA (CSEM) (Neuchâtel, Suíça), em substratos de silício pela técnica de Deposição Química a partir da Fase Vapor assistida por Filamento Quente (HF-CVD) com uma temperatura do filamento no intervalo de 2440–2560 °C e uma mistura gasosa contendo metano, H₂ e trimetilboro. Este processo HF-CVD propicia o crescimento de filmes colunares, policristalinos aleatoriamente texturizados de BDD com uma superfície denominada por facetas {111}. O teor final de boro obtido foi na ordem de 8000 ppm, com área superficial de 5,5 × 5,5 mm² e espessura de ~1 µm [158].

As condições experimentais para voltametria cíclica (CV) foram: um degrau de potencial de $\Delta E_s = 2$ mV para diferentes velocidades de varrimentos de potenciais. Para voltametria de impulso diferencial (DP) foram: amplitude de impulso de 50 mV, largura do impulso 70 ms, degrau de potencial de $\Delta E_s = 2$ mV e velocidade de varrimento de $v = 5$ mV s⁻¹. Para voltametria de onda quadrada (SW) foram sempre mantidos constantes os seguintes parâmetros: amplitude de impulso de 50 mV, frequência de 13 Hz e degrau de potencial de $\Delta E_s = 2$ mV, correspondendo a uma velocidade de varrimento efetiva de $v_{ef} = 25$ mV s⁻¹.

2.3 Pré-tratamento Eletroquímico da Superfície do BDDE

Antes de cada experiência, o BDDE foi lavado abundantemente com etanol e água Milli-Q e sua superfície foi ativada eletroquimicamente em solução HNO₃ 1,0 M utilizando o pré-tratamento catódico: um potencial de -2,0 V foi aplicado por 30 segundos. Em seguida, o elétrodo foi submetido a varrimentos cíclicos entre os

potenciais limites de $E_1 = 0,0 \text{ V}$ e $E_2 = +1,4 \text{ V}$, até um sinal estável ser detetado (15-20 ciclos a uma velocidade de varrimento de potencial de 150 mV s^{-1}).

Após esta ativação eletroquímica, o BDDE foi lavado abundantemente com água Milli-Q, colocado em uma solução de eletrólito inerte apropriado e sucessivos voltamogramas cíclicos foram registados entre os potenciais limites de $E_1 = 0,0 \text{ V}$ e $E_2 = +1,4 \text{ V}$ até a obtenção de um sinal estável (3–5 ciclos a uma velocidade de varrimento de potenciais de 50 mV s^{-1}). Este procedimento assegurou resultados experimentais muito reprodutíveis.

2.4 Pré-tratamento Mecânico e Eletroquímico do GCE

Antes de cada experiência eletroquímica, a superfície do GCE foi limpa mecanicamente e condicionada eletroquimicamente. Primeiramente, o GCE foi lavado com etanol e água Milli-Q e a superfície foi polida com spray de diamante (UK Kemet, tamanho de partículas $1 \mu\text{m}$) em uma placa de polimento. Após o polimento, o GCE foi lavado abundantemente com água Milli-Q. A seguir ao tratamento mecânico, o GCE foi colocado na solução de eletrólito inerte apropriada e sucessivos voltamogramas cíclicos foram registados entre os potenciais limites de $E_1 = 0,0 \text{ V}$ e $E_2 = +1,3 \text{ V}$ até que um sinal estável fosse detetado (3-5 ciclos a uma velocidade de varrimento de potencial de 50 mV s^{-1}). Este procedimento foi realizado antes de cada experiência eletroquímica e assegurou resultados experimentais reprodutíveis.

2.5 Preparação dos Biossensores Eletroquímicos de DNA

Durante o estudo da interação entre as moléculas e o dsDNA, os elétrodos de diamante dopado com boro e carbono vítreo foram modificados pela imobilização de

dsDNA do timo de vitela na superfície, conduzindo à preparação dos biossensores eletroquímicos de dsDNA.

A modificação superficial dos elétrodos com DNA baseou-se na imobilização de dsDNA nas superfícies dos elétrodos, previamente limpas e condicionadas em eletrólito inerte, conforme os procedimentos de pré-tratamentos das *Secções 2.3 e 2.4*. De acordo com a concentração da solução de dsDNA e do método de imobilização, por eletrodeposição ou deposição mecânica, foram obtidos diferentes tipos de elétrodos modificados. A aplicação de um método de imobilização ou de outro depende do uso final do elétrodo modificado e da sua interação com os analitos utilizados.

2.5.1 Biossensores eletroquímicos de dsDNA de camada fina em BDDE

Os biossensores eletroquímicos de dsDNA utilizando a superfície do BDDE foram obtidos pela adsorção eletrostática através da aplicação do potencial +0,5 V durante 3 minutos numa solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5 contendo 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA.

Em seguida, os biossensores eletroquímicos de dsDNA foram removidos das soluções, lavados com água destilada, a fim de remover as moléculas de dsDNA não adsorvidas na superfície do BDDE, e secos sob um fluxo constante de $\text{N}_{2(\text{g})}$.

Também foram efetuadas modificações da superfície do BDDE com soluções de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ poly[G] e poly[A] preparadas da mesma maneira do biossensor eletroquímico de dsDNA descrito.

2.5.2 Biossensores eletroquímicos de dsDNA de multicamada em GCE

Os biossensores eletroquímicos de dsDNA de multicamada foram preparados pela cobertura da superfície do GCE com três gotas de 5 μL de uma solução de

50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA em água desionizada. Após a deposição de cada gota sobre a superfície do eletrodo, o biossensor foi seco sob um fluxo constante de $\text{N}_{2(\text{g})}$.

Similarmente, para os biossensores eletroquímicos de poly[G] e poly[A] multicamada, a superfície do GCE foi recoberta com três gotas de uma solução contendo 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ poly[G] ou poly[A] em água desionizada. Também, após a deposição de cada gota sobre a superfície do eletrodo, o biossensor foi seco sob um fluxo constante de $\text{N}_{2(\text{g})}$.

Este procedimento assegurou uma cobertura completa da superfície do eletrodo necessária para evitar a formação de um filme de rede fino e incompleto de ligação não específica de dsDNA-fármaco, dsDNA ou fármaco co-adsorvidos à superfície do eletrodo.

2.6 Preparação da Amostra e Determinação de 13-*cis*-RA em um Fármaco

A formulação oral farmacêutica usada, Roacutan[®] (Roche), foi uma cápsula gelatinosa dura contendo 20 mg de isotretinoína (13-*cis*-RA), como princípio ativo farmacêutico, incorporado em uma quantidade desconhecida de uma matriz viscosa contendo glicerol, óleos de soja e de diferentes adjuvantes.

A fim de extrair 13-*cis*-RA, a cápsula gelatinosa dura de Roacutan[®] (Roche) foi incubada em 2,0 mL de DMSO e digerida durante 2 horas. Após a digestão, foram adicionados 8,0 mL de metanol e a amostra total foi sonicada durante 1 hora, e ultracentrifugada durante 15 minutos a 4000 rpm. A solução líquida sobrenadante foi considerada como solução estoque de Roacutan[®], separada e analisada.

O método de adição múltipla de padrões foi iniciado com um volume de amostra da solução estoque de Roacutan[®] de 2,0 μL , em 2,0 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 como eletrólito inerte na célula eletroquímica. Os volumes das adições de padrões

correspondentes a 2,0, 4,0 e 6,0 μM 13-*cis*-RA foram adicionados. Este procedimento foi repetido com uma cápsula diferente por três vezes ($n = 3$).

2.7 Preparação da Amostra para Determinação de DPT em Fluido Biológico

A determinação de DPT foi investigada em fluido biológico de soro fetal bovino pelo método de adição/recuperação. As amostras foram deliberadamente contaminadas com $2,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ DPT. As medidas foram realizadas em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 utilizando voltametria de DP, em um intervalo de potencial de +0,4 V a +0,8 V *vs.* Ag/AgCl. Após o registo de um voltamograma de DP na ausência de DPT, uma alíquota da amostra contaminada foi adicionada à célula eletroquímica para ser obtida uma concentração final de $2,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ DPT e então diretamente analisada. Este procedimento foi realizado em triplicado ($n = 3$) e a superfície do GCE estava sempre limpa.

2.8 Oxidação eletroquímica do NIVO nativo e desnaturado

A oxidação eletroquímica direta do anticorpo monoclonal anticâncer NIVO nativo e desnaturado foi investigada utilizando três procedimentos eletroquímicos.

2.8.1 Oxidação Eletroquímica do NIVO Nativo em Solução

Soluções com diferentes concentrações de NIVO foram preparadas em eletrólito inerte tamponado 0,1 M com $2,0 < \text{pH} < 9,0$. O GCE foi colocado na célula eletroquímica, contendo a solução de NIVO, onde foi realizada a voltametria de DP. Todos os voltamogramas foram registados imediatamente após a imersão do eletrodo limpo na célula eletroquímica contendo a solução da amostra.

2.8.2 Oxidação Eletroquímica do Filme Espesso com Multicamadas de NIVO Nativo Adsorvido no GCE

Um filme espesso com multicamadas de NIVO nativo foi adsorvido na superfície do GCE e utilizado para investigar seu comportamento eletroquímico por meio da técnica de voltametria de DP. O filme com multicamadas de NIVO nativo adsorvido em GCE foi preparado pela deposição de três gotas com volume equivalente a 5,0 μL contendo 5,0 mg mL^{-1} de NIVO na superfície do GCE. Após a deposição cada gota foi seca sob um fluxo constante de $\text{N}_{2(\text{g})}$. O GCE com o filme com multicamadas de NIVO nativo adsorvido foi colocado na célula eletroquímica, contendo apenas a solução tampão, para sua hidratação por 5 minutos, onde posteriormente foram registados os voltamogramas de DP.

2.8.3 Oxidação Eletroquímica do Filme Espesso com Multicamadas de NIVO Desnaturado Adsorvido no GCE

A oxidação eletroquímica do NIVO desnaturado foi investigada utilizando o filme espesso com multicamadas de NIVO desnaturado adsorvido na superfície do GCE, por voltametria DP. O filme espesso com multicamadas de NIVO adsorvido em GCE foi preparado, conforme a *Secção 2.8.2*, e incubados em tampão acetato 0,1 M pH 6,0, durante diferentes períodos de tempo: 30, 60, 120 e 180 min, nos diferentes agentes desnaturantes: 6 M ureia, 33,33 mM SDS, 10 mM DTT ou 10 mM TCEP.

Os agentes desnaturantes e suas concentrações foram escolhidos com base nos protocolos para procedimentos eletroforéticos comumente aplicados para desestabilizar e desdobrar estruturas proteicas [159].

Após cada incubação, o filme espesso com multicamadas de NIVO desnaturado adsorvido em GCE foi removido da solução, lavado com água desionizada, para remover o excesso de ureia, SDS, DTT ou TCEP, e colocado na célula eletroquímica, contendo apenas o eletrólito inerte tampão acetato 0,1 M pH 6,0, onde foi realizada a voltametria de DP.

Para garantir que os picos observados sejam exclusivamente ocasionados pelo efeito desnaturante ou redutor na estrutura do NIVO, voltamogramas de DP controlo do GCE incubado em cada agente desnaturante, nas mesmas condições e pelos mesmos períodos de tempo, em tampão acetato de 0,1 M pH 6,0 foram registados. Também, o controlo do filme espesso com multicamadas de NIVO nativo adsorvido em GCE, *Secção 2.8.2*, foi incubado em tampão acetato 0,1 M pH 6,0, para os mesmos períodos de tempo, e os voltamogramas de DP foram registados.

2.9 Cultura da bactéria e extração do DNA

A cultura e extração da bactéria *Xylella fastidiosa subsp. multiplex* foi realizada pelo *Centre International de Ressources Microbiennes* do *Institut National de la Recherche Agronomique* (França). O processo de extração do DNA bacterial foi realizado de acordo com o protocolo para extração de DNA genómico utilizando o kit de purificação do DNA genómico Wizard[®] (Promega). Processo este que integrou uma etapa de precipitação e exclusão das proteínas, resultando apenas dsDNA. Após a extração e purificação do DNA, a qualidade do DNA bacterial foi analisada com um aparato nanodrop, resultando em uma amostra com concentração de 820 ng mL⁻¹ XF-dsDNA.

2.10 Preparação e Incubação dos Biossensores Eletroquímicos de XF-dsDNA

Os biossensores eletroquímicos de XF-dsDNA foram preparados pela deposição de uma gota contendo 5,0 μL de solução de 820 ng mL^{-1} XF-dsDNA sobre a superfície do GCE previamente limpa e condicionada, conforme o procedimento da *Secção 2.4*.

As incubações dos biossensores eletroquímicos de XF-dsDNA foram realizadas em soluções tampão acetato 0,1 M pH 4,5 contendo 1,0 mM Cu(II) por diferentes períodos de tempo: 30, 60 e 120 minutos. Ao término de cada período de incubação, os biossensores eletroquímicos de XF-dsDNA foram retirados, lavados excessivamente com água desionizada e transferidos para célula eletroquímica, onde os voltamogramas de DP e EIS foram registados.

Semelhantemente, os biossensores eletroquímicos de CT-dsDNA, preparados conforme a *Secção 2.5.2*, foram incubados em 25,0 μM Cu(II) pelos mesmos períodos de tempo, e avaliados por voltametria de DP e EIS.

No tratamento de doenças na agricultura são utilizados compostos de cobre com concentração de entre 1,0-4,0 kg hL^{-1} . Esta informação foi levada em consideração e através de cálculos determinou-se a concentração de 1,0 mM Cu(II), a qual foi utilizadas nas incubações com os biossensores eletroquímicos de XF-dsDNA.

Para as incubações com os biossensores eletroquímicos de CT-dsDNA foi utilizada a concentração 25,0 μM , considerando que o nível normal de cobre no sangue humano é de aproximadamente 16,0 μM [160], portanto, foi testado um ambiente com excesso de cobre.

2.11 Espectrofotometria na Região do Ultravioleta-Visível

As medidas espectrofotométricas foram realizadas utilizando um Espectrofotômetro Hitachi U-2810 operando com o software UV Solution Program (Digilab Hitachi, Tóquio, Japão). As condições experimentais para os espectros de absorção foram: largura da fenda 1,5 nm, intervalo de amostragem 0,5 nm e velocidade de varrimento de 100 nm min⁻¹ (resolução de 1 nm). Todos os espectros de UV-Vis foram obtidos em cuvetes de quartzo com um caminho ótico de 10,0 mm.

2.12 Eletroforese em Gel

Gel de agarose não-desnaturante a 1,0% (com grau ultrapuro para DNA) foi preparado em tampão TAE (10 mM Tris, 4,4 mM de ácido acético e 0,5 mM EDTA, pH 8,0). Aliquotas de 25 µL das soluções controlo de dsDNA e fármaco, e das amostras de fármaco-dsDNA (com 0,25% de azul de bromofenol em água desionizada) foram colocadas nos poços e a eletroforese foi realizada em tampão TAE por 1 hora a ~100 V. Após, o DNA foi corado com 0,5% de brometo de etídio (EtBr) para visualização da mobilidade e então fotografado sob transiluminação UV (312 nm).

2.13 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

As experiências de EIS foram realizadas utilizando um potenciostato IVIUM conectado ao programa IviumSoft versão 2.219 (Ivium Technologies, Eindhoven, Holanda). Durante o registo dos espectros de impedância foi aplicado um sinal de perturbação sinusoidal de amplitude de raiz quadrática média (r.m.s.) de 10 mV num intervalo de frequências 60 kHz a 0,01 Hz, com sete valores de frequência por dec. As medidas de EIS foram efetuadas no potencial de meia ($E_{1/2}$) do $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$,

obtido nas experiências de CV, $E_{ap} = +0,25$ V, utilizando GCE, em eletrólito inerte apropriado, para diferentes concentrações de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$.

2.14 Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo

Os estudos gravimétricos efetuados utilizando uma QCM, integrada numa plataforma AWS A20, com um cristal de quartzo coberto com ouro em ambas as faces e revestido com grafite (AuQC_Gr) com frequência de ressonância de 9 MHz, a funcionar com o programa A20RPSOft (AWSensors, Scientific Technology, Valência, Espanha). A célula integrada na plataforma AWS A20 foi acoplada a um computador controlado por um potenciostato IVIUM em combinação com o programa IviumSoft versão 2.219 (Ivium Technologies, Eindhoven, Holanda). Antes do uso, os AuQC_Gr foram limpos com etanol e água Milli-Q, e secos sob atmosfera de $N_{2(g)}$ puro.

2.15 Interações Fármacos-dsDNA e Proteína-dsDNA

2.15.1 Soluções incubadas

A interação entre os fármacos ou proteína e dsDNA foi inicialmente investigada com soluções incubadas em tampão acetato 0,1 M pH 4,5 durante diferentes períodos de tempo utilizando eletroquímica, espectrofotometria UV-Vis e eletroforese em gel, de acordo com as descrições em cada capítulo. Soluções controlo de dsDNA e dos fármacos e proteína foram preparadas em eletrólitos inertes apropriados e guardadas em condições similares durante o mesmo período de tempo. Voltamogramas de DP foram registados em solução após diferentes tempos de incubação sempre utilizando uma superfície de BDDE ou GCE limpa e previamente condicionada.

2.15.2 Biossensores eletroquímicos de dsDNA

Os biossensores eletroquímicos de dsDNA, poly[G] e poly[A] foram imersos em soluções contendo diferentes concentrações dos fármacos e proteína, em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, permitindo a incubação durante diferentes períodos de tempo, conforme indicado no texto.

Em seguida, os biossensores eletroquímicos de dsDNA, poly[G] e poly[A] foram removidos das soluções, lavados com água destilada a fim de remover as moléculas dos fármacos que não interagiram, secos sob um fluxo constante de N_{2(g)} e colocados na célula eletroquímica contendo apenas solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, onde a transdução foi realizada por voltametria de DP.

Para cada experiência, um novo biossensor eletroquímico de dsDNA, poly[G] e poly[A] foi preparado. A fim de garantir que os picos foram exclusivamente oriundos das interações dos fármacos com dsDNA, poly[G] ou poly[A], experiências controle utilizando estes biossensores eletroquímicos foram realizadas pelas incubações em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5 durante o mesmo período de tempo e condições similares, como as soluções dos fármacos e proteína.

2.16 Aquisição e Apresentação dos Dados

Alguns voltamogramas cíclicos ou de impulso diferencial foram previamente sujeitos à subtração com o voltamograma obtido nas mesmas condições apenas em solução de eletrólito inerte. Outros voltamogramas de impulso diferencial foram sujeitos à correção de linha de base através de um algoritmo matemático “moving average” utilizando um degrau de 5 mV, incluído no software GPES versão 4.9.

Este tratamento matemático possibilitou a melhoria da visualização e identificação dos picos sobre a linha de base, sem introduzir qualquer artefacto, embora

a altura do pico seja, em alguns casos, reduzida (<10%) em relação à da curva não tratada. No entanto, o tratamento matemático dos voltamogramas originais foi utilizado para a apresentação de todos os voltamogramas experimentais para uma melhor e mais clara identificação dos picos. Os valores de pico de corrente em todos os gráficos apresentados foram determinados a partir dos voltamogramas originais não tratados após subtração da linha de base.

Todos os espectros de UV-Vis estão apresentados sem qualquer outro tratamento matemático e todos os valores de λ_{max} e absorbância foram obtidos a partir dos espectros originais.

Os espectros de EIS foram analisados de acordo com o circuito elétrico equivalente de Randles utilizando o programa ZView (Scribner Associates, EUA).

Os gráficos de hidrofobicidade do NIVO [101], sequência DB09035 fornecida pelo banco de dados *DrugBank* [161], foram obtidos usando a ferramenta online *ProtScale* [162], do *ExPASy-Bioinformática Resource Portal* [163], com tamanho de 9 aminoácidos. A estrutura do anticorpo monoclonal NIVO foi obtida usando o software *Protein Workshop 4.2.0* [164], da *Protein Data Bank RCSB PDB* [165-167].

O software ChemDraw Ultra versão 12.0 (Cambridge Soft Corporation) foi utilizado para desenhar as estruturas das moléculas e mecanismos.

Todos os gráficos e figuras de voltamogramas, espectros de absorção e EIS foram efetuados utilizando o software OriginPro, versão 8 (Microcal Software, Inc., USA). O algoritmo de Savitsky-Golay foi utilizado sempre que houve a necessidade de eliminar ruído de fundo sobreposto ao sinal voltamétrico.

CAPÍTULO 3

Antiacne Isotretinoína

A acne é, possivelmente, a doença cutânea mais frequente, afetando entre 85-100% da população em qualquer momento da sua vida e deve-se ao facto dos folículos pilosos apresentarem excesso de gordura e células da pele mortas. Em um estudo de prevalência no norte de Portugal observou-se a doença em 82,4% de jovens antes dos 15 anos, sendo que apenas 44% desses jovens faziam tratamento [168].

Neste capítulo é apresentado primeiramente o estudo eletroquímico e o mecanismo de transferência de eletrões do antiacne isotretinoína (13-*cis*-RA) por meio das técnicas de voltametria cíclica, de DP e de SW, utilizando um eléctrodo de diamante dopado com boro e a sua determinação eletroanalítica num composto farmacêutico. Posteriormente, a interação 13-*cis*-RA-dsDNA foi investigada *in situ* em soluções incubadas por voltametria de DP e espectrofotometria UV-Vis, e com biossensores eletroquímicos de dsDNA, poly[G] e poly[A] por voltametria de DP.

3.1 Introdução

O desenvolvimento de análogos sintéticos de retinoides emergiu da necessidade de encontrar um agente com um maior índice terapêutico do que a vitamina A, uma fonte de retinol (ATR), ou dos seus derivados que ocorrem naturalmente. A isotretinoína ((2Z,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexenil)nona-2,4,6,8-tetraenóico), também conhecida como ácido 13-*cis*-retinóico (13-*cis*-RA), sintetizado em 1955, foi o primeiro retinoide utilizado na terapia da acne ou como medicamento quimioterápico [169].

Desde a sua aprovação, o 13-*cis*-RA tem sido usado principalmente como um medicamento farmacêutico oral no tratamento de acne nodular recalcitrante grave, inflamatória e conglobata [170], e raramente, para prevenir certos câncros da pele [171]. A absorção do fármaco ocorre via trato gastrointestinal e a concentração sanguínea de pico é atingida em 2-4 horas após ingestão. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm evidenciado o efeito terapêutico do 13-*cis*-RA no tratamento da acne, tais como, a supressão do tamanho e atividade da glândula sebácea [172, 173], a inibição do processo de inflamação e hiperqueratinização [173], indução de apoptose em glândulas sebáceas [174], a inibição da di-hidrotestosterona [175], a qual é o androgénio mais potente, que influencia diretamente a acne, e normalização da expressão das metaloproteinases da matriz tecidual [176].

Embora o 13-*cis*-RA tenha revolucionado o tratamento de acne severa, efeitos adversos, como teratogenicidade, disfunção hepática, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, secura na pele e mucosas, alopecia, distúrbios visuais, pseudotumor cerebral, artralgia e dor muscular, bem como transtornos psiquiátricos, como a depressão, ideação suicida, psicose, agressividade e impulsividade, têm sido relatados [176].

A fim de prevenir estes efeitos secundários há uma necessidade contínua da determinação farmacocinética do 13-*cis*-RA, de modo que os problemas, como a interação fármaco-fármaco ou fármaco-complexo bimolecular, possam ser avaliados. Sendo assim, a deteção e quantificação de 13-*cis*-RA são também muito importantes.

Portanto, para apoiar os estudos farmacocinéticos com velocidade suficiente, procedimentos analíticos adequados são necessários. A separação, quantificação e deteção do 13-*cis*-RA são principalmente realizadas usando o método de cromatografia líquida com diferentes detetores, tais como espectrofotometria na região do ultravioleta [177-180], espectrometria de massa [178, 181-185], espectrometria de massa-tandem [186], fluorescência [187], fotodíodos [188] e eletroquímica [189-191]. O comportamento eletroquímico de diferentes retinoides, incluindo o 13-*cis*-RA, e a sua quantificação simultânea em cosméticos utilizando elétrodos de carbono vítreo modificados com metais eletrodepositados foi reportado [192].

A oxidação do 13-*cis*-RA dá origem a 4-oxo-isotretinoína, como o metabolito principal, tretinoína (ácido *all-trans*-retinóico (ATRA)) e ácido 4-oxo-tretinoína, **Figura 3.1**, sendo que, estudos adicionais são necessários para elucidar o seu mecanismo de ação a nível regulatório da transcrição de genes.

A investigação do mecanismo de oxidação eletroquímica do 13-*cis*-RA é importante uma vez que poderia resultar em uma melhor compreensão dos dados já conhecidos e aumentar o conhecimento geral acerca dos mecanismos fisiológicos de ação.

Neste sentido, este trabalho teve como objetivo investigar o comportamento eletroquímico e o mecanismo de transferência de eletrões do 13-*cis*-RA utilizando as técnicas de voltametria cíclica, de pulso diferencial e de onda quadrada em um elétrodo de diamante dopado com boro, e realizar sua determinação eletroanalítica no medicamento Roacutan[®]. Também, foi investigado eletroquimicamente *in situ* a interação

13-*cis*-RA-dsDNA em soluções incubadas por voltametria de DP e espectrofotometria UV-Vis e utilizando biossensores eletroquímicos de dsDNA, poly[G] e poly[A] por voltametria de DP.

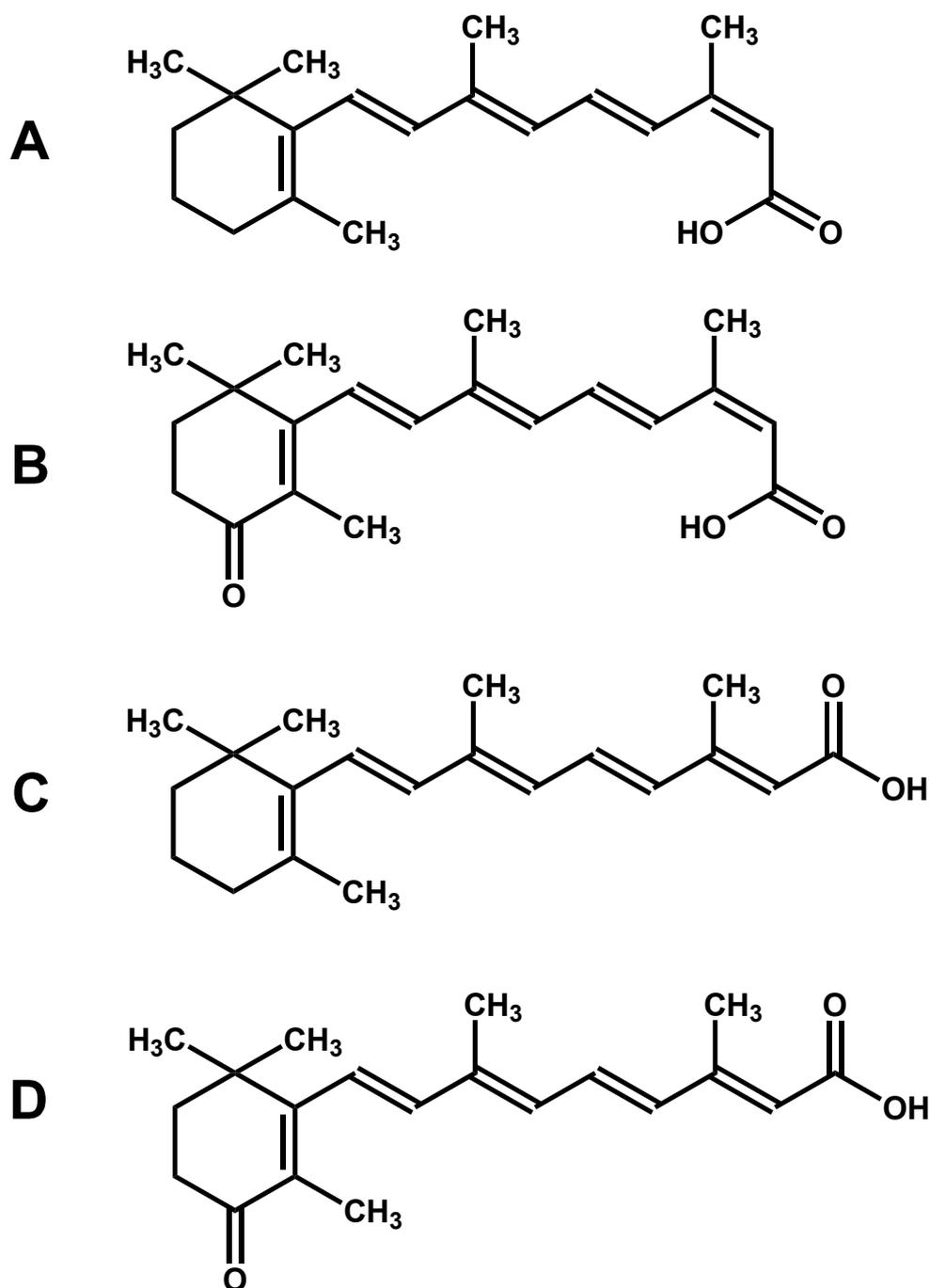


Figura 3.1. Estruturas químicas: (A) isotretinoína, (B) 4-oxo-isotretinoína, (C) tretinoína e (D) ácido 4-oxo-tretinoína.

A escolha do diamante dopado com boro (BDDE) como superfície do eletrodo de trabalho para investigar o comportamento eletroquímico e o mecanismo de transferência de elétrons do 13-*cis*-RA, bem como sua interação com dsDNA, foi baseada nas suas interessantes propriedades, em comparação com os eletrodos de carbono ou de ouro, tais como a estabilidade, tanto em soluções de eletrólitos aquosas como não-aquosas, adsorção negligenciável de moléculas orgânicas, baixa e estável corrente voltamétrica de fundo e baixa capacitância, resultando em um baixo limite de detecção [137].

3.2 Estudo Eletroquímico e Analítico

3.2.1 Voltametria Cíclica

O comportamento eletroquímico do 13-*cis*-RA utilizando BDDE foi inicialmente estudado por CV em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, a uma velocidade de varrimento $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$. Os voltamogramas cíclicos registados com BDDE em 100 μM de 13-*cis*-RA, entre os limites de potenciais +0,25 V e +1,15 V, apresentaram três picos de oxidação, sendo o pico P1a em $E_{p1a} = +0,60 \text{ V}$, pico P2a em $E_{p2a} = +0,77 \text{ V}$ e o pico P3a em $E_{p3a} = +0,98 \text{ V}$, **Figura 3.2**.

No sentido voltamétrico inverso, nenhum pico catódico foi observado, o que indica que o processo de oxidação foi irreversível para 13-*cis*-RA utilizando BDDE [193]. Ao registrar sucessivos varrimentos sem a limpeza da superfície do eletrodo, um decréscimo das correntes para todos os picos foi observado, devido à adsorção de 13-*cis*-RA e/ou oxidação de seus produtos na superfície do BDDE, **Figura 3.2**.

O efeito da velocidade de varrimento no processo de oxidação para o pico P1a do 13-*cis*-RA foi investigado ao registrar voltamogramas cíclicos em 100 μM de

13-*cis*-RA em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, com velocidades de varrimento entre 5 e 50 mVs⁻¹, utilizando sempre um novo BDDE ativado.

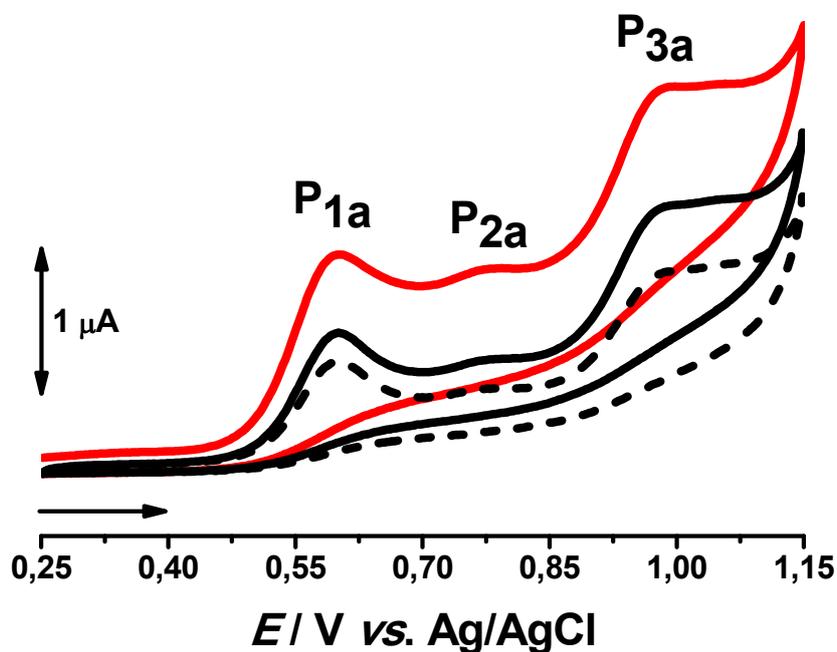


Figura 3.2. Voltamogramas cíclicos obtidos em 100 μM de 13-*cis*-RA utilizando BDDE em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, (—) primeiro, (—) segundo e (- - -) terceiro varrimento, $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$.

As correntes dos picos de oxidação P1a, $I_{pa} \text{ (A)} = 2,99 \times 10^5 n (\alpha_c n')^{1/2} A [R]_{\infty} D_O^{1/2} v^{1/2}$, aumentaram linearmente com $v^{1/2}$, indicando que o processo de oxidação foi limitado pela difusão [193] e o coeficiente de difusão para 13-*cis*-RA, $D_{13-cis-RA} = 1,07 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, foi calculado. A área eletroativa do BDDE, $A = 0,127 \text{ cm}^2$, foi determinada utilizando hexacianoferrato(II) de potássio 1,0 mM em solução tampão fosfato ($D_O = 7,35 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$).

3.2.2 Voltametria de Impulso Diferencial

O efeito do pH na oxidação eletroquímica do 13-*cis*-RA pelo BDDE foi investigado em um amplo intervalo de pH utilizando DPV. Os voltamogramas de DP foram registados em soluções contendo 25 μM de 13-*cis*-RA utilizando BDDE ativado.

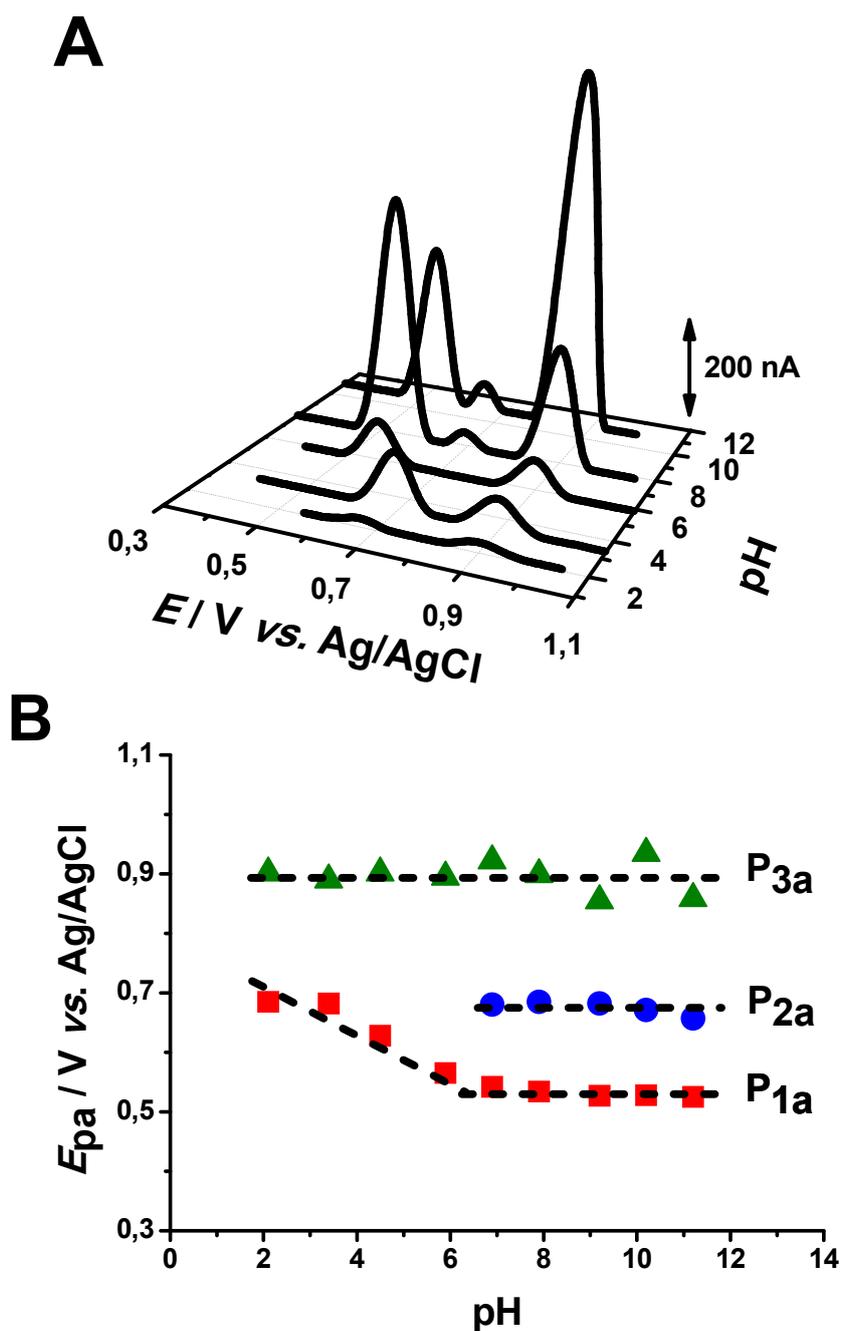


Figura 3.3. (A) Voltamogramas de DP em 3D, com a linha de base corrigida, utilizando BDDE, em 25 μM de 13-*cis*-RA, em diferentes pHs, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$; (B) E_p vs. pH.

Para $2,1 < \text{pH} < 6,2$, **Figura 3.3 (A)**, apenas os picos de oxidação P1a e P3a foram observados. O pico de oxidação P1a mostrou-se independente do pH, de acordo com a equação:

$$E_{p1a} (\text{V}) = 0,77 - 0,033 \text{ pH}$$

Com o aumento do pH > 6,2 o pico anódico P2a, em $E_p = +0,71$ V, pôde ser observado e a reação de oxidação ocorreu de forma independente do pH, com a transferência de um elétron, **Figura 3.3 (A)**. Além disso, o potencial de oxidação para o pico P1a também se tornou independente para pH > 7,0 e o último pico de oxidação P3a manteve-se sempre independente do pH.

A variação de E_p vs. pH, **Figura 3.3 (B)**, de 33 mV/pH e a largura de meia-altura de pico de $W_{1/2} \sim 60$ mV evidenciou que o mecanismo de oxidação do pico P1a envolve a transferência de dois elétrões e um próton. O pico de oxidação P3a demonstrou ser independente do pH, a largura de meia-altura foi próxima do valor teórico de $W_{1/2} \sim 90$ mV e o mecanismo de oxidação envolveu a transferência de um elétron.

3.2.3 Voltametria de Onda Quadrada

Uma das vantagens mais importantes da voltametria de SW é a possibilidade de verificar a reversibilidade da reação de transferência eletrônica durante um único varrimento. Uma vez que a corrente é amostrada antes do fim de ambos os impulsos, positivo e negativo, os picos correspondentes à oxidação e redução das espécies eletroativas na superfície do elétrodo podem ser obtidos no mesmo ciclo. Outras vantagens estão relacionadas com maior velocidade de análise, menor consumo das espécies eletroativas em relação com a voltametria de DP e redução de problemas com a adsorção na superfície do GCE [137]. Dessa forma, as experiências de voltametria de SW permitem confirmar o mecanismo de oxidação do 13-*cis*-RA, **Figura 3.4**.

Os voltamogramas de SW foram obtidos em 50 μ M de 13-*cis*-RA, em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 utilizando BDDE ativado. Similarmente a CV e voltametria de DP, três reações consecutivas foram observadas. A partir da corrente direta (I_f) e inversa (I_b)

obtidas pela corrente total (I_t) do primeiro varrimento, a irreversibilidade dos três picos redox pode ser confirmada.

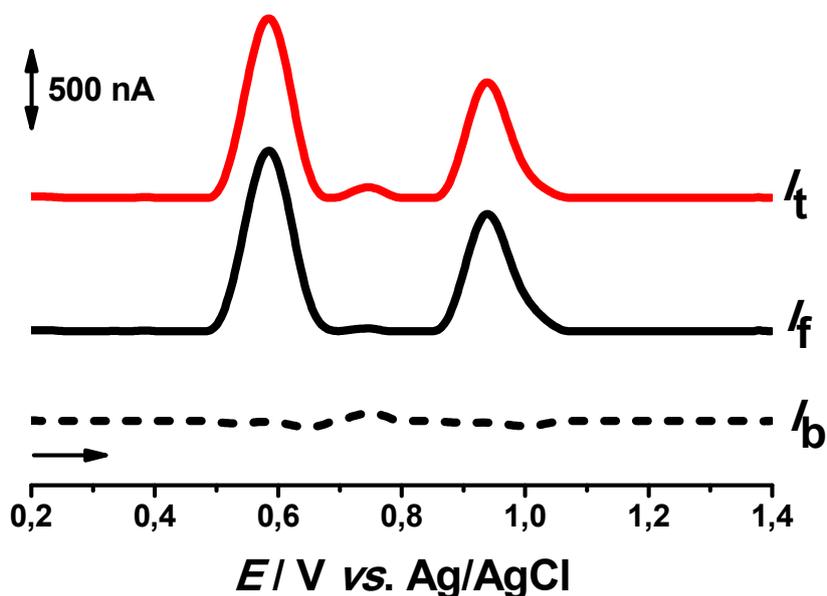


Figura 3.4. Voltamogramas de SW, com linha de base corrigida, para 50 μM de 13-*cis*-RA utilizando BDDE em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; amplitude de pulso 50 mV, $f = 13$ Hz, degrau de potencial $\Delta E_s = 2$ mV, $v_{\text{efetiva}} = 25$ mV s⁻¹. I_t – corrente total, I_f – corrente direta e I_b – corrente reversa.

3.2.4 Comportamento redox do *all-trans*-retinol e do ácido *all-trans*-retinóico

Com o intuito de esclarecer o comportamento de oxidação do 13-*cis*-RA, dois retinoides similares, *all-trans*-retinol (ATR) e ácido *all-trans*-retinóico (estereoisômero) (ATRA), foram investigados. Os voltamogramas de DP foram obtidos em 25 μM de ATR ou ATRA, utilizando BDDE ativado, em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, **Figura 3.5.**

Para o voltamograma de DP em 13-*cis*-RA, **Figura 3.5 (—)**, três picos de oxidação, em $E_{p1a} = +0,54$ V, $E_{p2a} = +0,72$ V e $E_{p3a} = +0,91$ V, foram observados. Para o voltamograma de DP em ATRA, **Figura 3.5 (—)**, três picos de oxidação também foram observados, estes por sua vez, com menores correntes de pico de oxidação e com

deslocamento para um potencial mais alto para o pico P1a, os quais podem ser explicados tendo em vista a orientação 3D, hidrofobia e as propriedades físico-químicas do ATRA.

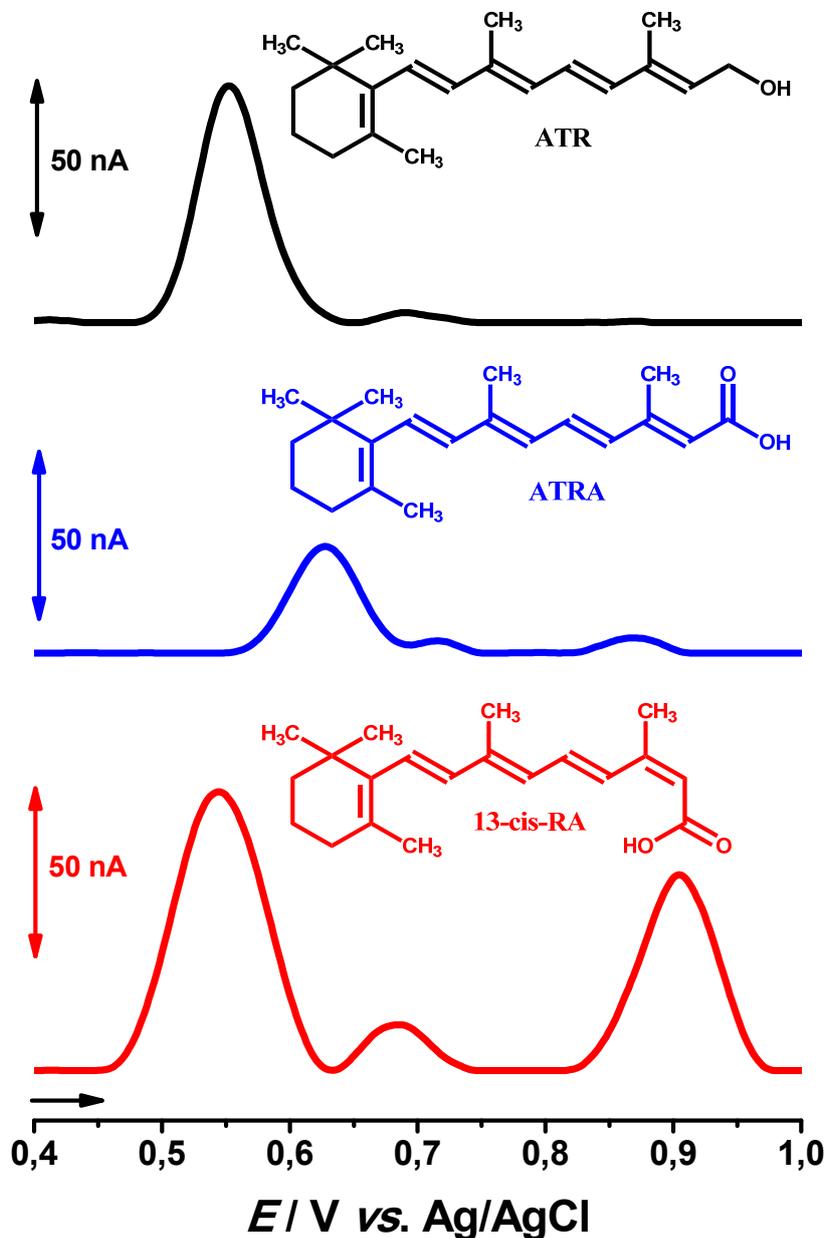


Figura 3.5. Voltamograma de DP, com a linha de base corrigida, para 25 μM : (—) 13-*cis*-RA, (—) ATRA e (—) ATR utilizando BDDE em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Diferentemente, para o voltamograma de DP em ATR, **Figura 3.5** (—), apenas dois picos anódicos, em $E_{p1a} = +0,55 \text{ V}$ e $E_{p2a} = +0,69 \text{ V}$, foram observados, os quais se mostraram similares aos dois primeiros picos de oxidação do 13-*cis*-RA.

3.2.5 Determinação Espectrofotométrica

Os retinoides possuem uma forte absorção na região do UV-Vis, devido às suas múltiplas ligações duplas conjugadas carbono-carbono. ATR, que tem cinco ligações duplas, possui absorção máxima em $\lambda_{\max} = 325$ nm, enquanto que o ATRA, que tem uma dupla ligação adicional (C=O do grupo carboxilo) em conjugação absorve em $\lambda_{\max} = 350$ nm, em álcool [30]. Do mesmo modo, espera-se que o 13-*cis*-RA, um isômero do ATRA, apresente uma forte banda de absorção próxima a $\lambda \sim 350$ nm.

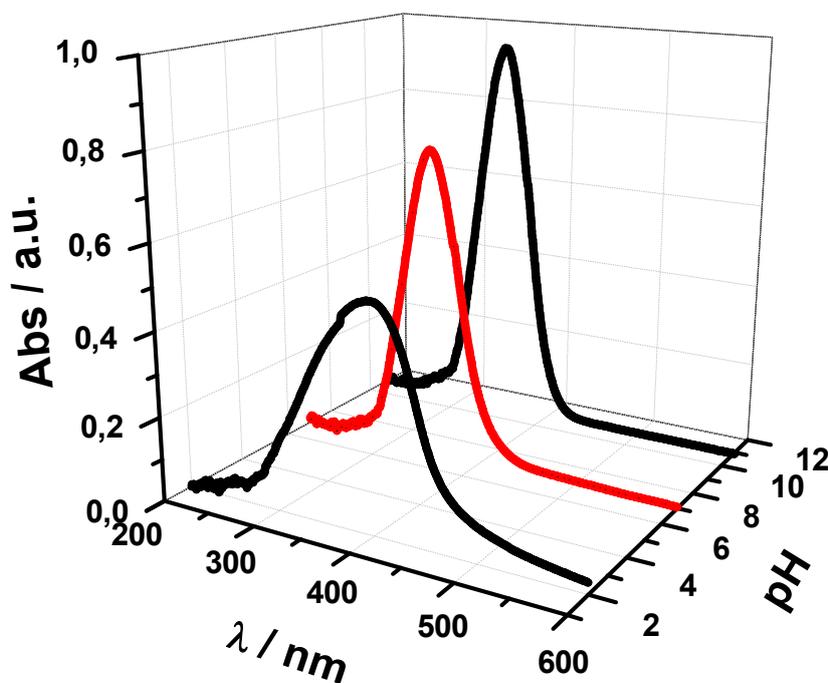


Figura 3.6. Espectros de absorção no UV-Vis para 30 μ M de 13-*cis*-RA vs. pH.

Os espectros de absorção para 30 μ M de 13-*cis*-RA foram obtidas no intervalo de 600 a 200 nm, para diferentes valores de pH dos eletrólitos inertes, **Figura 3.6**. Como esperado, todos os espectros de 13-*cis*-RA apresentaram apenas uma banda de absorção correspondente à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ referente às quatro ligações duplas carbono-carbono conjugadas. Um máximo de absorção $\lambda_{\max} = 399$ nm foi obtido em pH 2,0 e com o

aumento do pH para 7,0 e 11,0 uma alteração para $\lambda_{\max} = 345$ nm foi observado. Além disso, com o aumento do pH as absorvâncias também aumentaram: de 0,524 a.u. em pH 2,0, para 0,747 a.u. em pH 7,0 e 0,942 a.u. em pH 11,0.

3.2.6 *Curvas de Calibração*

A determinação eletroanalítica do 13-*cis*-RA deu-se utilizando BDDE limpo e ativado, no intervalo de concentração na solução entre 0,5 e 100,0 μM pela técnica de voltametria de DP medindo a corrente do pico P1a de oxidação do 13-*cis*-RA, **Figura 3.7 (A)**. Cada experiência foi realizada sempre utilizando uma superfície limpa e ativada do BDDE, um processo o qual propicia pequenas mudanças na área superficial do BDDE, que por sua vez causa pequenas variações nas correntes de pico, razão para as diferenças nos resultados obtidos.

De acordo com os dados obtidos por meio das três curvas de calibração, **Figura 3.7 (B)**, foi demonstrado pelo valor de $R^2 = 0,995$ um amplo intervalo linear, seguindo a equação abaixo, onde se obteve um limite de detecção (LOD) = 0,53 μM e um limite de quantificação (LOQ) = 1,77 μM . O desvio padrão relativo (R.S.D.) foi inferior a 7 nA, $I_{pa} \text{ (nA)} = 15,3 \text{ (nA } \mu\text{M}^{-1}) [13\text{-cis-RA}] \text{ (}\mu\text{M)} - 1,66 \text{ (nA)}$.

Os espectros de absorção para as adições de padrões do 13-*cis*-RA correspondendo às concentrações em solução entre 1,0 e 12,0 μM foram obtidos, **Figura 3.8 (A)**. A determinação espectrofotométrica por UV-Vis do 13-*cis*-RA resultou em um LOD = 0,38 μM e um LOQ = 1,25 μM . Os dados extraídos a partir das três curvas de calibração, **Figura 3.8 (B)**, demonstraram pelo valor de $R^2 = 0,999$, um mais amplo intervalo linear, de acordo com a equação abaixo. O desvio padrão relativo (R.S.D.) mostrou-se menor que 0,06 a.u., $\text{Abs (a.u.)} = 0,08 \text{ (a.u. } \mu\text{M}^{-1}) [13\text{-cis-RA}] \text{ (}\mu\text{M)} + 0,01 \text{ (a.u.)}$.

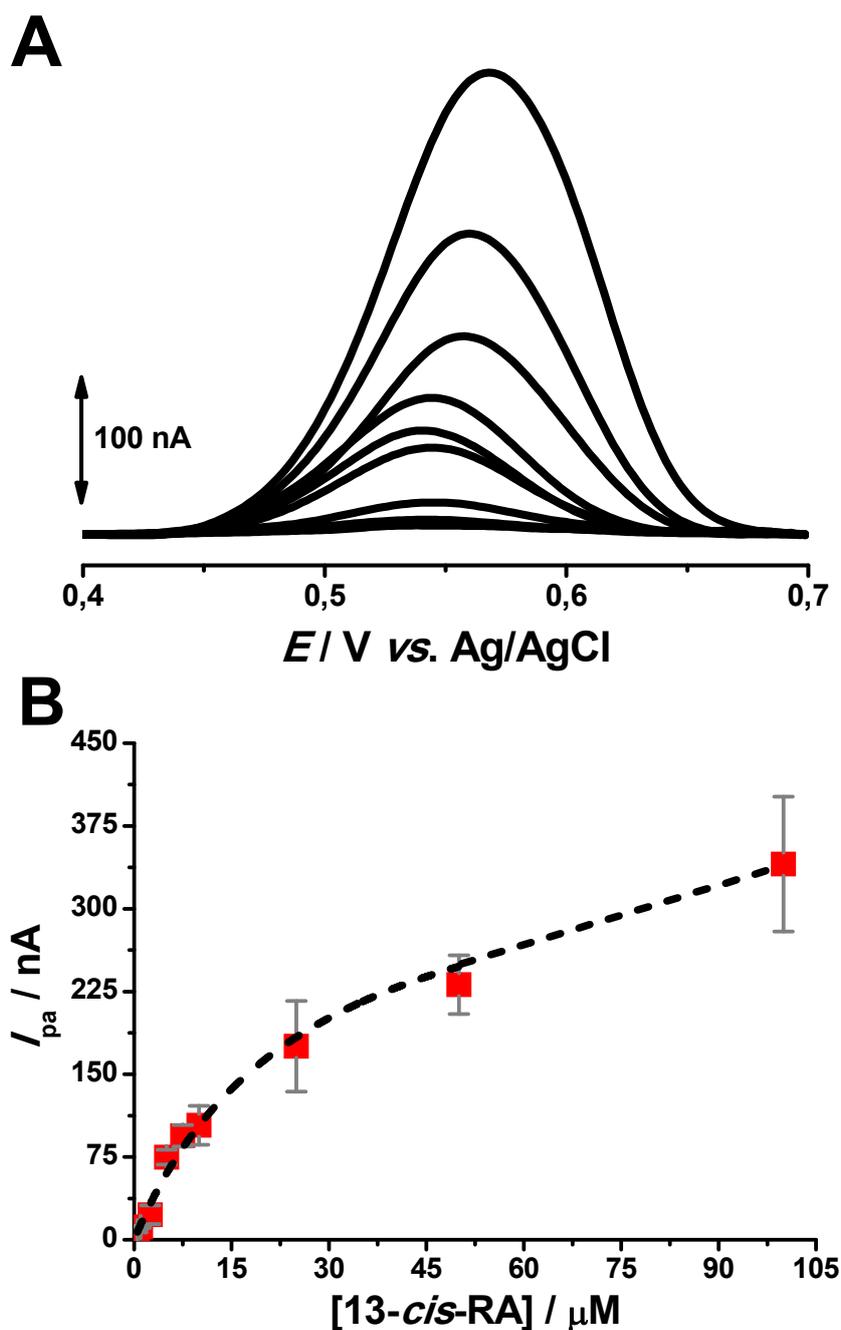


Figura 3.7. (A) Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, utilizando BDDE em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 para 0,5, 1,0, 2,5 5,0, 7,5, 10,0, 25,0, 50,0 e 100,0 μM do 13-*cis*-RA, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Curva de calibração.

O limite de detecção (LOD) de 13-*cis*-RA foi determinado a partir da equação de $\text{LOD} = 3 \times \text{SD} \times (\text{sensibilidade})^{-1}$, onde SD é o desvio padrão da corrente de pico, para o voltamograma de DP, ou absorção para espectrofotometria, e a sensibilidade é o declive da curva de calibração. O limite de quantificação (LOQ), a menor concentração que pode

ser quantificado com precisão e exatidão aceitáveis, é dado por $LOQ = 10 \times SD \times (\text{sensibilidade})^{-1}$.

Os resultados obtidos utilizando BDDE por DPV foram comparados com os resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Vis, e estão resumidos na **Tabela 3.1**.

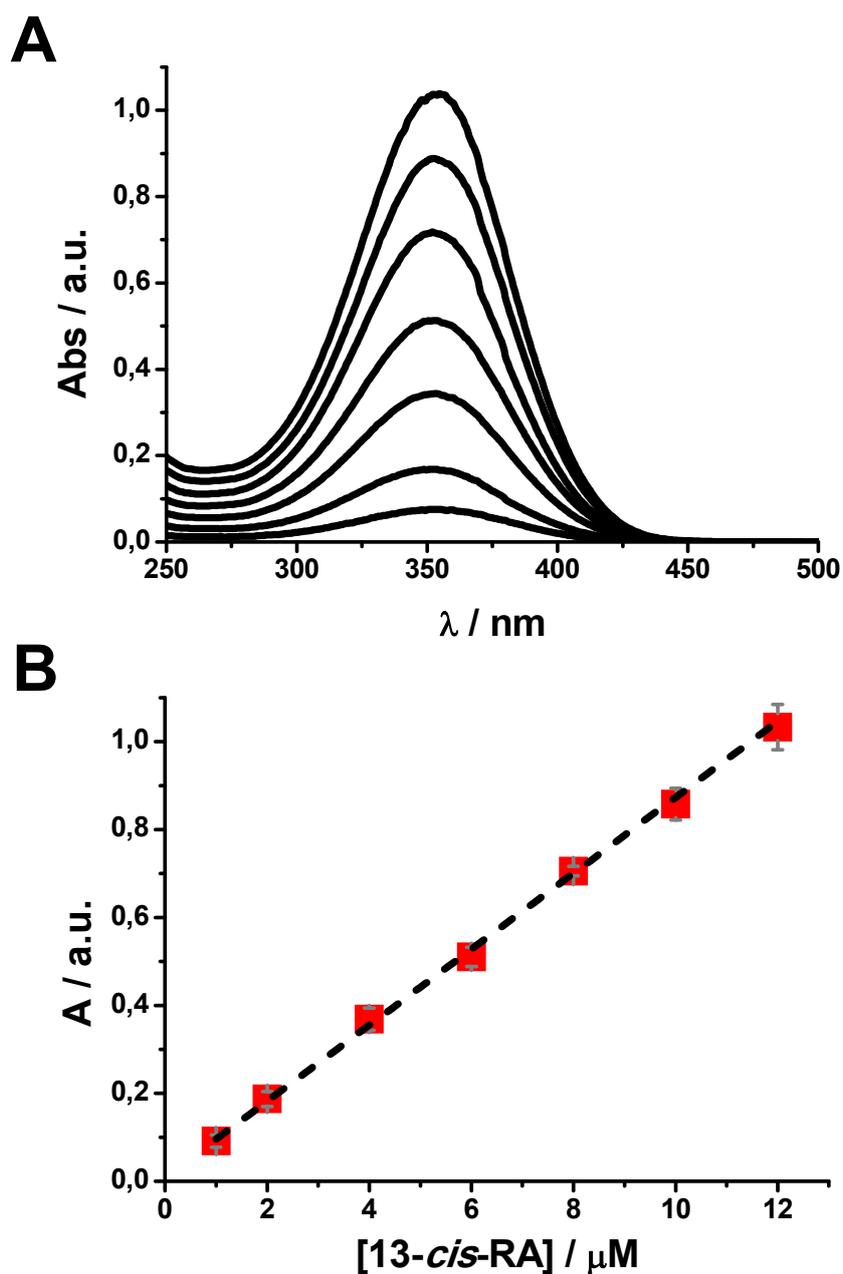


Figura 3.8. (A) Espectros de absorção no UV-Vis em metanol para 1,0, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0 e 12,0 μM de 13-*cis*-RA. (B) Curva de calibração.

Tabela 3.1. Parâmetros eletroquímicos e espectrofotométricos obtidos a partir das curvas de calibração do 13-*cis*-RA.

	Eletroquímica	UV-Vis
Intervalo linear	0,5–5,0 μM	1,0–12,0 μM
Sensibilidade	15,3 nA/ μM	0,08 a.u./ μM
Intercetação	-1,66 nA	0,01 a.u.
LOD	0,53 μM	0,38 μM
LOQ	1,77 μM	1,25 μM
SD	2,71 nA	0,01 a.u.
R²	0,995	0,999

3.2.7 *Determinação em Roacutan[®]*

Para a quantificação do 13-*cis*-RA em Roacutan[®], inicialmente foi utilizada a técnica eletroquímica. O padrão de calibração para 13-*cis*-RA resultou em um LOD = 0,53 μM e o procedimento utilizado para eletroanálise do 13-*cis*-RA em Roacutan[®], *Secção 2.6*, foi seguido.

A determinação eletroanalítica do 13-*cis*-RA nas formulações farmacêuticas de Roacutan[®] utilizando BDDE foi realizada pela técnica de voltametria de DP para as correntes do primeiro pico de oxidação, P1a, por meio do método de adição múltipla de padrões. Primeiramente, 2,0 μL da solução estoque de Roacutan[®] foram adicionados a 2,0 mL de eletrólito inerte, tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 e o voltamograma de DP foi registrado. Subsequentemente, adicionou-se 2,0, 4,0 e 6,0 μM da solução padrão do 13-*cis*-RA e as correntes do pico de oxidação P1a após cada adição de padrão do 13-*cis*-RA, foram medidas. Antes de cada experiência, o BDDE foi sempre limpo e pré-tratado catodicamente. A quantidade de $19,3 \pm 0,70$ mg de 13-*cis*-RA, nas cápsulas gelatinosas duras do medicamento Roacutan[®], foi encontrado. Este valor de 13-*cis*-RA foi muito próximo do obtido para UV-Vis, 19,6 mg.

3.3 Investigação da Interação 13-*cis*-RA-dsDNA

3.3.1 Comportamento voltamétrico do 13-*cis*-RA, dsDNA, poly[G] e poly[A] revisado

O comportamento eletroquímico do 13-*cis*-RA, dsDNA, poly[G] e poly[A] utilizando BDDE em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5 foi efetuado para controlo, **Figura 3.9**, com intuito de identificar os picos de oxidação ocorridos posteriormente à interação *in situ* de 13-*cis*-RA-dsDNA, 13-*cis*-RA-poly[G] e 13-*cis*-RA-poly[A].

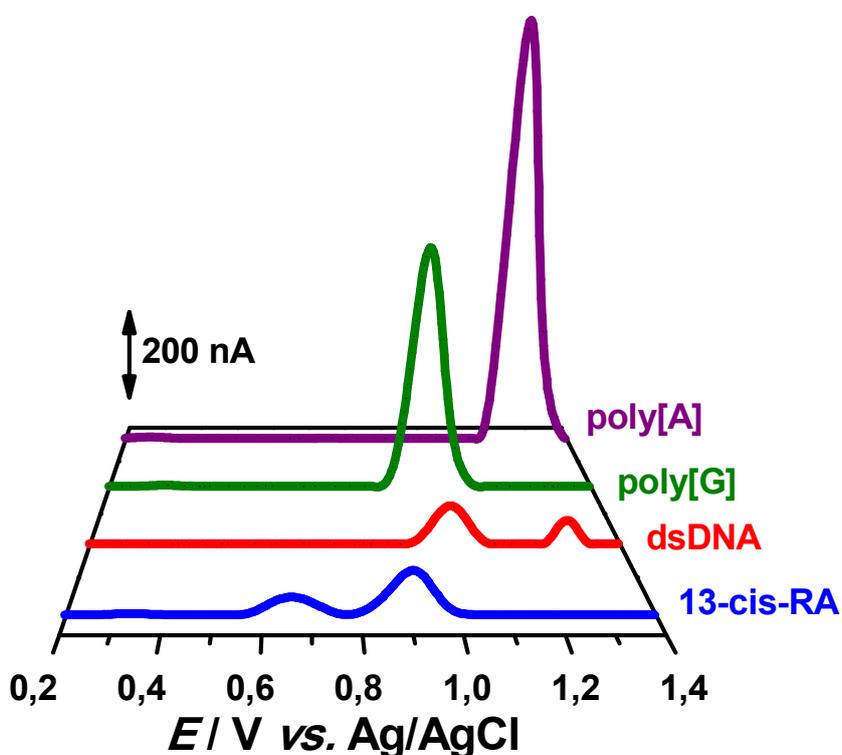


Figura 3.9. Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, utilizando BDDE, em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, para (—) 15 μM 13-*cis*-RA, (—) 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, (—) 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ poly[G] e (—) 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ poly[A], $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

O voltamograma de DP para 13-*cis*-RA controlo, **Figura 3.9** (—), apresentou dois picos, em $E_{p1a} = +0,66 \text{ V}$ e $E_{p2a} = +0,90 \text{ V}$, correspondente à oxidação do 13-*cis*-RA, por meio de um mecanismo consecutivo de duas etapas quando investigado em soluções com valores de pH inferiores 6,2 [194]. O mecanismo de oxidação do pico P1a envolve

a transferência de dois elétrons e um próton, enquanto o mecanismo de oxidação do pico de oxidação P2a envolve a transferência de um elétron. Sendo assim, a interação de um cátion radical instável de 13-*cis*-RA com o solvente ocorre com a perda de um próton e um novo radical, o qual foi submetido a uma segunda oxidação de um elétron, reage com o cátion radical instável formando dihidroxi- ou derivados epóxido como produtos finais de oxidação após sucessivas reações [194].

O voltamograma de DP para dsDNA controle mostrou dois picos de oxidação, **Figura 3.9 (—)**, correspondentes a oxidação dos resíduos de bases purinas na cadeia polinucleotídica: desoxiguanosina (dGuo), em $E_{pa} = +0,99$ V, e desoxiadenosina (dAdo), em $E_{pa} = +1,28$ V [54].

Os voltamogramas de DP para poly[G] e poly[A] controles apresentaram, como esperado, apenas um pico de oxidação cada. O polihomonucleotídeo poly[G] contém apenas resíduos de Gua e sua oxidação ocorre nos resíduos de dGuo, em $E_{pa} = +0,98$ V, **Figura 3.9 (—)**, enquanto o polihomonucleotídeo poly[A] contém apenas resíduos Ade e sua oxidação ocorre nos resíduos de dAdo [54], em $E_{pa} = +1,25$ V, **Figura 3.9 (—)**.

3.3.2 Interação 13-*cis*-RA-dsDNA em Soluções Incubadas

3.3.2.1 Eletroquímica

Para avaliar a possibilidade do 13-*cis*-RA em causar mudanças conformacionais na estrutura da dupla hélice do DNA, clivagem das ligações de hidrogênio e/ou dano oxidativo às bases do dsDNA, a interação 13-*cis*-RA-dsDNA foi investigada inicialmente em soluções incubadas por voltametria de DP utilizando BDDE.

Os efeitos da interação 13-*cis*-RA-dsDNA foram seguidos eletroquimicamente pela comparação das mudanças dos picos de oxidação do 13-*cis*-RA na ausência e na presença do DNA, as mudanças dos picos característicos de eletro-oxidação do dsDNA,

dGuo e dAdo, na ausência e presença do 13-*cis*-RA, pelo monitoramento da ocorrência dos picos de oxidação de Gua livre e Ade livres, e dos seus produtos de oxidação, 8-oxoGua e/ou 2,8-oxoAde.

A investigação eletroquímica da interação 13-*cis*-RA-dsDNA foi realizada em soluções incubadas contendo 15 μM 13-*cis*-RA e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, utilizando BDDE, após diferentes períodos de tempo de incubação, **Figura 3.10**. Após cada experiência, a superfície do BDDE foi submetida ao procedimento de pré-tratamento, como descrito na *Secção 2.3*, a fim de remover todos os produtos de oxidação adsorvidos na superfície do elétrodo e condicioná-la para a experiência subsequente.

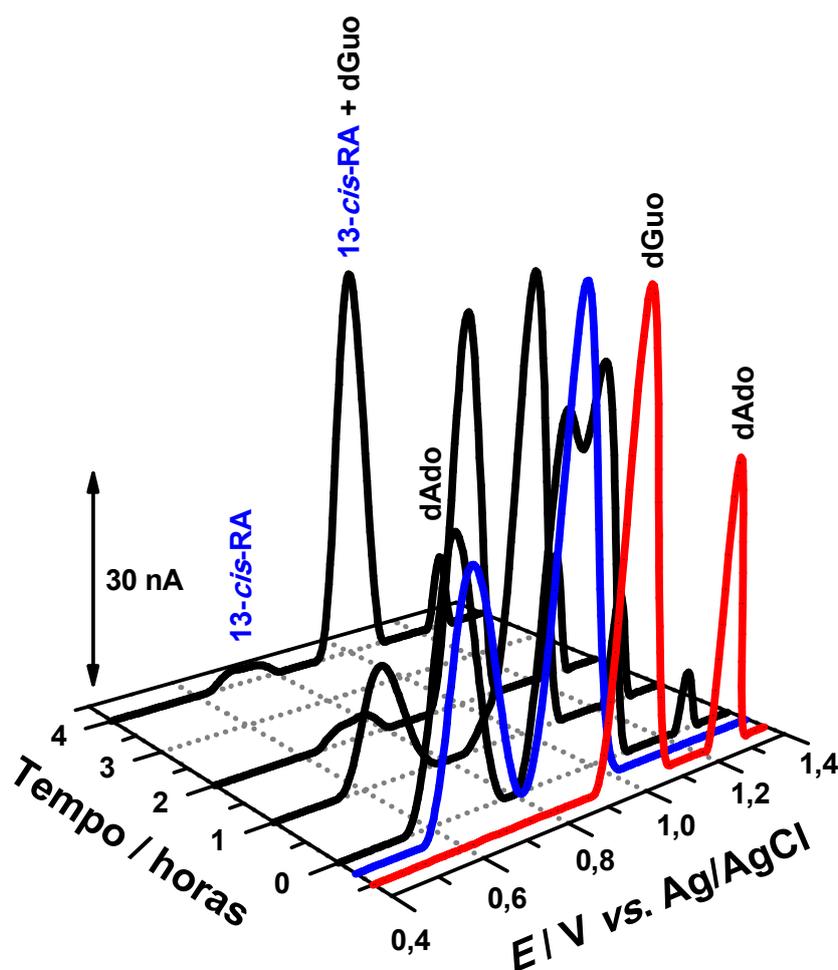


Figura 3.10. Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, para (—) 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA controlo, (—) 15 μM 13-*cis*-RA controlo e (—) após a incubação de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA com 15 μM 13-*cis*-RA durante diferentes períodos de tempo: 0, 1, 2 e 4 horas, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

O voltamograma de DP registado imediatamente após a adição de 15 μM 13-*cis*-RA à solução contendo 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA apresentou os dois picos de oxidação referentes ao 13-*cis*-RA, em $E_{p1a} = +0,65 \text{ V}$ e $E_{p2a} = +0,91 \text{ V}$, seguido pelos picos de oxidação da dGuo, $E_{pa} = +1,00 \text{ V}$, e dAdo, $E_{pa} = +1,27 \text{ V}$. Quando comparadas as intensidades das correntes de pico obtidas imediatamente após a adição de 13-*cis*-RA ao dsDNA com as da solução de dsDNA controlo, pôde-se observar um pequeno decréscimo para o pico de oxidação da dGuo e um grande decréscimo para o pico de oxidação da dAdo, o qual se deve a uma forte condensação e/ou agregação da dupla hélice de DNA provocada pela interação 13-*cis*-RA-dsDNA.

Após 1 hora de incubação foi observado um decréscimo para a corrente do pico de oxidação P1a do 13-*cis*-RA e praticamente o desaparecimento do pico de oxidação P2a. Para os picos de oxidação do dsDNA, a corrente da dGuo manteve-se sem modificações significativas enquanto um decréscimo para a corrente da dAdo foi observado. O suposto desaparecimento do pico de oxidação P2a do 13-*cis*-RA e a não alteração da corrente do pico de oxidação da dGuo de facto está relacionado com a sobreposição de ambos os picos no potencial de oxidação da dGuo, em $E_{pa} = +1,00 \text{ V}$.

Para maiores tempos de incubação, 2 e 4 horas, o pico de oxidação P1a do 13-*cis*-RA decresceu gradativamente e o pico de oxidação P2a desapareceu completamente. Conjuntamente, foi observado um pequeno e progressivo decréscimo para os picos de oxidação da dGuo e dAdo, sugerindo a condensação e/ou agregação do dsDNA provocada por uma forte interação entre o 13-*cis*-RA e os grupos fosfato do DNA carregados negativamente. Voltamogramas de DP para soluções incubadas por maiores tempos foram registados e nenhuma mudança significativa foi observada.

3.3.2.2 Espectrofotometria UV-Visível

Para determinar se o 13-*cis*-RA causa mudanças conformacionais na estrutura do dsDNA, espectros de absorção na região do UV-Vis para soluções incubadas contendo 15 μM 13-*cis*-RA e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA foram registados imediatamente após a adição de 13-*cis*-RA a solução de dsDNA e após 24 horas de incubação, **Figura 3.11**. Soluções controle de 13-*cis*-RA e dsDNA também foram preparadas e espectros de UV-Vis foram obtidos para os mesmos tempos de incubação.

A diferença nos espectros de absorção de dsDNA foi monitorizada na ausência e na presença de 13-*cis*-RA a fim de determinar a influência da interação do 13-*cis*-RA na conformação e morfologia do dsDNA.

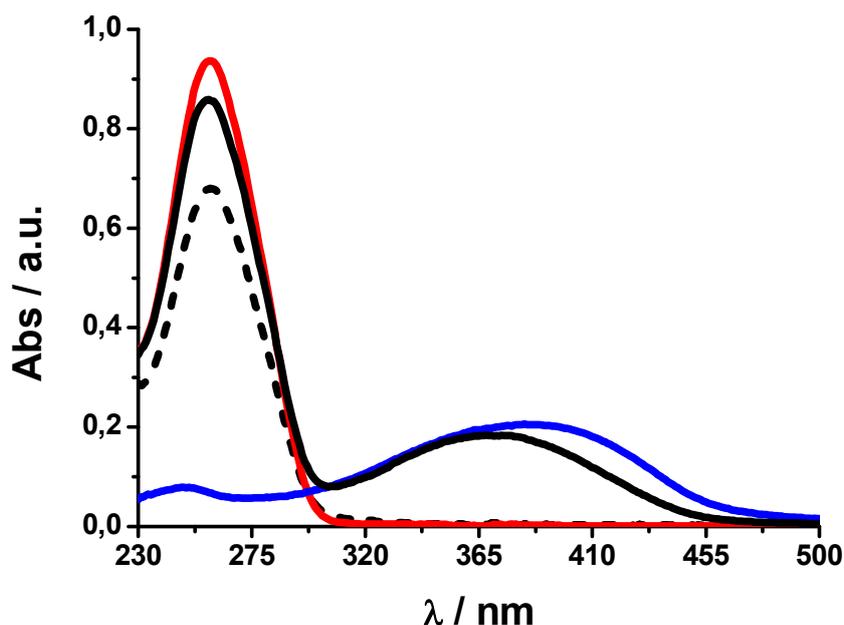


Figura 3.11. Espectros de absorção no UV-Vis, em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, para (—) 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA controle, (—) 15 μM 13-*cis*-RA controle e para soluções incubadas de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA com 15 μM 13-*cis*-RA, em diferentes períodos de tempo: (—) 0 h e (- - -) 24 h.

Os espectros de absorção foram obtidos no intervalo de 500 a 230 nm, **Figura 3.11**, no qual uma banda de absorção, $\lambda_{\text{max}} = 385$ nm, para o 13-*cis*-RA, esta correspondente à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ das ligações duplas carbono-carbono conjugadas, e

uma banda de absorção, $\lambda_{\max} = 260$ nm, para dsDNA, atribuída aos anéis heterocíclicos dos nucleotídeos, foram observadas.

O espectro de absorção no UV-Vis obtido imediatamente após a adição de 13-*cis*-RA à solução contendo dsDNA, **Figura 3.11 (—)**, apresentou duas bandas de absorção, em $\lambda_{\max} = 260$ nm referente ao dsDNA, com um pequeno decréscimo de intensidade de absorção, e em $\lambda_{\max} = 365$ nm referente ao 13-*cis*-RA, com deslocamento hipsocrómico. Após 24 horas de incubação, a solução contendo 15 μM 13-*cis*-RA e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA foi novamente analisada e apenas uma banda de absorção, referente ao dsDNA, em $\lambda_{\max} = 260$ nm, foi observada, **Figura 3.11 (- - -)**, esta com um significativo decréscimo na intensidade de absorção, o qual corrobora o facto de que o 13-*cis*-RA promove uma forte condensação/agregação do dsDNA.

3.3.3 Interação 13-cis-RA-dsDNA utilizando Biossensores Eletroquímicos de dsDNA

Durante a avaliação eletroquímica da interação 13-*cis*-RA-dsDNA em soluções incubadas, um filme de rede incompleto de moléculas livres co-adsorvidas de dsDNA e 13-*cis*-RA, e do complexo 13-*cis*-RA-dsDNA, pode ser formado sobre a superfície do BDDE. Sendo assim, a cobertura completa da superfície do eléctrodo é importante para evitar a adsorção indesejada destas moléculas e do complexo à superfície do eléctrodo.

Com a utilização do biossensor eletroquímico de dsDNA é possível observar as mudanças ocorridas no dsDNA imobilizado na superfície do eléctrodo durante a interação com 13-*cis*-RA, *in situ* e em tempo real.

Os biossensores eletroquímicos de dsDNA foram obtidos de acordo com os procedimentos apresentados na *Secção 2.5.1*. Este procedimento permite a adsorção de

uma camada fina e não regular de dsDNA na superfície do elétrodo, resultando em uma superfície modificada.

Após a incubação por um período de tempo em uma solução contendo $15 \mu\text{M}$ 13-*cis*-RA, o biossensor eletroquímico de dsDNA foi cuidadosamente lavado com água desionizada, para remover as moléculas de 13-*cis*-RA não ligadas, seco sob atmosfera de $\text{N}_2(\text{g})$ e transferido para uma célula eletroquímica contendo apenas solução tampão acetato $0,1 \text{ M}$ pH 4,5. As experiências foram repetidas sempre utilizando um novo biossensor eletroquímico de dsDNA para diferentes tempos de incubação, **Figura 3.12**.

O voltamograma de DP para o biossensor eletroquímico de dsDNA controle apresentou, como esperado, os picos de oxidação dGuo, em $E_{\text{pa}} = +0,98 \text{ V}$, e dAdo, em $E_{\text{pa}} = +1,24 \text{ V}$, **Figura 3.12** (—).

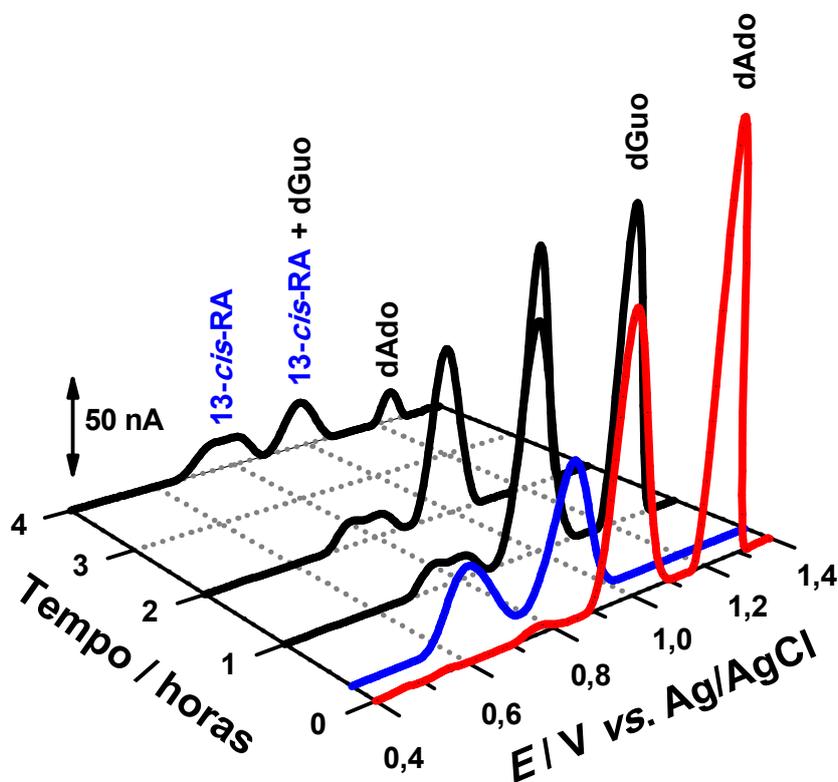


Figura 3.12. Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, em solução tampão acetato $0,1 \text{ M}$ pH 4,5, para (—) biossensor eletroquímico de dsDNA controle, (—) $15 \mu\text{M}$ 13-*cis*-RA controle e (—) após a incubação do biossensor eletroquímico de dsDNA em $15 \mu\text{M}$ 13-*cis*-RA durante diferentes períodos de tempo: 1, 2 e 4 horas, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Em uma nova experiência, o voltamograma de DP obtido para o biossensor eletroquímico de dsDNA incubado por 1 hora em uma solução contendo 15 μM 13-*cis*-RA foi registrado. Neste voltamograma, é possível observar um decréscimo para ambas as correntes dos picos de oxidação da dGuo e dAdo, e o surgimento de um pico de oxidação, em $E_{pa} = +0,73 \text{ V}$, correspondente a oxidação do 13-*cis*-RA.

Com novos biossensores de dsDNA o procedimento acima foi repetido para maiores tempos de incubação, 2 e 4 horas. Para todos os voltamogramas de DP obtidos, um decréscimo progressivo das correntes dos picos de oxidação da dGuo e dAdo, foi observado. Ademais, o pico correspondente a oxidação do 13-*cis*-RA, em $E_{pa} = +0,73 \text{ V}$, foi observado sem mudanças significativas.

Os resultados obtidos para a interação 13-*cis*-RA-dsDNA utilizando os biossensores eletroquímicos de dsDNA foram semelhantes aos obtidos em soluções incubadas, corroborando com a ocorrência de uma forte condensação e/ou agregação do dsDNA provocada pela interação entre o 13-*cis*-RA e os grupos fosfato do DNA carregados negativamente.

3.3.4 Interação 13-cis-RA-dsDNA utilizando Biossensores Eletroquímicos de Poly[G] e Poly[A]

A fim de obter informações sobre a interação preferencial do 13-*cis*-RA com dsDNA, experiências utilizando biossensores eletroquímicos de polihomonucleotídeos sequencialmente conhecidos, nomeadamente poly[G] e poly[A], foram realizadas.

Os biossensores eletroquímicos de poly[G] e poly[A] foram preparados de forma semelhante aos biossensores de dsDNA, *Secção 2.5.1*, incubados em soluções contendo 15 μM 13-*cis*-RA por diferentes períodos de tempo e analisados por voltametria de DP

em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, **Figura 3.13** e **Figura 3.14**. Similarmente a interação 13-*cis*-RA-dsDNA utilizando os biossensores eletroquímicos com dsDNA, cada experiência foi realizada utilizando um novo biossensor eletroquímico de poly[G] e poly[A], com a superfície do BDDE previamente submetida ao procedimento de pré-tratamento, de acordo com a *Secção 2.3*.

O voltamograma de DP registado para o biossensor eletroquímico de poly[G] controlo apresentou apenas um pico de oxidação, em $E_{pa} = +0,98$ V, referente à oxidação das moléculas de dGuo, da unidade monomérica do poly[G], **Figura 3.13** (—).

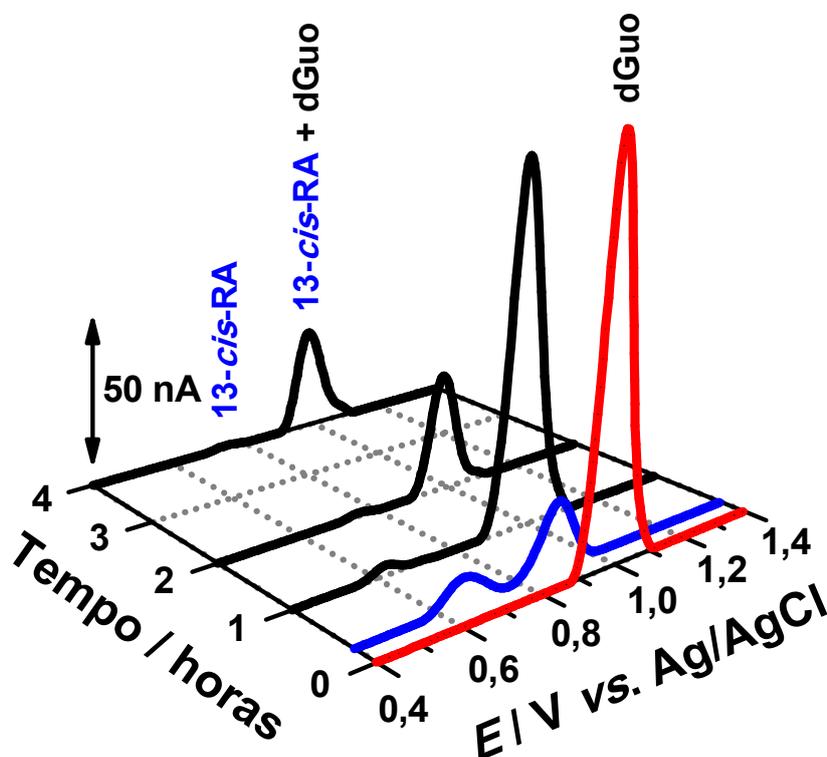


Figura 3.13. Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, para (—) biossensor eletroquímico de poly[G] controlo, (—) 15 μM 13-*cis*-RA controlo e (—) após a incubação do biossensor eletroquímico de poly[G] em 15 μM 13-*cis*-RA durante diferentes períodos de tempo: 1, 2 e 4 horas, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Após a incubação de um novo biossensor eletroquímico de poly[G] em 15 μM 13-*cis*-RA por 1 hora, **Figura 3.13** (—), o voltamograma de DP mostrou um

pequeno decréscimo da corrente do pico, no mesmo potencial que o controlo, em $E_{pa} = +0,98$ V, e o aparecimento do pico de oxidação, em $E_{pa} = +0,63$ V, referente a oxidação do 13-*cis*-RA, também com um decréscimo na intensidade da corrente. O pequeno decréscimo na intensidade de corrente do pico de oxidação da dGuo, em $E_{pa} = +0,98$ V, pode ser explicado pela sobreposição do pico de oxidação P2a do 13-*cis*-RA, com um pequeno decréscimo da corrente, quando comparado ao biossensor eletroquímico de poly[G] controlo. Voltamogramas de DP, para maiores tempos de incubação, 2 e 4 horas, apresentaram um decréscimo progressivo para ambos os picos de oxidação da dGuo e do 13-*cis*-RA.

Os resultados obtidos com os biossensores eletroquímicos de poly[G] confirmam aqueles obtidos em soluções incubadas e utilizando biossensores eletroquímicos de dsDNA, corroborando com o facto de que uma condensação e/ou agregação da estrutura da cadeia polinucleotídica de poly[G] ocorreu devido a interação com 13-*cis*-RA.

O voltamograma de DP obtido para o biossensor eletroquímico de poly[A] controlo apresentou apenas um pico de oxidação, em $E_{pa} = +1,25$ V, correspondente a oxidação das moléculas de dAdo, da unidade monomérica do poly[A], **Figura 3.14 (—)**.

O voltamograma de DP obtido para o biossensor eletroquímico de poly[A] após a incubação por 1 hora em 15 μ M 13-*cis*-RA, **Figura 3.14 (—)**, apresentou o pico de oxidação da dAdo, em $E_{pa} = +1,25$ V, com um grande decréscimo da intensidade de corrente, quando comparado com o biossensor eletroquímico de poly[A] controlo.

Novos biossensores eletroquímicos de poly[A] foram preparados, incubados em diferentes períodos de tempos em 13-*cis*-RA e avaliados, os quais apresentaram um decréscimo nas correntes de pico dependentes do aumento do tempo de incubação,

sugerindo a condensação e/ou agregação da estrutura da cadeia polinucleotídica de poly[A] devido a interação com 13-*cis*-RA.

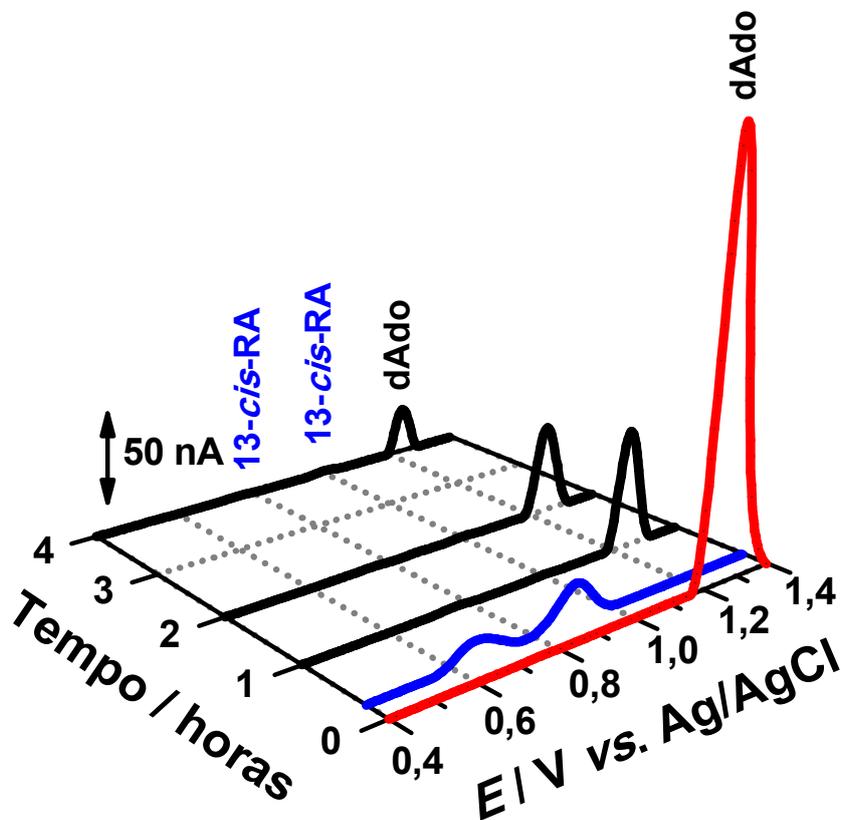


Figura 3.14. Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, para (—) biossensor eletroquímico de poly[A] controle, (—) 15 μM 13-*cis*-RA controle e (—) após a incubação do biossensor eletroquímico de poly[A] em 15 μM 13-*cis*-RA durante diferentes períodos de tempo: 1, 2 e 4 horas, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Os voltamogramas obtidos para os biossensores eletroquímicos de poly[G] e poly[A] mostraram uma diminuição significativa da intensidade de corrente para ambos os picos de oxidação da dGuo e da dAdo quando comparados com os biossensores eletroquímicos de poly[G] e poly[A] controle, o que sugere uma afinidade do 13-*cis*-RA semelhante para ambas as bases purínicas, Gua e Ade, e nenhum pico referente a liberação de Gua e/ou Ade, bem como dos biomarcadores do dano oxidativo basal do DNA, 8-oxoGua e 2,8-oxoAde, em $E_{\text{pa}} = +0,45 \text{ V}$, foi observado.

O aparecimento dos picos de oxidação do 13-*cis*-RA, em $E_{pa1} = +0,65$ V e $E_{pa2} = +0,89$ V, nas experiências utilizando biossensores eletroquímicos pode ser explicado tendo em consideração que os biossensores de camada fina proporcionam a presença de grandes poros no filme e assim permitem a adsorção não específica do analito sobre a superfície dos elétrodos e não apenas no filme [195].

Estudos anteriores [196] reportaram níveis elevados de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG) em pacientes em tratamento com isotretinoína (13-*cis*-RA), devido a um efeito direto do 13-*cis*-RA nas células hepáticas, musculares e epidérmicas da pele. A 8-OHdG é formada pelo ataque de radicais $\bullet\text{OH}$ às bases guanina na estrutura da dupla hélice do DNA [197, 198], **Figura 3.15**, e tipicamente excretada na urina sem modificações; seu nível de excreção é geralmente relacionado com o dano oxidativo total do DNA corporal [199, 200].

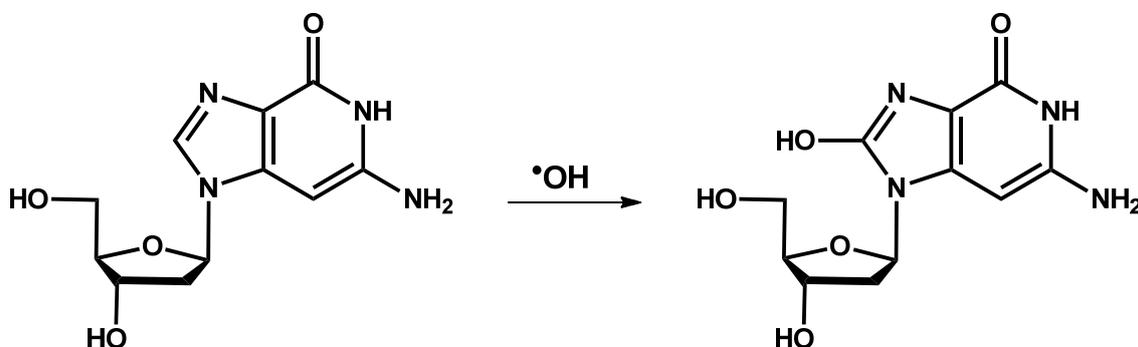


Figura 3.15. Mecanismo de oxidação da 2-desoxiguanosina pelo radical $\bullet\text{OH}$ e formação da 8-hidroxi-2-desoxiguanosina.

Sendo assim, a 8-OHdG é comumente aceite como um biomarcador do dano oxidativo do DNA e seu pico de oxidação ocorre em um potencial semelhante à oxidação da 8-oxoGua e 2,8-oxoAde, em $E_{pa} = +0,45$ V [201].

3.4 Considerações Finais

O 13-*cis*-RA é um importante fármaco que revolucionou o tratamento da acne severa e na prevenção de determinados cânceros de pele, no entanto, os seus efeitos adversos, tais como teratogenicidade, pseudotumores e transtornos psiquiátricos, torna importante o desenvolvimento de métodos analíticos para sua deteção e quantificação, bem como a investigação da interação 13-*cis*-RA-dsDNA, seja para predizer o mecanismo de ação como fármaco genotóxico ou para compreender sua atividade biológica e tóxica *in vivo*.

O comportamento eletroquímico do 13-*cis*-RA utilizando BBDE em um amplo intervalo de pH foi investigado por voltametria cíclica, de DP e SW. De acordo com os resultados obtidos, a oxidação do 13-*cis*-RA ocorre por meio de um mecanismo consecutivo de três etapas: em meio ácido a primeira etapa de oxidação P1a do 13-*cis*-RA envolveu a transferência de prótons, ao passo que a segunda P2a e terceira P3a reações de oxidação foram independentes do pH. Para $\text{pH} > 5$, que corresponde ao pKa de 13-*cis*-RA ($\text{pKa} = 5$), todas as etapas de oxidação mostraram-se independentes do pH.

Dois retinoides similares, ATR e o estereoisómero do 13-*cis*-RA, o ATRA, também foram investigados e os resultados comparados com a oxidação do 13-*cis*-RA. A oxidação do estereoisómero ATRA ocorreu em três passos de oxidação, enquanto a oxidação do ATR ocorreu em dois passos. Estes resultados estão de acordo com os mecanismos de oxidação de outros compostos similares [202].

O 13-*cis*-RA e ATR são pentaenos conjugados e suas oxidações ocorrem com um mecanismo similar de outros dienos e trienos. O produto da primeira oxidação de um eletrão do 13-*cis*-RA, na ligação dupla conjugada, é um catião radical instável, que reage com o solvente ou com uma molécula de 13-*cis*-RA formando um dímero.

A interação do catião radical instável com o solvente ocorre com a perda de um próton e um novo radical, o qual foi submetido a uma segunda oxidação de um elétron, reage com o catião radical instável formando dihidroxi ou derivados epóxido como produtos finais de oxidação após sucessivas reações.

A interação do catião radical instável com uma molécula do 13-*cis*-RA, através do ataque de uma ligação dupla, ocorre produzindo um catião dímero. A reação do catião dímero e do solvente, com a perda de um próton, resulta num novo dímero radical que pode sofrer a oxidação adicional de um elétron na superfície do eléctrodo e posterior reação com o solvente.

Todos os espectros de absorção para 13-*cis*-RA registados em diferentes pHs apresentaram uma banda de absorção correspondente à transição $\pi \rightarrow \pi^*$, no entanto, uma mudança de λ_{\max} nos espectros de pHs 2,0, 7,0 e 11,0 foi observada. Estes resultados foram consistentes com o fato de que para valores de pH > 5,0 (pKa) a molécula está na sua forma ionizada, por conseguinte, é afetada pelo oxigênio do carbonilo que está conjugado com o sistema polieno. Tal efeito está normalmente associado com o aumento do coeficiente de extinção molar. A transferência de carga resultante do estado excitado permitiu que ocorresse a transição $\pi \rightarrow \pi^*$ na forma ionizada do 13-*cis*-RA com maior frequência, necessitando de menos energia.

A determinação eletroanalítica em padrões do 13-*cis*-RA realizada por voltametria de DP (medindo a corrente do primeiro pico de oxidação P1a) resultou em um LOD = 0,53 μM e por espectrofotometria de UV-Vis (medindo a absorbância a $\lambda_{\max} = 345 \text{ nm}$) em um LOD = 0,38 μM .

A quantificação eletroanalítica do 13-*cis*-RA no medicamento Roacutan[®] foi realizada. A quantidade final obtida de $19,3 \pm 0,70 \text{ mg}$ de 13-*cis*-RA por voltametria de DP usando o método de adição múltipla de padrões foi encontrada na formulação

farmacêutica Roacutan[®], estando de acordo com o conteúdo de 13-*cis*-RA nas cápsulas gelatinosas duras de Roacutan[®] comercializadas pela Roche.

Considerando a toxicidade e as reações adversas da família dos retinoides, em especial a isotretinoína, os resultados apresentados neste estudo são úteis não apenas para o propósito de determinação analítica, mas também representam uma fundamentação para a investigação da interação entre os retinoides e moléculas biológicas, como o DNA e as proteínas.

Inicialmente, a interação 13-*cis*-RA-dsDNA foi investigada em soluções incubadas utilizando voltametria de DP e espectrofotometria UV-Vis. Os resultados obtidos foram corroborados utilizando biossensores eletroquímicos de dsDNA, poly[G] e poly[A] de camada fina por voltametria de DP.

De acordo com os estudos, o 13-*cis*-RA demonstrou ter afinidade com ambas as bases purínicas e que a interação entre 13-*cis*-RA e dsDNA pode provocar alterações nos picos de oxidação da dGuo e dAdo, dependendo diretamente do tempo de incubação das amostras. O dano oxidativo basal ao DNA causado pelo 13-*cis*-RA não foi detetado eletroquimicamente, em $E_{pa} = 0,45$ V, seja pela formação dos produtos de oxidação das bases purínicas do DNA, 8-oxoGua e/ou 2,8-oxoAde, ou pela formação de 8-OHdG, proveniente da geração de radicais oxigênio. Por fim, os dados apresentados indicam que a interação 13-*cis*-RA-dsDNA pode induzir a condensação da estrutura da dupla hélice do DNA, seguido por voltametria de impulso diferencial pelo decréscimo significativo das correntes de pico de oxidação da dGuo e dAdo.

CAPÍTULO 4

Antibiótico Daptomicina

Antibióticos são medicamentos usados para prevenir e tratar infecções bacterianas. Em Portugal, o consumo de antibióticos manteve-se durante muito tempo acima do registado na Europa, chegando a ser o nono, entre 30 países europeus, com maior consumo. Nos últimos anos uma ligeira tendência crescente no consumo ambulatorio a nível europeu foi verificada, a qual foi divergente da redução observada em Portugal, que em 2014 já se posicionava abaixo da média europeia no que respeita a consumo de antibióticos na comunidade [203].

Neste capítulo é apresentado inicialmente o estudo eletroquímico e o mecanismo de transferência de eletrões do antibiótico daptomicina (DPT) por meio das técnicas de voltametria cíclica, de DP e de SW, utilizando um eléctrodo de carbono vítreo, e sua determinação eletroanalítica em fluído biológico. Seguidamente, o mecanismo de interação DPT-dsDNA foi investigado *in situ* em soluções incubadas por voltametria de DP e espectrofotometria UV-Vis, e com biossensores eletroquímicos de dsDNA, poly[G] e poly[A] por voltametria de DP.

4.1 Introdução

A resistência antimicrobiana (AMR) pode ser caracterizada pela habilidade de um micro-organismo (como bactérias, fungos, vírus e alguns parasitas) em mudar quando é exposto ou parar a atividade antimicrobiana de um fármaco (como por exemplo, antibióticos, antifúngicos, antivirais, antimaláricos e anti-helmínticos) contra ele. Como resultado, tratamentos padrões tornam-se ineficientes, infecções podem persistir no corpo e ainda aumentar o risco de espalhamento de outras infecções [204].

Os novos mecanismos de resistência destes micro-organismos vêm emergindo e espalhando-se globalmente, o que ameaça a capacidade de tratar doenças infecciosas comuns, resultando em doenças prolongadas, incapacidades e até mesmo morte. Neste contexto, o desenvolvimento de novos fármacos com a capacidade de contornar estes mecanismos de resistência representa um avanço importante na prática clínica.

Entre estes novos fármacos antimicrobianos, mais intimamente relacionados com o grupo de candidatos a antibióticos, os lipopeptídeos cíclicos (CLPs) são uma classe promissora de produtos naturais com potente atividade antibacteriana. Os CLPs são compostos por uma cauda lipídica ligada a um oligopeptídeo curto, o qual é cíclico de forma a gerar uma lactona ou lactama, quer entre dois aminoácidos na cadeia peptídica ou entre um aminoácido e um grupo amino ou hidroxilo contendo uma porção de ácido graxo [205].

A daptomicina (DPT) (N-decanoil-L-triptofil-L-asparaginil-L-aspartil-L-treonilglicil-L-ornitil-L-aspartil-D-alanil-L-aspartilglicil-D-seril-treo-3-metil-L-glutamil-3-antraniloil-L-alanina- ϵ 1-lactona) foi o primeiro antibiótico lipopeptídeo macrocíclico a ser aprovado, após intensivos ensaios clínicos pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América em 2003, e está provavelmente entre os mais importantes antibióticos desenvolvidos nos últimos 50 anos [206-208].

Este medicamento por sua vez é especificamente indicado para o tratamento de infecções complicadas de pele e de tecidos localizados abaixo da pele, endocardite infecciosa e bacteriana causada por micro-organismos Gram-positivos [209], tais como *Staphylococcus aureus* (incluindo estirpes resistentes a meticilina), *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae subspecies equisimilis* e *Enterococcus faecalis* (apenas estirpes suscetíveis à vancomicina) [210-212].

A estrutura da DPT, **Figura 4.1**, é composta de uma porção peptídica contendo 13 D- e L-aminoácidos, sendo apenas três destes com estereoquímica D. O núcleo do peptídeo cíclico é composto por um conjunto de 10 aminoácidos não-proteinogênicos, os quais incluem três D-aminoácidos (D-asparagina, D-alanina e D-serina), três aminoácidos menos comuns (ornitina, (2S,3R)-ácido-3-metilglutâmico e quinurenina), que formam uma ligação éster com treonina e constroem uma macrolactona, e uma cadeia de ácido graxo n-decanoil ligada ao N-terminal do triptofano, o único resíduo de aminoácido eletroativo [207, 213]. Ademais, há quatro resíduos ácidos (três resíduos de ácido aspártico e um resíduo de ácido-3-metilglutâmico) e um resíduo básico (ornitina) [214].

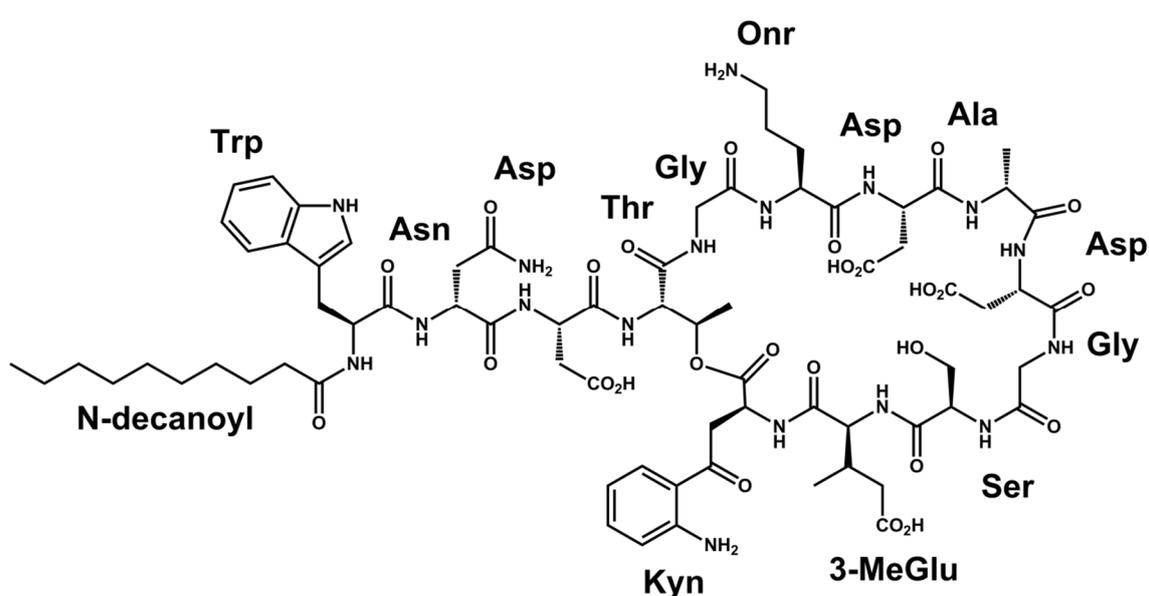


Figura 4.1. Estrutura química da daptomicina.

Embora a DPT tenha sido aprovada em mais de 40 países ao redor do mundo, poucos estudos relatam o desenvolvimento de seus métodos analíticos. A maior parte dos estudos de quantificação e detecção da DPT está diretamente relacionada à análise de fluidos biológicos, utilizando principalmente métodos cromatográficos com diferentes detetores, tais como cromatografia líquida de alta eficiência com ultravioleta [215-219], espectrometria de massa [218, 220] e massa em tandem [221], cromatografia líquida com ultravioleta [222], espectrometria de massa [223] e massa em tandem [224, 225], cromatografia líquida de ultra eficiência com ultravioleta [226-228], espectrometria de massa em tandem [229] e arranjo de fotodíodos [230]. Algumas outras técnicas também têm sido investigadas [231, 232].

Estes métodos analíticos empregam principalmente técnicas que requerem solventes tóxicos ou grandes volumes de solventes para a quantificação dos fármacos, os quais são caros e prejudiciais para aqueles que os manipulam, para a comunidade e o meio ambiente. A fim de minimizar estes problemas e alcançar boa sensibilidade e seletividade, a utilização de técnicas eletroquímicas torna-se atrativa. Além da quantificação e detecção, a investigação do mecanismo de oxidação da DPT utilizando técnicas eletroquímicas é importante uma vez que resultará em uma melhor compreensão e aumento do conhecimento acerca do mecanismo de ação fisiológico da DPT.

O objetivo deste trabalho foi investigar o comportamento eletroquímico e o mecanismo de transferência de elétrons da DPT, utilizando voltametria cíclica, de DP e de SW, em um eletrodo de carbono vítreo (GCE), e determinar a DPT, pela primeira vez, em fluido biológico fetal bovino.

A investigação eletroquímica *in situ* da interação de DPT-dsDNA foi realizada em soluções incubadas, por voltametria de DP e espectrofotometria UV-Vis, e utilizando biossensores eletroquímicos de dsDNA, poly[G] e poly[A], por voltametria de DP.

4.2 Estudo Eletroquímico e Eletroanalítico

4.2.1 Voltametria Cíclica

O comportamento eletroquímico da DPT, em GCE, foi inicialmente estudado utilizando voltametria cíclica, em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,0 e solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 a uma velocidade de varrimento $\nu = 25 \text{ mV s}^{-1}$. Os voltamogramas cíclicos apresentaram dois picos de oxidação, o primeiro, pico de oxidação P1a bem definido, em $E_{p1a} = +0,85 \text{ V}$ para pH 4,0, **Figura 4.2**, e em $E_{p1a} = +0,74 \text{ V}$ para pH 7,0, e o segundo pico de oxidação P2a menor, em $E_{p2a} = +1,05 \text{ V}$ para pH 4,0, e em $E_{p2a} = +1,05 \text{ V}$ para pH 7,0.

No sentido voltamétrico inverso, picos de redução não foram observados para ambos os pH investigados, o que indica que o processo de oxidação é irreversível [193]. Ao registrar sucessivos varrimentos na mesma solução, sem a limpeza da superfície do eletrodo, foi observado um decréscimo das correntes para ambos os picos, devido à adsorção de DPT e/ou oxidação de seus produtos na superfície do GCE.

O efeito da velocidade de varrimento no processo de oxidação do pico de oxidação P1a da DPT foi investigado ao registrar voltamogramas cíclicos em 25 μM de DPT em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, com velocidades de varrimento de 5-50 mVs^{-1} , utilizando sempre um GCE limpo.

As correntes do pico de oxidação P1a, $I_{p1a} \text{ (A)} = 2,69 \times 10^5 n (\alpha_c n')^{1/2} A [R]_{\infty} D_O^{1/2} \nu^{1/2}$, aumentaram linearmente com $\nu^{1/2}$, indicando que o processo de oxidação foi limitado pela difusão [193] e o coeficiente de difusão para DPT em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 equivalente a $D_{DPT} = 2,32 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ foi calculado. A área eletroativa do GCE, $A = 4,17 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$, foi determinada utilizando hexacianoferrato de potássio(II) 1,0 mM em solução tampão fosfato ($D_O = 7,35 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$).

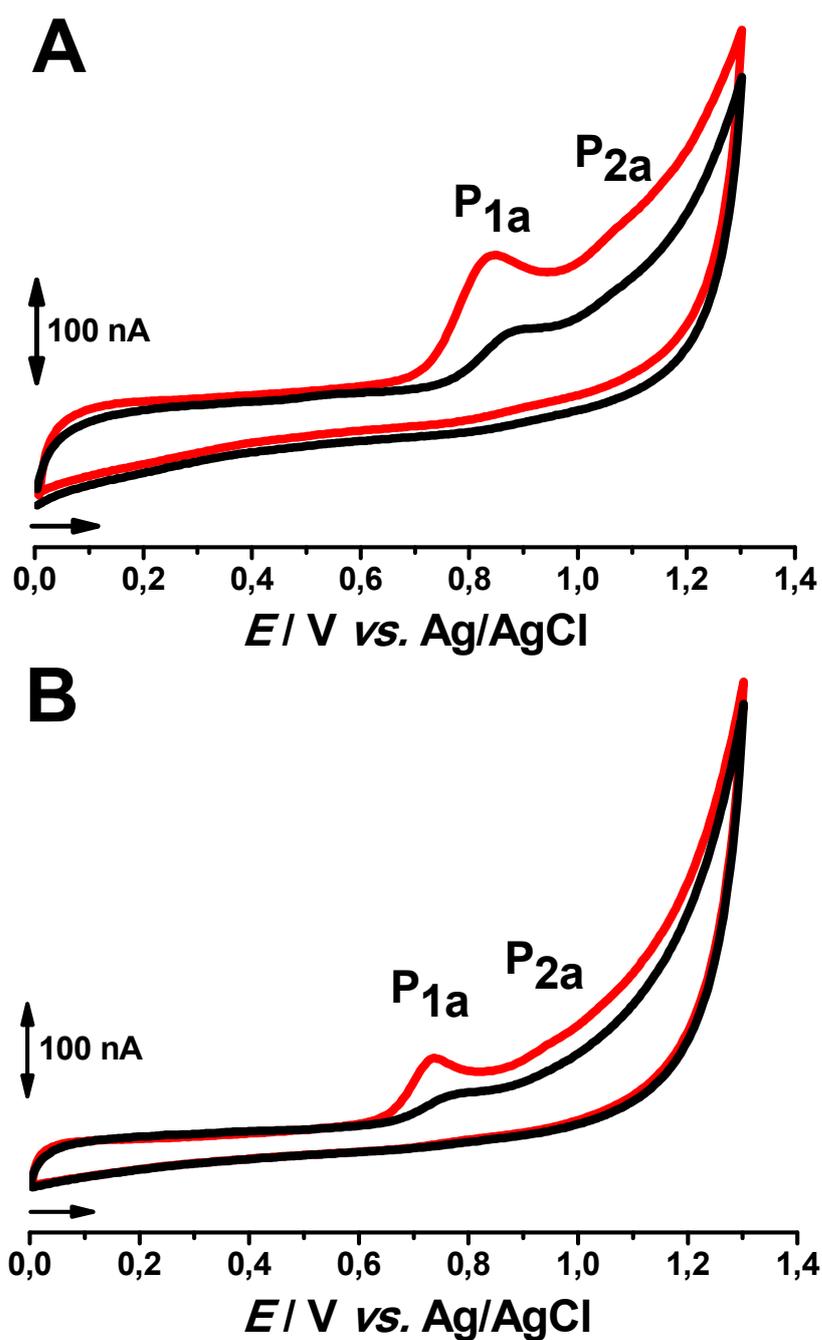


Figura 4.2. Voltamogramas cíclicos obtidos em 25 μM de DPT utilizando GCE em (A) solução tampão acetato 0,1 M pH 4,0 e (B) solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, (—) primeiro e (—) segundo varrimento, $\nu = 25 \text{ mV s}^{-1}$.

4.2.2 Voltametria de Impulso Diferencial

O efeito do pH na oxidação eletroquímica da DPT em GCE foi investigado em um amplo intervalo de pH. Os voltamogramas de DP foram registrados em soluções contendo 25 μM de DPT, utilizando sempre um GCE limpo.

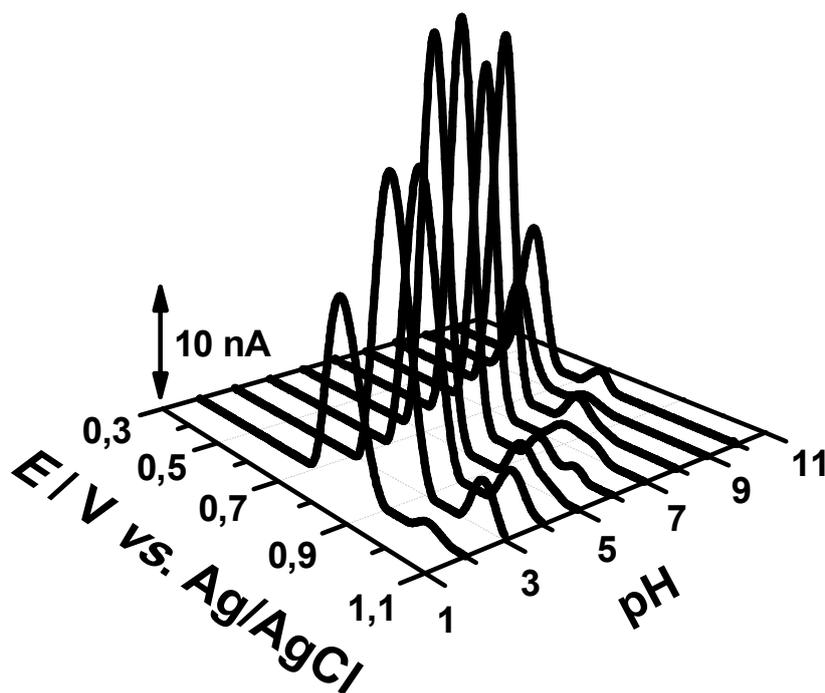


Figura 4.3. Voltamogramas de DP em 3D, com a linha de base corrigida, utilizando GCE, em 25 μM de DPT, em diferentes pHs, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Os voltamogramas de DP apresentaram dois picos de oxidação, P1a e P2a, para todos os valores de pH investigados, **Figura 4.3**. Para $3,2 < \text{pH} < 10,2$, os picos de oxidação P1a e P2a da DPT mostraram-se pH-dependentes, e para $\text{pH} > 10,2$ ambos os picos de oxidação tornaram-se pH-independentes, de acordo com o mecanismo de transferência de um elétron e um próton no resíduo de aminoácido Trp, na estrutura da DPT, ver *Secção 4.2.5*.

4.2.3 Voltametria de Onda Quadrada

Na voltametria de SW a corrente é amostrada antes do fim de ambos os impulsos, positivo e negativo, de modo que os picos correspondentes à oxidação e redução das espécies eletroativas na superfície do eletrodo podem ser obtidos no mesmo ciclo.

Ademais, a voltametria de SW permite verificar a reversibilidade da reação de transferência de elétrons em um único varrimento [233].

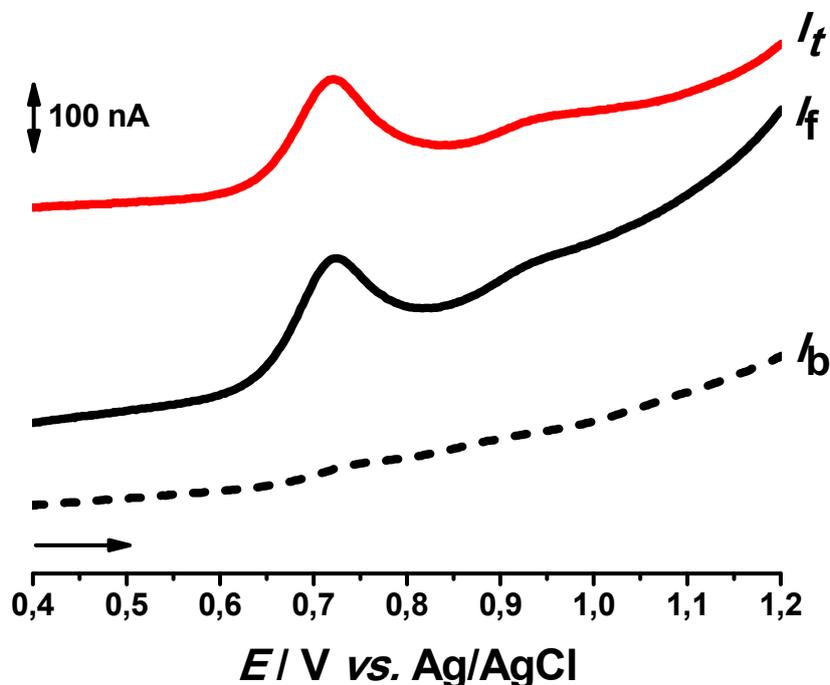


Figura 4.4. Voltamograma de SW para 25 μM de DPT utilizando GCE em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; amplitude de pulso 50 mV, $f = 13$ Hz, degrau de potencial $\Delta E_s = 2$ mV, $v_{\text{efetiva}} = 25$ mV s $^{-1}$. I_t – corrente total, I_f – corrente direta e I_b – corrente reversa.

O voltamograma de SW foi obtido em 25 μM de DPT, em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, utilizando um GCE limpo, **Figura 4.4**. Similarmente a voltametria cíclica e de DP, duas reações consecutivas foram observadas. A partir da corrente direta (I_f) e inversa (I_b) obtidas pela corrente total (I_t) do primeiro varrimento, a irreversibilidade dos dois picos redox pode ser confirmada, **Figura 4.4**.

4.2.4 Efeito de Agentes Desnaturantes na Oxidação da Daptomicina

O processo de desnaturação de peptídeos causa mudanças morfológicas em sua estrutura 3D, que por sua vez se desdobram na superfície do eletrodo, tornando mais fácil a oxidação eletroquímica de resíduos de aminoácidos eletroativos.

Como agente desnaturante, a ureia afeta a estrutura secundária e terciária sem afetar a estrutura primária, o surfactante SDS dissolve as proteínas hidrofóbicas e o agente redutor DTT rompe as ligações dissulfeto, que são essenciais para a análise qualitativa e quantitativa na investigação do mecanismo proteômico [234]. Entre estes desnaturantes, a ureia e o SDS não são eletroativos na superfície do GCE, diferentemente do DTT, o qual é eletroativo [235].

O efeito destes agentes desnaturantes sobre a oxidação eletroquímica da DPT foi avaliado por voltametria de DP comparando as alterações no comportamento eletroquímico da DPT antes e depois da interação com cada agente desnaturante. Sendo assim, para cada experiência, incubou-se separadamente 25 μM de DPT com 25 μM de ureia, SDS ou DTT, durante 3 horas, e registaram-se voltamogramas de DP, sempre utilizando uma superfície de GCE limpa, em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,0.

De acordo com os voltamogramas de DP obtidos, nenhum pico de oxidação foi observado na solução de DPT incubada com ureia. Nas soluções de DPT incubadas com SDS ou DTT, os picos de oxidação da DPT foram observados sem mudanças significativas.

4.2.5 Comportamento Redox do Triptofano

O resíduo de aminoácido triptofano (Trp) é o único resíduo de aminoácido na estrutura da DPT que pode ser oxidado em solução aquosa [109].

Neste sentido, com o intuito de esclarecer o mecanismo de oxidação da DPT, o comportamento redox do Trp nas mesmas condições experimentais foi também investigado. Voltamogramas de DP em 25 μM de DPT e Trp, utilizando GCE, em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 foram registrados, **Figura 4.5**.

Nos voltamogramas de DP foram observados dois picos de oxidação para o Trp, em $E_{p1a} = +0,61$ V e $E_{p2a} = +1,00$ V, **Figura 4.5 (—)**, e similarmente para a DPT, em $E_{p1a} = +0,68$ V e $E_{p2a} = +0,91$ V, **Figura 4.5 (—)**.

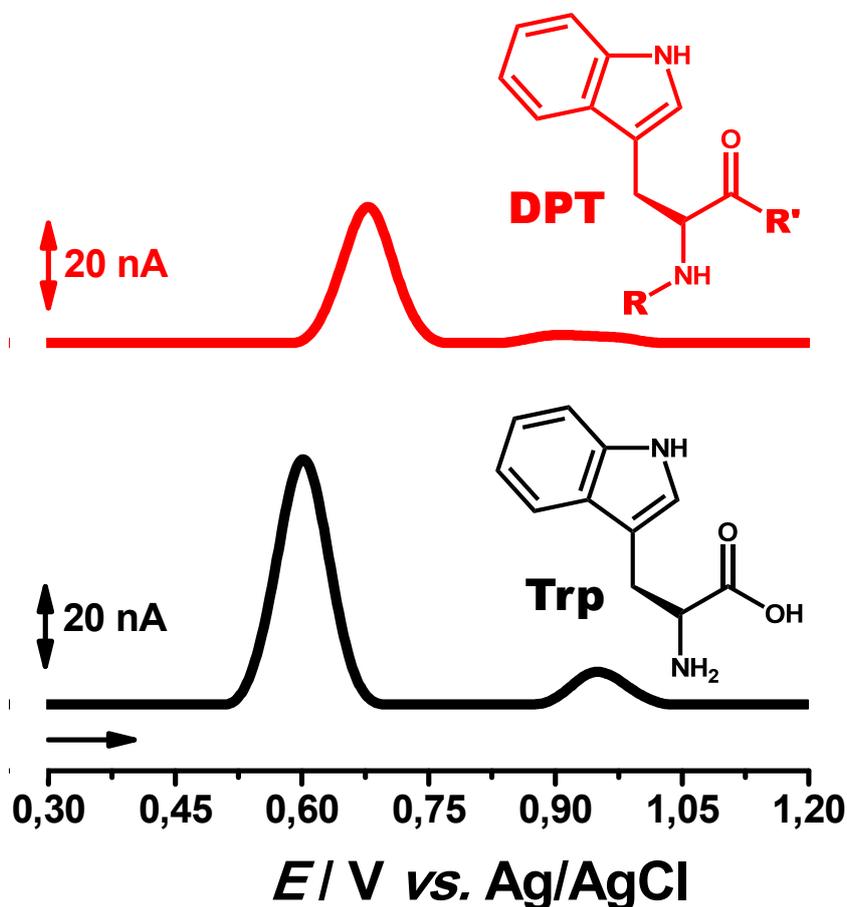


Figura 4.5. Voltamograma de DP, com linha de base corrigida, para 25 μ M de (—) DPT e (—) Trp utilizando GCE em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, $\nu = 5$ mV s⁻¹.

O deslocamento do pico de oxidação da DPT para potenciais maiores, comparado com Trp, pode ser explicado levando em consideração o tamanho da molécula, sua configuração 3D, bem com a orientação espacial na superfície do elétrodo, tornando mais difícil o acesso do resíduo do aminoácido Trp para sua oxidação.

4.2.6 Curvas de Calibração

A determinação eletroanalítica da DPT foi realizada por voltametria de DP medindo a corrente do pico de oxidação P1a da DPT no intervalo de concentração na solução entre 0,5 e 25,0 μM , **Figura 4.6**.

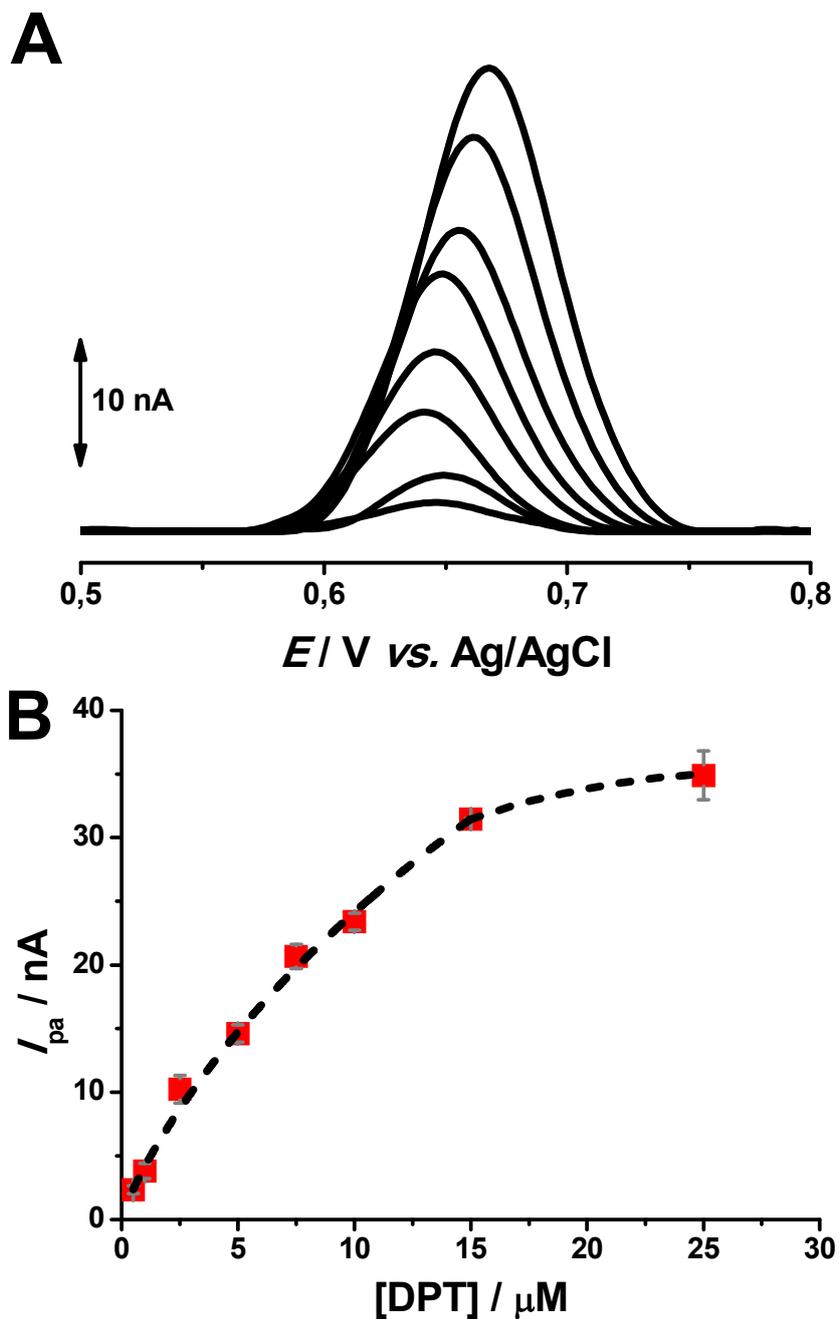


Figura 4.6. (A) Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, utilizando GCE em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 para 0,5, 1,0, 2,5 5,0, 7,5, 10,0, 15,0 e 25,0 μM de DPT, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Curva de calibração.

Cada experiência foi realizada sempre utilizando uma superfície limpa de GCE, após o pré-tratamento mecânico e eletroquímico, *Secção 2.4*, processo o qual propicia pequenas mudanças na área superficial do GCE, que por sua vez causa pequenas variações nas correntes de pico medidas.

De acordo com os dados obtidos por meio de três curvas de calibração ($n = 3$), **Figura 4.6**, foi demonstrado pelo valor de $R^2 = 0,993$ um intervalo linear entre 0,5 e 7,5 μM de DPT ($n = 5$), conforme a equação abaixo, e um desvio padrão relativo (R.S.D.) inferior a 7 nA. Os resultados estão sumarizados na **Tabela 4.1**.

$$I_{pa} \text{ (nA)} = 2,63 \text{ (nA } \mu\text{M}^{-1}) [\text{DPT}] \text{ (}\mu\text{M)} - 1,15 \text{ (nA)}$$

Tabela 4.1. Parâmetros eletroanalíticos obtidos a partir das curvas de calibração de DPT por voltametria de DP utilizando GCE.

Parâmetros	Resultados
Intervalo Linear	0,5–7,5 μM
Sensibilidade	2,63 nA/ μM
Intercetação	1,15 nA
LOD	0,32 μM
LOQ	1,06 μM
SD	0,28 nA
R^2	0,993

4.2.7 *Determinação em Fluido Biológico*

Para a quantificação de DPT em fluido biológico de soro fetal bovino por voltametria de DP, o método de adição/recuperação foi utilizado. Uma amostra de fluido biológico de soro fetal bovino foi propositalmente contaminada com $2,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de DPT e então diluída diretamente na célula eletroquímica até a concentração final de $2,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ DPT. Foram registados voltamogramas de DP

em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 medindo a corrente do pico de oxidação P1a da DPT. O efeito da matriz foi avaliado e não apresentou interferência significativa, uma vez que uma concentração de $1,99 \pm 0,09 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ DPT e um valor de recuperação médio de 99,5% foram obtidos.

4.3 Investigação da Interação DPT-dsDNA

4.3.1 Comportamento voltamétrico da DPT, dsDNA, poly[G] e poly[A] revisado

O comportamento eletroquímico da DPT, dsDNA, poly[G] e poly[A] utilizando GCE em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5 foi investigado para controlo, **Figura 4.7**, para facilitar a identificação dos picos de oxidação ocorridos após a interação *in situ* de DPT-dsDNA, DPT-poly[G] e DPT-poly[A].

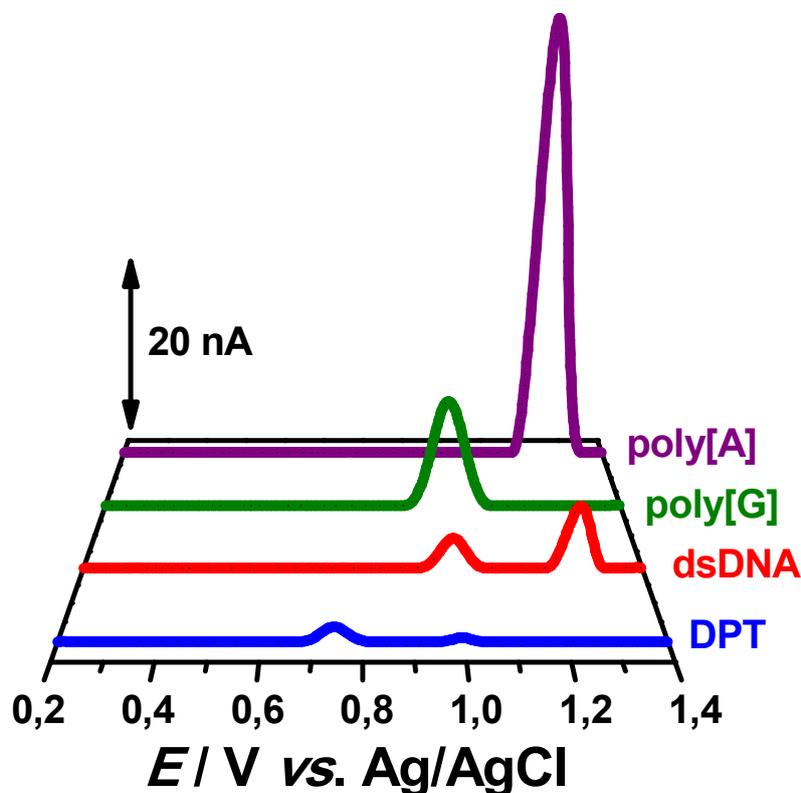


Figura 4.7. Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, utilizando GCE, em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, para (—) 0,5 μ M DPT, (—) 50 μ g mL⁻¹ dsDNA, (—) 50 μ g mL⁻¹ poly[G] e (—) 50 μ g mL⁻¹ poly[A], $v = 5$ mV s⁻¹.

O voltamograma de DP para a DPT, **Figura 4.7 (—)**, apresentou dois picos, em $E_{p1a} = +0,74$ V e $E_{p2a} = +0,99$ V, correspondentes à oxidação do resíduo de aminoácido Trp presente na estrutura da DPT. Para o dsDNA, o voltamograma de DP apresentou dois picos de oxidação, correspondentes a oxidação dos resíduos de bases purinas na cadeia polinucleotídica, dGuo, em $E_{pa} = +0,99$ V, e dAdo, em $E_{pa} = +1,26$ V, **Figura 4.7 (—)**. Por fim, os voltamogramas de DP obtidos para poly[G] e poly[A] apresentaram apenas um pico de oxidação cada. O polihomonucleotídeo poly[G] contém apenas resíduos de Gua e sua oxidação ocorre nos resíduos de dGuo, em $E_{pa} = +0,99$ V, **Figura 4.7 (—)**, enquanto o polihomonucleotídeo poly[A] contém apenas resíduos Ade e sua oxidação ocorre nos resíduos de dAdo, em $E_{pa} = +1,26$ V, **Figura 4.7 (—)**.

4.3.2 Interação DPT-dsDNA em Soluções Incubadas

4.3.2.1 Eletroquímica

A investigação da habilidade da DPT em causar desconformação da dupla hélice do DNA, quebra das ligações de hidrogênio e/ou dano oxidativo às bases do dsDNA foi inicialmente realizada em soluções incubadas de DPT-dsDNA por voltametria de DP utilizando GCE.

Os efeitos da interação DPT-dsDNA foram seguidos eletroquimicamente pela comparação das mudanças dos picos de oxidação do dsDNA na ausência e na presença da DPT, pelo monitoramento da ocorrência dos picos de oxidação de Gua livre e Ade livre, e dos produtos de oxidação de Gua e/ou Ade, 8-oxoGua e 2,8-oxoAde, respectivamente.

A investigação eletroquímica da interação DPT-dsDNA foi realizada em soluções incubadas contendo 0,5 μ M DPT e 50 μ g mL⁻¹ dsDNA, utilizando GCE, em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, após diferentes períodos de tempo de incubação,

Figura 4.8. Após cada experiência, a superfície do GCE foi submetida ao procedimento de pré-tratamento, de acordo com a *Secção 2.4*, a fim de remover todos os produtos de oxidação adsorvidos na superfície do eletrodo e condicioná-la para a experiência subsequente.

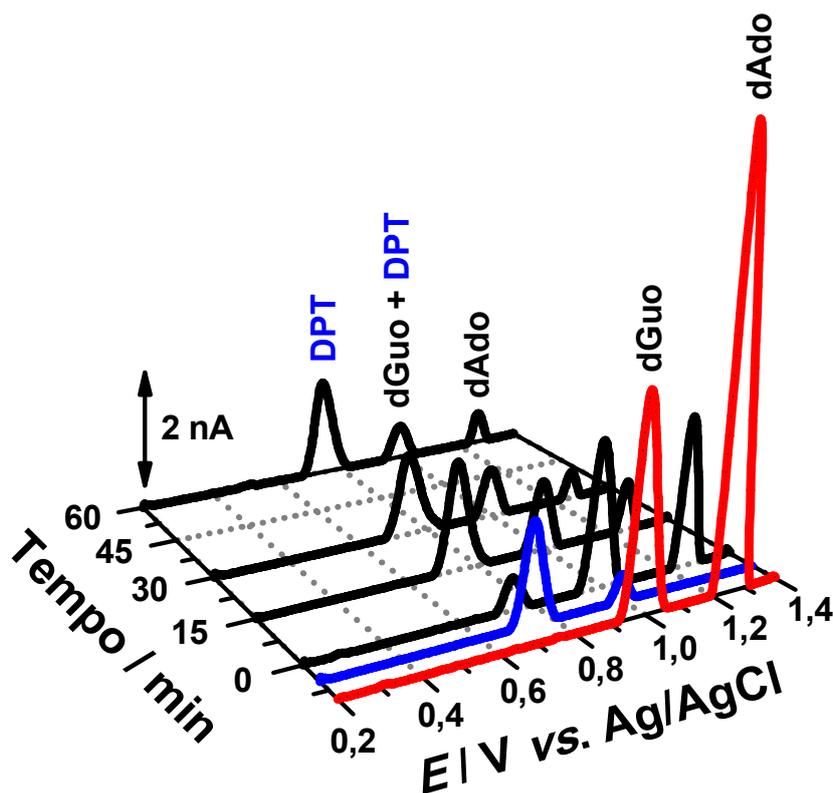


Figura 4.8. Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, para (—) 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA controlo, (—) 0,5 μM DPT controlo e (—) após a incubação de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA com 0,5 μM DPT durante diferentes períodos de tempo: 0, 15, 30 e 60 minutos, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

O voltamograma de DP obtido imediatamente após a adição de 0,5 μM DPT à solução contendo 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA apresentou os dois picos de oxidação do dsDNA, sendo o pico da dGuo em $E_{\text{pa}} = +0,99 \text{ V}$ e o pico da dAdo em $E_{\text{pa}} = +1,26 \text{ V}$, com um decréscimo na intensidade das correntes, e um novo pico, $E_{\text{pa}} = +0,74 \text{ V}$, atribuído a oxidação da DPT. O segundo pico de oxidação da DPT, em $E_{\text{pa}} = +0,99 \text{ V}$, não pôde ser visualizado no voltamograma de DP, uma vez este ocorre no mesmo potencial que o pico de oxidação da dGuo.

A variação da corrente do primeiro pico de oxidação P1a da DPT, atribuído a oxidação dos resíduos de aminoácidos Trp, imediatamente após a adição de DPT à solução contendo dsDNA pode ser explicada tendo em consideração a competição de ambas as moléculas durante a oxidação na superfície do GCE e o arranjo estrutural da molécula de DPT durante a interação com dsDNA.

Ao aumentar o tempo de incubação, 15, 30 e 60 minutos, ambos os picos de oxidação de dGuo e dAdo decresceram progressivamente, enquanto o pico de oxidação P1a da DPT aumentou, sendo então estabilizado após 60 minutos. A diminuição da intensidade das correntes dos picos de oxidação do dsDNA com o aumento do tempo de incubação com DPT pode ser explicada considerando a formação de uma estrutura de DNA mais rígida devido à agregação de cadeias de dsDNA, que provoca uma maior dificuldade na transferência de elétrons quando comparada com uma estrutura de dsDNA não agregada. Dessa forma, a formação de uma estrutura rígida DPT-dsDNA impede que os resíduos nucleosídicos interajam e sejam oxidados na superfície do GCE.

O incremento da corrente do primeiro pico de oxidação da DPT para os tempos de 15, 30 e 60 minutos, quando comparada a incubação inicial, deve-se a estabilização da molécula de DPT durante sua interação com dsDNA para maiores tempos. Possivelmente, uma nova mudança na conformação da DPT ocorreu, a qual voltou a favorecer a oxidação dos resíduos de aminoácidos Trp.

Maiores tempos de incubação foram investigados, porém nenhuma mudança significativa nas intensidades de correntes dos picos de oxidação do dsDNA e/ou surgimento de novos picos foi observado.

4.3.2.2 Espectrofotometria UV-Visível

As possíveis mudanças conformacionais na estrutura do dsDNA promovidas pela interação com a DPT foram investigadas também por espectrofotometria UV-Vis em soluções incubadas com 0,5 μM DPT e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, imediatamente após a adição de DPT à solução com dsDNA e após 24 horas de incubação. Soluções controle contendo 0,5 μM DPT e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA também foram preparadas e espectros de UV-Vis foram obtidos para os mesmos tempos de incubação.

A diferença nos espectros de absorção do dsDNA foi monitorada na ausência e na presença de DPT a fim de determinar a influência da interação do DPT na conformação e morfologia do dsDNA. De acordo com os espectros de absorção UV-Vis obtidos imediatamente após a adição de DPT à solução contendo dsDNA e após 24 horas de incubação nenhuma alteração pode ser observada, o que indica que a técnica espectrofotométrica não foi promissora na investigação da interação DPT-dsDNA.

4.3.3 Interação DPT-dsDNA utilizando Biossensores Eletroquímicos de dsDNA

O efeito da DPT na estrutura do dsDNA foi investigado por voltametria de DP e as respostas dos biossensores eletroquímicos com multicamadas de dsDNA após a interação com DPT foram comparadas com o biossensor eletroquímico de dsDNA controle. Dessa forma, os efeitos da interação DPT-dsDNA foram acompanhados eletroquimicamente pela análise da variação dos picos de oxidação nos biossensores de dsDNA com relação à dGuo e dAdo, e pelo surgimento de novos picos de oxidação, entre eles, dos produtos de oxidação da Gua e/ou Ade, 8-oxoGua e 2,8-oxoAde, respectivamente, em $E_{pa} = +0,45 \text{ V}$.

Para cada período de tempo de incubação, 15, 30 e 60 minutos, um novo biossensor eletroquímico com multicamadas de dsDNA foi preparado, de acordo com a *Secção 2.5.2*, incubado em 0,5 μM DPT, lavado com água desionizada para remover moléculas de DPT que não interagiram, seco sob atmosfera de $\text{N}_{2(\text{g})}$ e transferido para uma célula eletroquímica contendo solução tampão acetato 0,1 pH 4,5, onde os voltamogramas de DP para cada biossensor incubado foram registados.

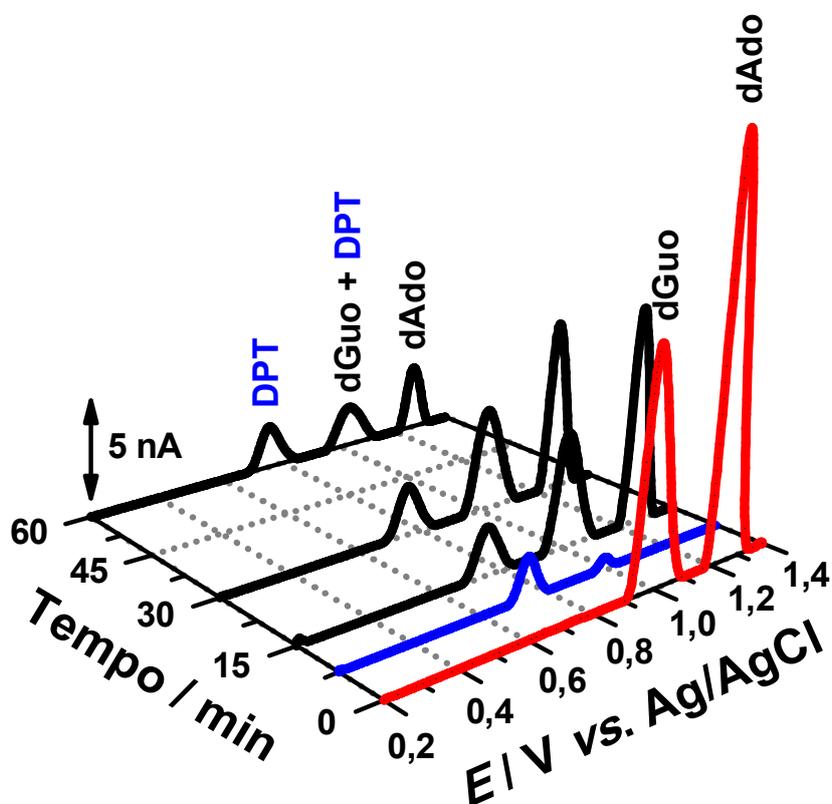


Figura 4.9. Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, para (—) biossensor eletroquímico de dsDNA controlo, (—) 0,5 μM DPT controlo e (—) após a incubação do biossensor eletroquímico de dsDNA em 0,5 μM DPT durante diferentes períodos de tempo: 15, 30 e 60 minutos, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

O voltamograma de DP para o biossensor eletroquímico de dsDNA controlo em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5 apresentou ambos os picos de oxidação dGuo, em $E_{\text{pa}} = +1,01 \text{ V}$, e dAdo, em $E_{\text{pa}} = +1,26 \text{ V}$, **Figura 4.9** (—). Em uma nova experiência, o voltamograma de DP obtido para o biossensor eletroquímico de dsDNA após sua

incubação por 15 minutos em 0,5 μM DPT apresentou os dois picos referentes à oxidação do dsDNA, e um novo pico de oxidação, em $E_{\text{pa}} = +0,75 \text{ V}$.

O novo pico de oxidação, em $E_{\text{pa}} = +0,75 \text{ V}$, coincide com o potencial do primeiro pico de oxidação P1a da DPT, portanto, sugere-se que este corresponda à oxidação dos resíduos de aminoácidos Trp presente na estrutura da DPT adsorvidos na superfície do GCE através dos poros formados durante a imobilização do dsDNA ou do complexo DPT-dsDNA formado durante a incubação e adsorvido na superfície do GCE.

Utilizando novos biossensores eletroquímicos de dsDNA, incubações em 0,5 μM DPT por 30 e 60 minutos foram realizadas e voltamogramas de DP foram registados. Para ambos os voltamogramas de DP obtidos, um decréscimo das correntes dos picos de oxidação da dGuo e dAdo pode ser observado. Ademais, o pico de oxidação dos resíduos de aminoácidos Trp da DPT, em $E_{\text{pa}} = +0,75 \text{ V}$, foi observado em ambos os voltamogramas de DP sem modificações significativas na intensidade de corrente.

A progressiva diminuição da intensidade de corrente dos picos de oxidação do dsDNA com o aumento do tempo de incubação dos biossensores na solução de DPT deve-se a condensação e/ou agregação do DNA imobilizado na superfície do GCE. A reprodução do pico em $E_{\text{pa}} = +0,75 \text{ V}$ nos voltamogramas DP e sua constante intensidade de corrente corrobora com o prognóstico que este se deve aos resíduos de aminoácidos Trp da DPT.

4.3.4 Interação DPT-dsDNA utilizando Biossensores Eletroquímicos de Poly[G] e Poly[A]

A interação DPT-dsDNA também foi avaliada por voltametria de DP utilizando biossensores eletroquímicos dos polihomonucleotídeos poly[G] e poly[A] em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, a fim de obter informações sobre a interação preferencial

da DPT. Para cada experiência um novo biossensor eletroquímico com multicamadas de poly[G] e poly[A] foi preparado, *Secção 2.5.2*, semelhantemente aos biossensores eletroquímicos com multicamadas de dsDNA, e investigados em diferentes tempos de incubação.

Os biossensores eletroquímicos de poly[G] e poly[A] foram incubados em soluções contendo 0,5 μM DPT por 15, 30 e 60 minutos e analisados por voltametria de DP em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, **Figura 4.10** e **Figura 4.11**. Cada experiência foi sempre realizada utilizando um novo biossensor eletroquímico de poly[G] e poly[A], com a superfície do GCE previamente submetida ao procedimento de pré-tratamento, de acordo com a *Secção 2.4*.

O voltamograma de DP obtido para o biossensor eletroquímico de poly[G] controlo apresentou o pico de oxidação referente à oxidação das moléculas de dGuo, da unidade monomérica do poly[G], em $E_{\text{pa}} = +0,99$ V, **Figura 4.10 (—)**. Após a incubação de um novo biossensor eletroquímico de poly[G] em 0,5 μM DPT por 15 minutos, o voltamograma de DP mostrou um decréscimo significativo da corrente do pico de oxidação da dGuo e, de modo igual aos biossensores eletroquímicos de dsDNA incubados com DPT, o pico de oxidação dos resíduos de aminoácidos Trp da DPT, em $E_{\text{pa}} = +0,75$ V, **Figura 4.10 (—)**.

Para maiores tempos de incubação em DPT, os voltamogramas de DP dos biossensores eletroquímicos de poly[G] apresentaram uma diminuição significativa na intensidade de corrente para o pico de oxidação da dGuo, enquanto o pico de oxidação referente ao resíduo de aminoácido Trp da DPT, em $E_{\text{pa}} = +0,75$ V, manteve-se constante.

Os resultados obtidos utilizando biossensores eletroquímicos de poly[G] confirmaram os obtidos em soluções incubadas e utilizando biossensores eletroquímicos

de dsDNA, nomeadamente no que diz respeito à condensação e/ou agregação progressiva do poly[G] com o decorrer do tempo da interação DPT-poly[G].

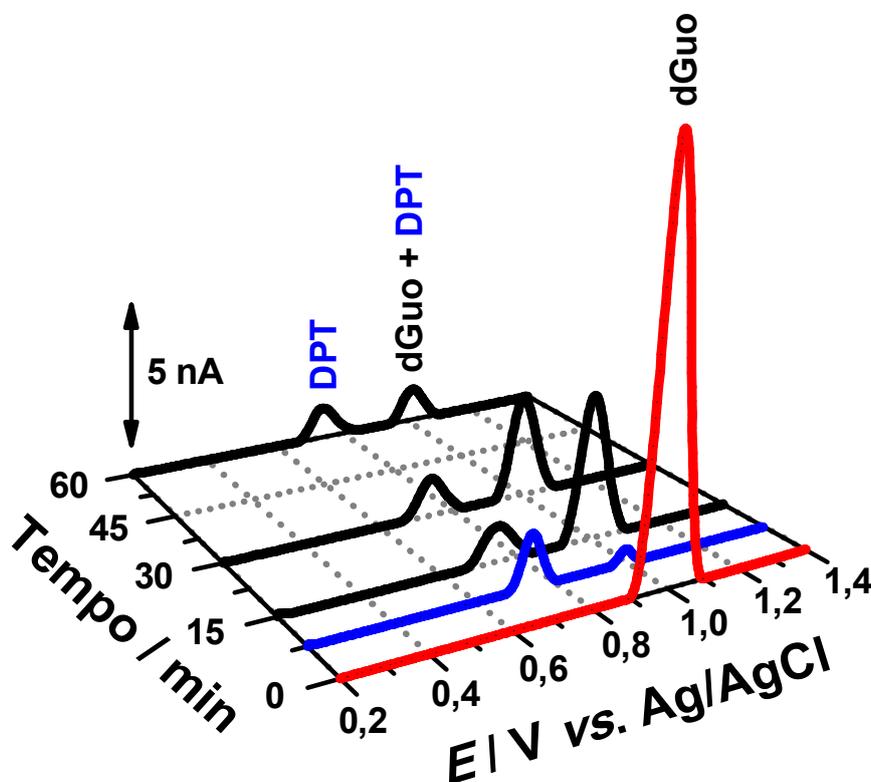


Figura 4.10. Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, para (—) biossensor eletroquímico de poly[G] controlo, (—) 0,5 μM DPT controlo e (—) após a incubação do biossensor eletroquímico de poly[G] em 0,5 μM DPT durante diferentes períodos de tempo: 15, 30 e 60 minutos, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

O voltamograma de DP obtido para o biossensor eletroquímico de poly[A] controlo apresentou o pico de oxidação, em $E_{pa} = +1,26 \text{ V}$, devido à oxidação das moléculas de dAdo, da unidade monomérica do poly[A], **Figura 4.11** (—). Os voltamogramas obtidos para novos biossensores eletroquímicos de poly[A] incubados em 0,5 μM DPT por 15, 30 e 60 minutos, **Figura 4.11** (—), apresentaram um gradual decréscimo da corrente do pico de oxidação da dAdo, em $E_{pa} = +1,26 \text{ V}$, e o aparecimento do pico de oxidação do resíduo de aminoácido Trp da DPT, em $E_{pa} = +0,75 \text{ V}$, o qual se manteve sem mudanças significativas na sua intensidade de corrente.

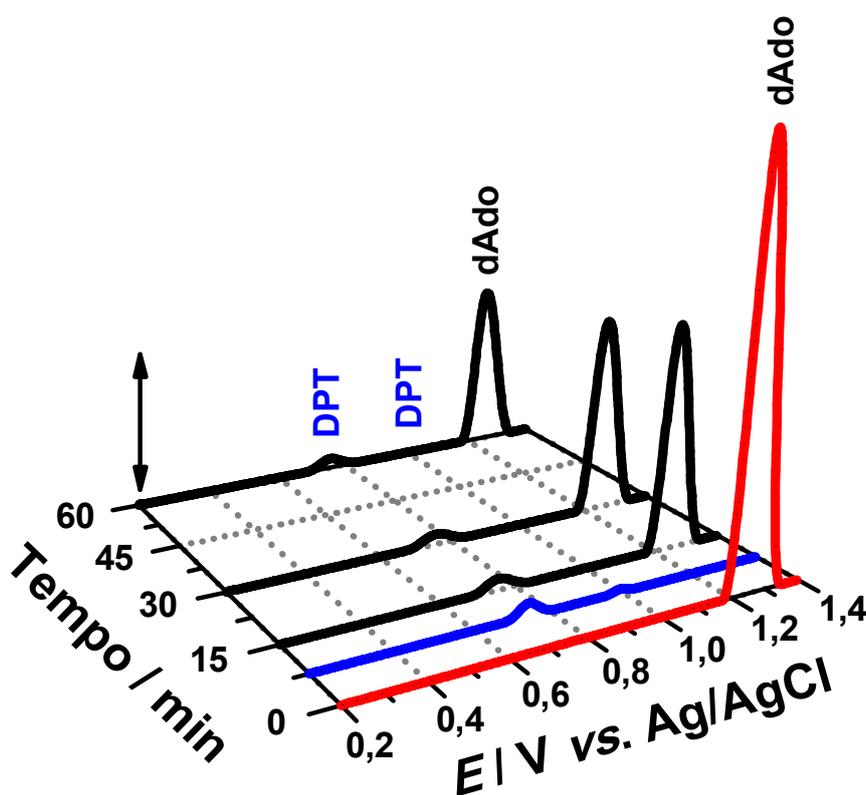


Figura 4.11. Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, para (—) biossensor eletroquímico de poly[A] controle, (—) 0,5 μ M DPT controle e (—) após a incubação do biossensor eletroquímico de poly[A] em 0,5 μ M DPT durante diferentes períodos de tempo: 15, 30 e 60 minutos, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

De acordo com os resultados obtidos, os voltamogramas de DP para os biossensores eletroquímicos de poly[G] e poly[A] apresentaram uma diminuição na intensidade de corrente de pico de oxidação da dGuo e dAdo, respectivamente, quando comparados com os biossensores eletroquímicos de poly[G] e poly[A] controles. Diante disso, é possível sugerir que o mecanismo molecular da interação DPT-dsDNA ocorre efetivamente independente da sequência de DNA ocasionando a condensação e/ou agregação da sua dupla hélice.

4.4 Considerações Finais

A resistência aos antibióticos constitui um grave problema no tratamento das doenças infecciosas, sendo, atualmente, uma realidade a nível global. De modo a contornar este facto, novos antibióticos têm sido desenvolvidos, entre eles, destaca-se a classe de antibióticos lipopeptídicos cíclicos, nomeadamente a DPT.

O aumento da incidência de patógenos gram-positivos resistentes a múltiplos fármacos enfatiza a necessidade da descoberta de novos agentes farmacológicos, bem como o desenvolvimento de métodos de controlo de qualidade.

Neste capítulo, o comportamento eletroquímico da DPT utilizando GCE foi investigado por voltametria cíclica, de DP e de SW em um amplo intervalo de pH. De acordo com os resultados obtidos, a oxidação da DPT ocorre por meio de um mecanismo de duas etapas, sendo que, para $3,2 < \text{pH} < 10,2$ ambas as reações anódicas da DPT, picos de oxidação P1a e P2a, demonstraram ser pH-dependentes.

Entre os 13 aminoácidos presentes na composição da DPT, apenas o aminoácido Trp é eletroativo em solução aquosa. A oxidação do Trp ocorre em um mecanismo de duas etapas, similarmente a DPT, porém para potenciais positivos menores.

O maior potencial de pico de oxidação do resíduo de aminoácido Trp na DPT pode ser explicado pela estrutura 3D do peptídeo macrocíclico, **Figura 4.1**, a qual torna o acesso do resíduo de aminoácido Trp mais difícil, por consequência, os potenciais de pico de oxidação da DPT são mais elevados.

O aminoácido Trp é um derivado indol substituído na posição C3 e a oxidação eletroquímica da DPT em solução aquosa ocorre no resíduo de aminoácido Trp. Considerando o fato que o anel pirrólico do indol é mais reativo que o anel benzénico, a primeira reação de oxidação, pico de oxidação P1a, corresponde à oxidação na posição C2 no anel pirrólico [105, 109, 236], uma vez que todos os derivados indol, tal como a

DPT-1, são substituídos na posição C3. A segunda reação de oxidação, pico de oxidação P2a, de derivados indol com substituintes na posição C3, corresponde a um elétron sendo removido da DPT-2, seguido pela desprotonação e o ataque nucleofílico direto da água, com a hidroxilação do C7 do benzeno, DPT-3. O mecanismo de oxidação proposto para a DPT é apresentado na **Figura 4.12**.

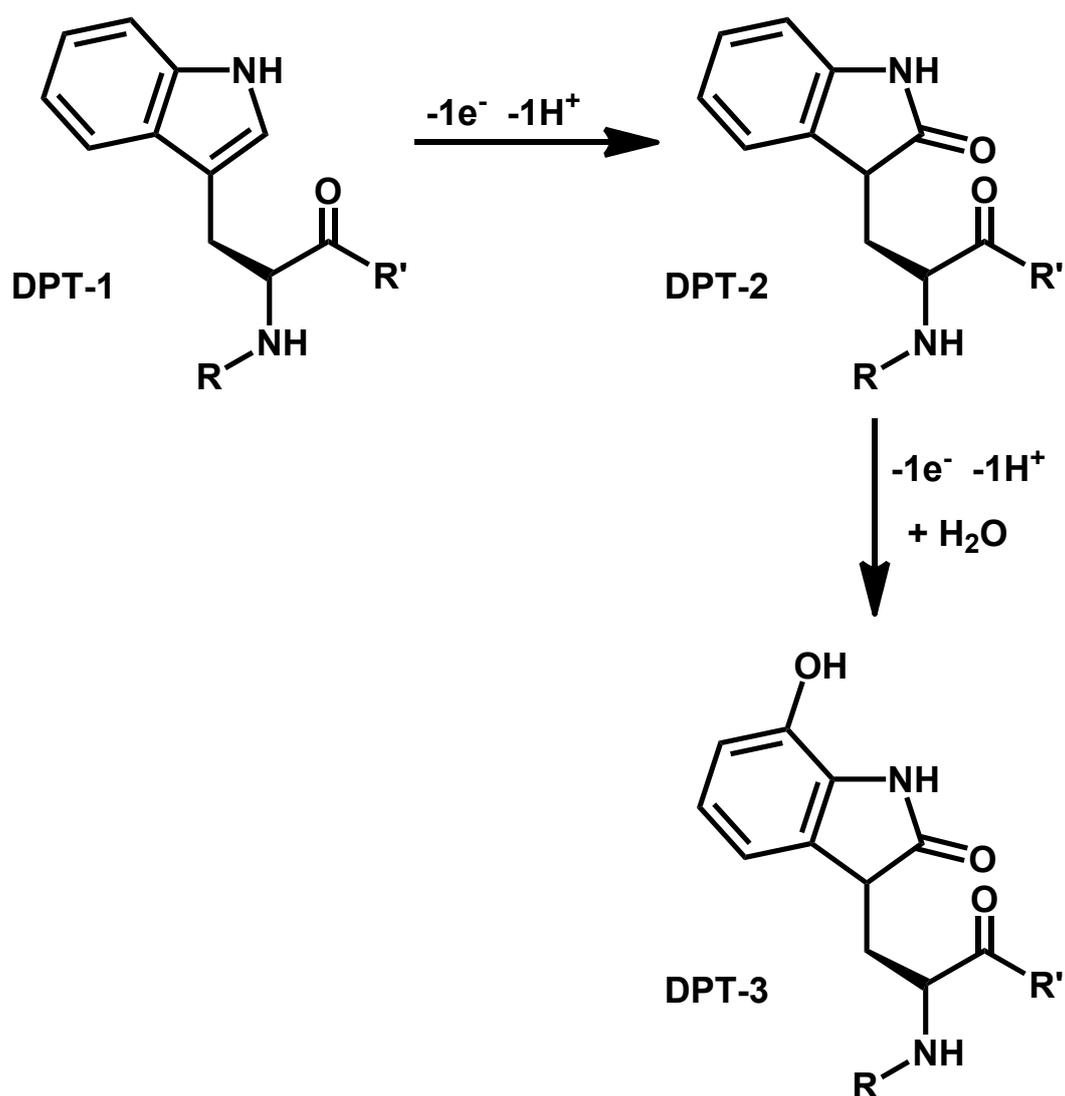


Figura 4.12. Mecanismo de oxidação proposto para a DPT.

A determinação eletroanalítica de padrões de DPT foi realizada por voltametria de DP, medindo a corrente do primeiro pico P1a de oxidação da DPT, e obteve-se um

LOD = 0,32 μM e um LOQ = 1,06 μm . Comparado com outros métodos, a técnica eletroquímica apresentou menores limites de detecção e quantificação [220, 227, 228].

A quantificação eletroanalítica da DPT foi realizada, pela primeira vez, em fluido biológico de soro fetal bovino, pelo método de adição/recuperação, com alta eficiência e sensibilidade. A concentração final de $1,99 \pm 0,09 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de DPT foi encontrada por voltametria de DP em fluido biológico de soro fetal bovino, em acordo com a concentração de DPT adicionada, evidenciando que, a eletroanálise de DPT é um método promissor, com grande eficiência e sensibilidade, para ser aplicado na quantificação de DPT em amostras biológicas reais.

Considerando que a DPT é um fármaco novo e tem efeitos imunomoduladores, os quais permitem a sua interação com o DNA e afetam a síntese de mRNA e proteínas [237], o estudo da interação da DPT-dsDNA é de grande relevância. Primeiramente, as interações DPT-dsDNA foram avaliadas em soluções incubadas por voltametria de DP e espectrofotometria UV-Vis. Os resultados obtidos foram comparados pela investigação *in situ* utilizando biossensores eletroquímicos de dsDNA, poly[G] e poly[A].

De acordo com os resultados obtidos, sugere-se que o mecanismo de interação DPT-dsDNA ocorre independente da sequência de bases do DNA, ou seja, com afinidade para ambas as bases purínicas, induzindo a condensação e/ou agregação da dupla hélice do DNA. Por fim, nas condições experimentais utilizadas, a DPT não promoveu dano oxidativo ao DNA, uma vez o pico dos biomarcadores 8-oxoGua e 2,8-oxoAde, em $E_{\text{pa}} = +0,45 \text{ V}$, não foi eletroquimicamente detetado.

CAPÍTULO 5

Antileishmanial Miltefosina

A leishmaniose é uma doença causada por um parasita microscópico transmitido entre hospedeiros através da picada de um inseto semelhante a um mosquito. Após a infecção, a doença pode evoluir de forma muito grave, e ser mesmo fatal se não tratada adequadamente.

De acordo com os dados da Organização Mundial de Saúde [238], a cada ano, cerca de 700 mil a um milhão de novos casos são registados ao redor do mundo, resultando em mais de 20 mil mortes. Em Portugal, os casos reportados de leishmaniose humana são reduzidos, menos de um em cada 10 mil habitantes, devido à subnotificação de casos positivos e à falta de um plano nacional de diagnóstico. A nível nacional, mais do que um problema de saúde pública, a leishmaniose é um problema veterinário, com cerca de 6% dos cães a revelaram-se positivos para a doença.

Neste capítulo é apresentada a investigação *in situ* da interação do fármaco antileishmanial miltefosina (MTF) com dsDNA, em diferentes períodos de tempo, em soluções incubadas por voltametria de DP e espectrofotometria UV-Vis, e com biossensores eletroquímicos de dsDNA, poly[G] e poly[A] por voltametria de DP.

5.1 Introdução

O progresso com ciência e tecnologia tem trazido melhorias na qualidade de vida e saúde, além de desenvolvimentos econômicos e sociais, embora várias doenças, a saber, as doenças tropicais negligenciadas, continuam a afetar as pessoas pobres e marginalizadas em todo o mundo [239].

Segundo a Organização Mundial da Saúde [240], uma doença que afeta principalmente os pobres pode ser caracterizada como uma doença da pobreza, a qual é dividida em duas classes. A primeira classe inclui VIH/SIDA, malária e tuberculose, doenças que têm recebido considerável atenção da comunidade e investimento em investigação e desenvolvimento para erradicá-las. A outra classe consiste em doenças negligenciadas, como oncocercose (cegueira dos rios), doença de Chagas, hanseníase, esquistossomose (bilharzíase), filaríase linfática, tripanossomíase africana (doença do sono), dengue e leishmaniose.

As doenças negligenciadas afetam principalmente os pobres, com pouca visibilidade e voz política, que vivem em habitações precárias e sem condições de saneamento nos países em desenvolvimento; são mais comuns em climas tropicais e, portanto, são muitas vezes referidas como doenças tropicais negligenciadas. Essas doenças são praticamente negligenciadas também pela comunidade de investigadores, mas podem ser prevenidas, controladas e, provavelmente, eliminadas usando soluções clínicas adequadas [241].

A leishmaniose é uma das mais importantes doenças parasitárias negligenciadas e refere-se a várias síndromes clínicas causadas por parasitas protozoários cinetoplastos encontrados em espécies de *Leishmania* [242], que são transmitidos a mamíferos pelas picadas de flebotomíneos dos géneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* via ciclos antroponótico ou zoonótico e infetá-los [243].

Em humanos, as infecções por *Leishmania* podem se manifestar em quatro formas mais comuns, dependendo das espécies causadoras, como leishmaniose cutânea, leishmaniose mucocutânea, leishmaniose cutânea difusa ou leishmaniose visceral [244]. Estima-se que cerca de 350 milhões de pessoas em todo o mundo estão em risco desta doença parasitária [245].

Nesse sentido, o reconhecimento e tratamento da leishmaniose é atualmente motivo de grande preocupação na saúde pública nos países em desenvolvimento. No entanto, o tratamento da leishmaniose continua a ser um desafio devido a problemas, como alto custo dos medicamentos, alta dosagem, incidência e prevalência de resistência aos medicamentos, efeitos colaterais e falta de novos fármacos antileishmaniais acessíveis [246].

Um dos fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose é a miltefosina (hexadecilfosfocolina, HePC, MTF), **Figura 5.1**, um análogo alquil-lisofosfolípido que foi originalmente desenvolvido para o tratamento de cancro de mama e outros tumores sólidos [247], mas sem sucesso devido à sua toxicidade gastrointestinal limitante da dose quando usado como agente oral [248]. No entanto, a MTF apresentou uma excelente atividade antileishmanial, tanto *in vitro* como em animais experimentais, possibilitando testes em humanos, e mais especificamente, uma avaliação clínica de seu uso oral no tratamento de leishmaniose visceral humana [249].

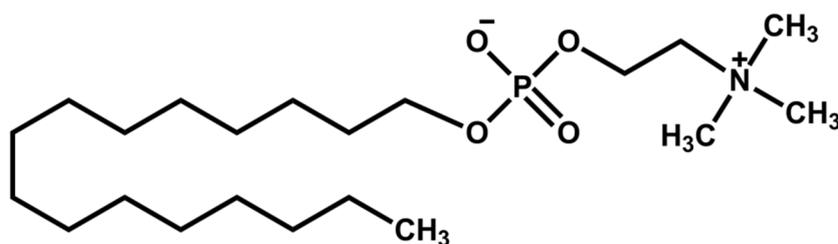


Figura 5.1. Estrutura química da miltefosina.

O uso de MTF como fármaco antileishmanial tem sido considerado muito importante, pois é o primeiro medicamento não parenteral, podendo ser administrado por via oral e localmente no tratamento da leishmaniose [246]. No entanto, o facto de a MTF ter sido o primeiro fármaco licenciado para o tratamento oral da leishmaniose e a sua biodisponibilidade oral, a MTF também apresenta efeitos perigosos, como toxicidade, descontinuação prematura da terapia, falha e desenvolvimento de resistência [249].

O mecanismo de ação antineoplásico da MTF está relacionado aos alvos antileishmanianos e incluem a inibição da biossíntese de fosfatidilcolina e a indução de apoptose, a qual conduz estresse intracelular (espécies reativas de oxigênio (ROS)), bloqueando sinais essenciais de sobrevivência ou induzindo várias vias de sinalização celular pró-apoptóticas [250].

Considerando o facto que a MTF é um fármaco relativamente novo, com efeitos adversos graves, e o seu mecanismo de ação antileishmanial ainda está em discussão, é muito importante investigar a interação da MTF com o DNA e os mecanismos antineoplásicos de ação envolvendo a apoptose e, conseqüentemente, as espécies reativas de oxigênio, que podem interagir com o dsDNA causando dano oxidativo [251, 252].

A investigação da interação entre fármacos tóxicos e DNA permite elucidar as implicações das modificações estruturais do DNA e os aspetos mecanísticos e citotóxicos da ação fisiológica dos fármacos.

Métodos eletroquímicos, como as técnicas de pulso, são adequados para investigar as reações de transferência de eletrões em sistemas biológicos, pois apresentam rápida resposta, alta sensibilidade, grande seletividade e uso de pequenas quantidades de amostras. Além disso, o uso de técnicas de pulso tem a vantagem de levar a uma grande melhoria na relação sinal-ruído em comparação com as técnicas de estado estacionário e, em muitos casos, maior seletividade [253].

Neste trabalho a interação do fármaco antileishmanial MTF-dsDNA foi investigada em diferentes períodos de tempo: (a) em soluções incubadas, por voltametria de DP e espectrofotometria UV-Vis, e (b) *in situ* usando biossensores eletroquímicos de dsDNA, poly[G] e poly[A].

5.2 Estudo Eletroquímico

O comportamento eletroquímico do fármaco antileishmanial MTF foi investigado utilizando GCE por voltametria cíclica, de DP e de SW em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5 contendo 100 μM MTF. Como esperado, nenhum processo eletroquímico redox foi observado, o que está de acordo com a estrutura química da MTF, tendo em vista que não há centros eletroativos que possam ser oxidados em solução aquosa.

5.3 Investigação da Interação MTF-dsDNA

5.3.1 Interação MTF-dsDNA em Soluções Incubadas

5.3.1.1 Eletroquímica

A interação MTF-dsDNA foi investigada em soluções incubadas utilizando voltametria de DP, para avaliar a possibilidade de a MTF causar mudanças conformacionais na dupla hélice do DNA, quebra da ligação de hidrogênio e/ou danos oxidativos às bases do dsDNA.

Soluções de diferentes concentrações de MTF, 100 μM e 0,1 μM , e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA foram incubadas em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, durante diferentes períodos de tempo. Depois de cada experiência, a superfície do GCE foi limpa e condicionada de acordo com os procedimentos descritos na *Secção 2.4*, a fim de remover todos os produtos de oxidação adsorvidos na superfície do eletrodo.

A interação MTF-dsDNA foi investigada inicialmente em soluções concentradas, contendo $100 \mu\text{M}$ MTF incubado com $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, utilizando GCE, **Figura 5.2**.

O voltamograma de DP obtido imediatamente após a adição de MTF à solução de dsDNA, **Figura 5.2** (—), apresentou de imediato um grande decréscimo de ambas as correntes dos picos anódicos correspondentes à oxidação da dGuo e dAdo, quando comparadas com a solução de dsDNA controle. Este comportamento pode ser explicado como uma forte condensação e/ou agregação da dupla hélice do dsDNA, devido a uma forte interação entre a MTF e o dsDNA.

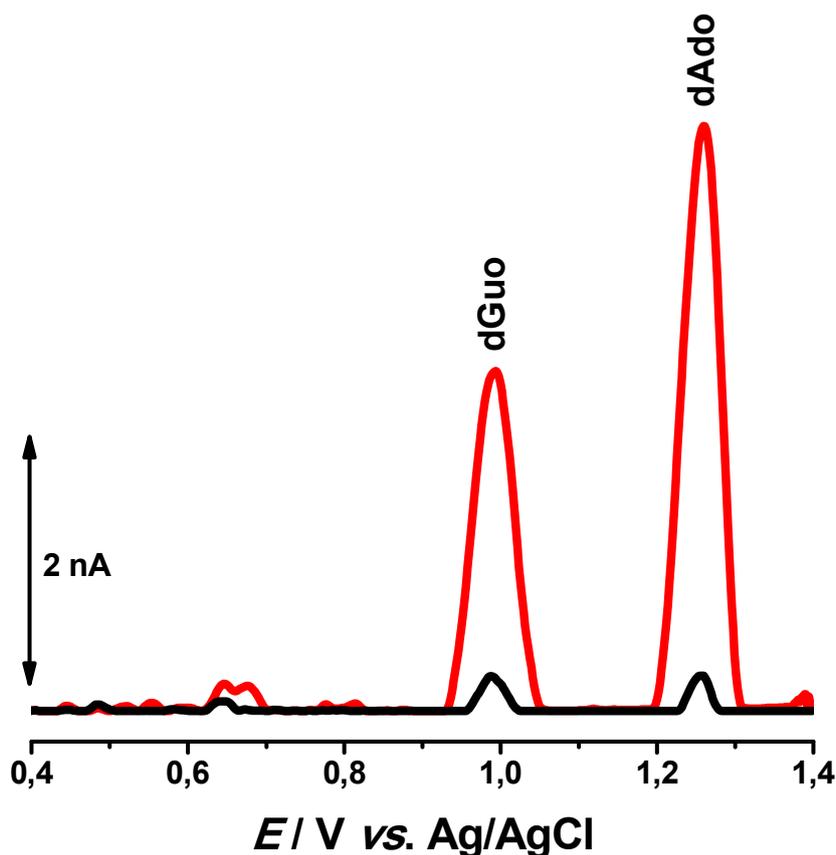


Figura 5.2. Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, em GCE, em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, para (—) $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA controle e (—) imediatamente após a adição de $100 \mu\text{M}$ MTF à $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

A fim de melhor compreender o efeito da interação MTF-dsDNA com o decorrer do tempo, diferentes períodos de incubação, foi investigado em soluções diluídas, contendo $0,1 \mu\text{M}$ MTF com $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, utilizando GCE, por voltametria de DP, **Figura 5.3.**

O voltamograma de DP obtido imediatamente após a adição de $0,1 \mu\text{M}$ MTF à solução contendo $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, **Figura 5.3 (—)**, mostrou os dois picos de oxidação do dsDNA, dGuo em $E_{\text{pa}} = +0,98 \text{ V}$ e dAdo em $E_{\text{pa}} = +1,25 \text{ V}$, com um pequeno decréscimo nas correntes de pico, quando comparado com a solução de dsDNA controle. Após 15 minutos de incubação as correntes dos picos de oxidação do dsDNA continuaram a decrescer, o que claramente demonstra que uma mudança conformacional na estrutura do dsDNA ocorreu após a interação MTF-dsDNA [11, 67, 254].

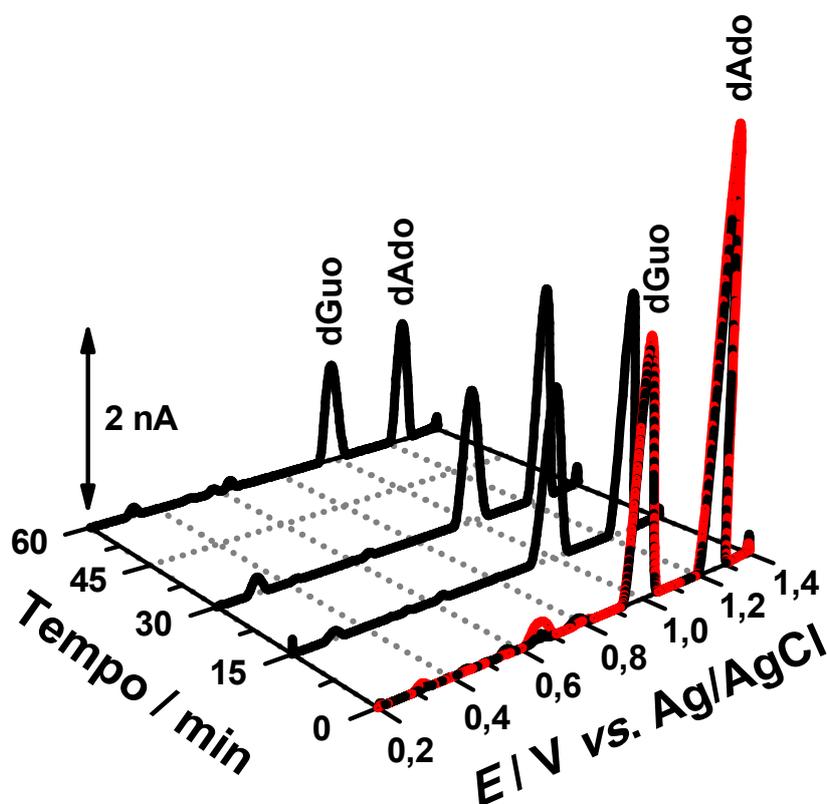


Figura 5.3. Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, em GCE, em solução tampão acetato $0,1 \text{ M}$ pH $4,5$, para (—) $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA controle e (—) após a incubação de $0,1 \mu\text{M}$ MTF com $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA durante diferentes períodos de tempo: $0, 15, 30$ e 60 minutos, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

As bases purínicas do DNA estão embebidas na estrutura mais compactada do dsDNA e menos expostas à superfície do GCE, o que torna a oxidação destas mais difícil, resultando em um decréscimo das correntes de pico de oxidação dGuo e dAdo [11, 67, 254, 255]. Com o aumento dos tempos de incubação para 30 e 60 minutos, ambas as correntes dos picos de oxidação de dGuo e dAdo continuaram a diminuir, o que está em concordância com uma forte condensação e/ou agregação do dsDNA causada pela interação MTF-dsDNA.

O voltamograma de DP obtido após 60 minutos de incubação em solução diluída 0,1 μM MTF e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, **Figura 5.3 (—)**, mostrou um grande decréscimo de ambas correntes dos picos de oxidação do dsDNA, similar às incubações em soluções concentradas de 100 μM MTF, **Figura 5.2**, o que confirma uma forte condensação e/ou agregação do dsDNA causado pela interação entre MTF e dsDNA.

5.3.1.2 Espectrofotometria UV-Visível

A avaliação da interação MTF-dsDNA em soluções incubadas também foi investigada por espectrofotometria UV-Vis. A diferença no espectro de absorção do dsDNA foi monitorada na ausência e na presença de MTF com o propósito de determinar a influência da interação da MTF na conformação e morfologia do dsDNA.

Espectros de absorção na região do UV-Vis para soluções controle de 500 μM MTF e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, e imediatamente após a adição de 500 μM MTF à solução contendo 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, em tampão acetato 0,1 M pH 4,5, **Figura 5.4**, foram registados.

O espectro controle obtido no intervalo de 400 a 230 nm, **Figura 5.4 (—)**, para 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA mostrou uma banda de absorção, em $\lambda_{\text{max}} = 260$ nm, atribuída às

transições $\pi \rightarrow \pi^*$ dos anéis heterocíclicos dos nucleotídeos do dsDNA. Em contrapartida, o espectro controlo para 500 μM MTF nas mesmas condições não apresentou nenhuma banda de absorção.

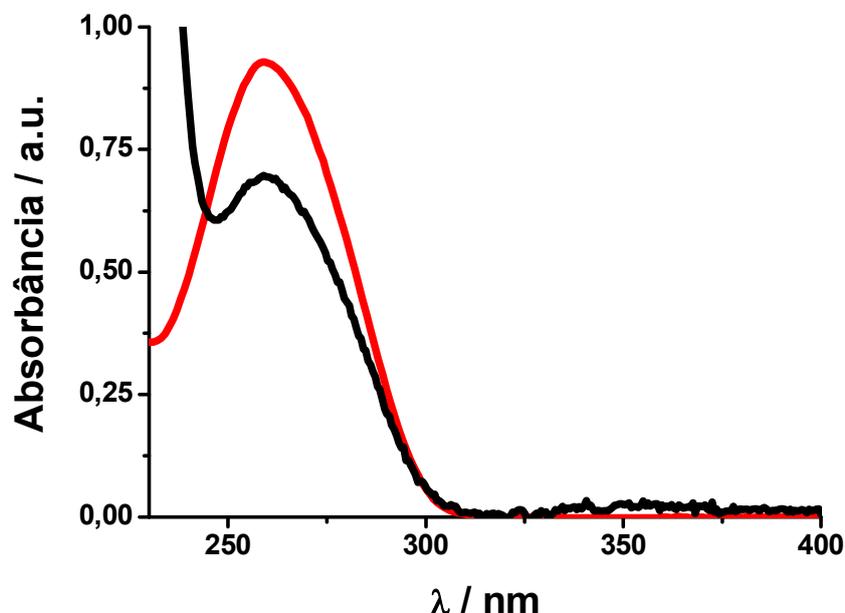


Figura 5.4. Espectros de absorção no UV-Vis, em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, para (—) 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA controlo e (—) imediatamente após a adição de 500 μM MTF à solução de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA.

Por fim, o espectro obtido imediatamente após a adição de 500 μM MTF à solução de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, **Figura 5.4** (—), apresentou uma banda de absorção, $\lambda_{\text{max}} = 260$ nm, com um grande decréscimo na intensidade de absorção, o que corrobora com os resultados obtidos utilizando a técnica eletroquímica no que se diz a respeito do facto da MTF promover uma forte condensação e/ou agregação do dsDNA. Este decréscimo na intensidade de absorção pode ser explicado com a interação MTF-dsDNA que induz a condensação e/ou agregação da dupla hélice de DNA, fazendo com que as ligações π dos anéis heterocíclicos dos nucleotídeos do dsDNA estejam menos disponíveis para efetivas transições $\pi \rightarrow \pi^*$.

5.3.2 *Interação MTF-dsDNA utilizando Biossensores Eletroquímicos de dsDNA*

Durante as experiências eletroquímicas em soluções incubadas de MTF-dsDNA, um filme de rede incompleto de moléculas livres co-adsorvidas de dsDNA e MTF, e do complexo MTF-dsDNA, foram depositados na superfície do GCE [256]. Assim, uma completa cobertura da superfície do eletrodo é importante para evitar a adsorção indesejada destas moléculas e do complexo à superfície do eletrodo.

Os biossensores eletroquímicos de dsDNA foram preparados pela imobilização de multicamadas de dsDNA na superfície do eletrodo [89], *Secção 2.5.2*. Um novo biossensor eletroquímico foi sempre preparado para cada experiência e incubado durante diferentes períodos de tempo, 15, 30 e 60 minutos, em soluções diluídas contendo 0,1 μM MTF, em tampão acetato 0,1 M pH 4,5. Após o término do tempo de incubação os biossensores eletroquímicos de dsDNA foram lavados com água desionizada, a fim de remover as moléculas de MTF que não interagiram, secos sob atmosfera de $\text{N}_{2(\text{g})}$ e transferidos para solução de eletrólito inerte, onde os voltamogramas de DP foram obtidos, **Figura 5.5 (—)**.

O voltamograma de DP para o biossensor eletroquímico de dsDNA controlo apresentou, como esperado, apenas ambos os picos de oxidação dGuo, em $E_{\text{pa}} = +0,99 \text{ V}$, e dAdo, em $E_{\text{pa}} = +1,26 \text{ V}$, **Figura 5.5 (—)**.

O voltamograma de DP após 15 minutos de incubação, em soluções diluídas de 0,1 μM MTF, **Figura 5.5 (—)**, mostrou um decréscimo nas correntes dos picos de oxidação dos resíduos das bases purínicas dGuo e dAdo na cadeia polinucleotídica, devido a interação MTF-dsDNA, e o aparecimento de um novo pico de oxidação, em $E_{\text{pa}} = +0,76 \text{ V}$, quando comparado com os resultados obtidos com o biossensor eletroquímico de dsDNA controlo.

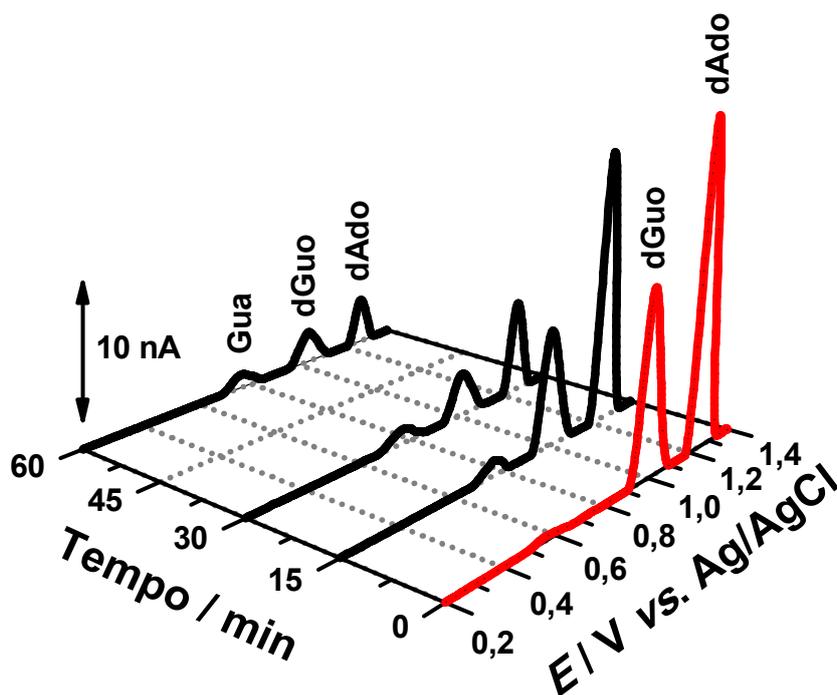


Figura 5.5. Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, para (—) biossensor eletroquímico de dsDNA controle e (—) após a incubação em 0,1 μM MTF durante diferentes períodos de tempo: 15, 30 e 60 minutos, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Considerando que a superfície do eletrodo está completamente recoberta por moléculas de dsDNA e a MTF não tem centros eletroativos que possam ser oxidados, este novo pico é devido à liberação de Gua livre da dupla hélice do DNA, criando um sítio abásico na estrutura do dsDNA, **Figura 5.6**. A ocorrência do pico de Gua livre é explicada considerando que MTF induz uma quebra da ligação entre a Gua e a porção açúcar nos resíduos de guanosina do dsDNA, o que resulta em liberação de Gua, a qual é oxidada a um potencial menor, em $E_{pa} = +0,76 \text{ V}$ [87, 256, 257].

Novos biossensores eletroquímicos de dsDNA foram incubados em soluções diluídas contendo 0,1 μM MTF por períodos de tempos maiores, 30 e 60 minutos, **Figura 5.5** (—). O progressivo decréscimo das correntes dos picos de oxidação dGuo e dAdo de acordo com os tempos de incubação observado, está em conformidade com os resultados obtidos com a interação MTF-dsDNA em soluções incubadas, **Figura 5.3**. A

corrente do pico de oxidação de Gua livre continuou a aumentar com o incremento do tempo de incubação. A específica interação entre os resíduos de dGua e MTF foi evidenciada baseada na ocorrência do pico de oxidação de Gua livre, em $E_{pa} = +0,76$ V, devido à oxidação no carbono C1' da desoxirribose [84, 87, 254] pela MTF que causa a liberação de Gua da estrutura do dsDNA, **Figura 5.6**.

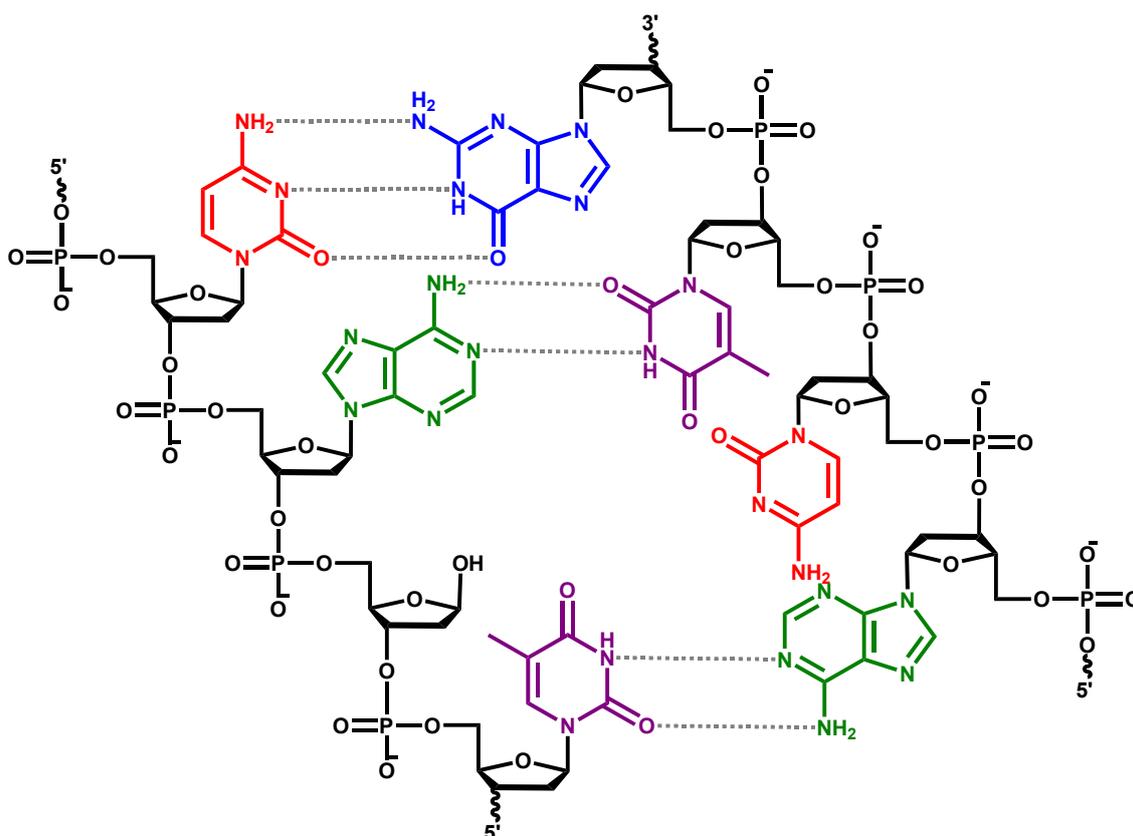


Figura 5.6. Representação esquemática da liberação de Gua livre e a criação do sítio abásico na estrutura da dupla hélice do DNA (adenina em verde, citosina em vermelho, guanina em azul e timina em roxo).

Os resultados obtidos demonstram claramente que a MTF interagiu com dsDNA, nas condições experimentais investigadas, ocasionando uma grande mudança conformacional na estrutura da dupla hélice do DNA e a liberação de Gua livre. Embora o pico de oxidação da Gua livre tenha sido observado, o aparecimento dos picos dos produtos de oxidação da Gua (8-oxoGua) e/ou Ade (2,8-oxoAde), em $E_{pa} = +0,45$ V, [60,

68], os quais correspondem aos danos oxidativos causados ao DNA, não foram eletroquimicamente detetados. Isto significa que a MTF não induziu danos oxidativos ao dsDNA nas condições experimentais utilizadas.

5.3.3 Interação MTF-dsDNA utilizando Biossensores Eletroquímicos de Poly[G] e Poly[A]

Os polihomonucleotídeos poly[G] e poly[A] foram utilizados para preparar biossensores eletroquímicos de poly[G] e poly[A], *Secção 2.5.2*, com o intuito de esclarecer com qual base purínica, Gua ou Ade, uma mais específica e preferencial interação MTF-dsDNA ocorreu, **Figura 5.7** e **Figura 5.9**.

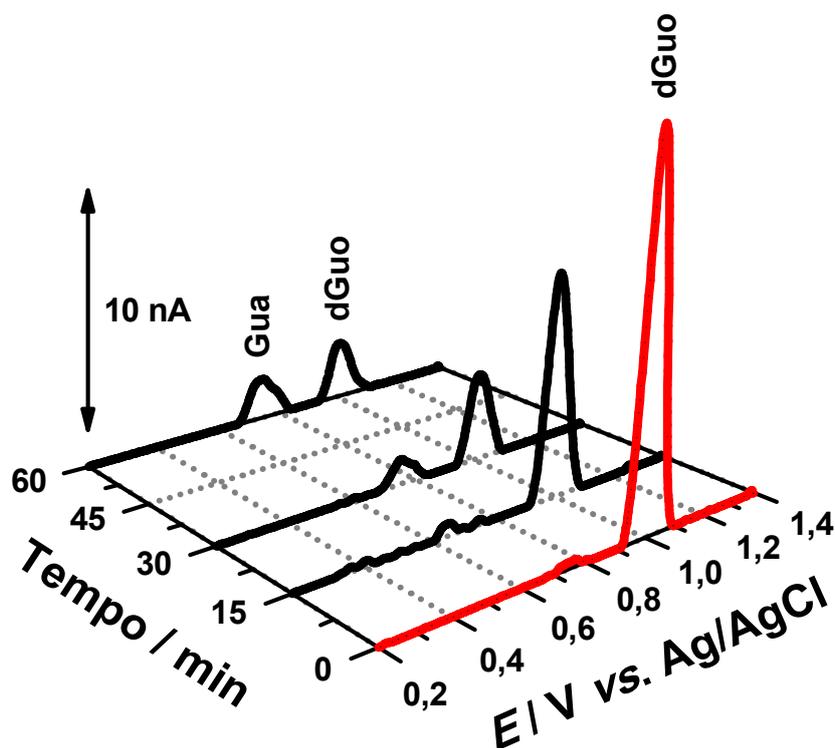


Figura 5.7. Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, para (—) biossensor eletroquímico de poly[G] controle e (—) após a incubação em 0,1 μM MTF durante diferentes períodos de tempo: 15, 30 e 60 minutos, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

O voltamograma de DP do biossensor eletroquímico de poly[G] mostrou um pico, em $E_{pa} = +1,00$ V, correspondente à oxidação de dGuo, **Figura 5.7** (—). O voltamograma de DP obtido utilizando o biossensor eletroquímico de poly[G] após sua incubação por 15 minutos, **Figura 5.7** (—), apresentou o pico de oxidação da dGuo no mesmo potencial que o obtido para o controle, $E_{pa} = +1,00$ V, com um decréscimo na corrente de pico. Também, um pequeno novo pico de oxidação surgiu, em $E_{pa} = +0,74$ V, indicando e confirmando os resultados obtidos utilizando biossensores eletroquímicos de dsDNA, em relação à liberação de bases Gua livres, **Figura 5.8**.

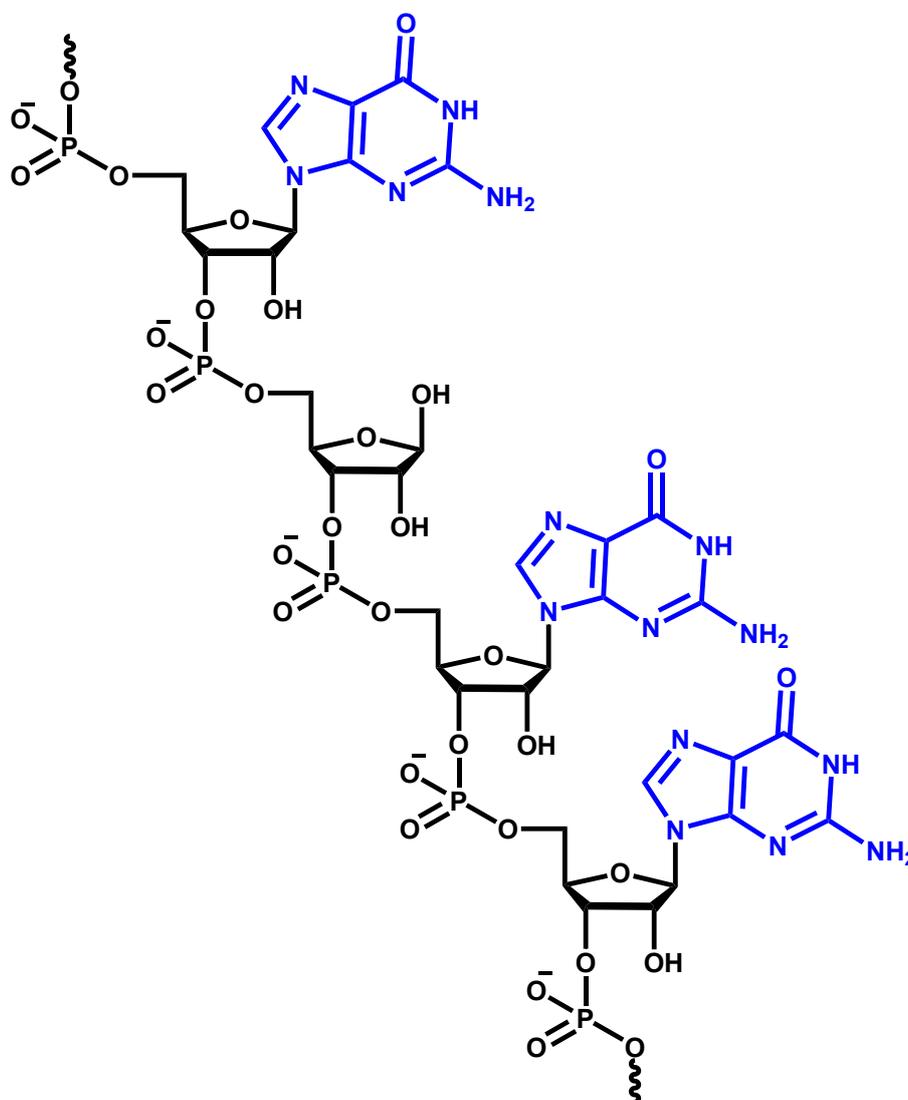


Figura 5.8. Representação esquemática da liberação de Gua livre e a criação do sítio abásico na estrutura do poly[G].

Após maiores tempos de incubação, 30 e 60 minutos, os voltamogramas de DP mostraram um progressivo decréscimo das correntes do pico de oxidação dGuo e um incremento do pico de oxidação de Gua livre com o decorrer do tempo de incubação.

O voltamograma de DP do biossensor eletroquímico de poly[A] controle, **Figura 5.9** (—), apresentou um pico, em $E_{pa} = +1,25$ V, correspondente à oxidação de dAdo. Utilizando novos biossensores eletroquímicos de poly[A], incubações em $0,1 \mu\text{M}$ MTF durante 15, 30 e 60 minutos, foram realizadas. Em seguida os biossensores eletroquímicos de poly[A] foram secos sob atmosfera de $\text{N}_{2(g)}$ e então transferidos para célula eletroquímica com tampão acetato $0,1$ M pH 4,5, onde os voltamogramas de DP foram registados.

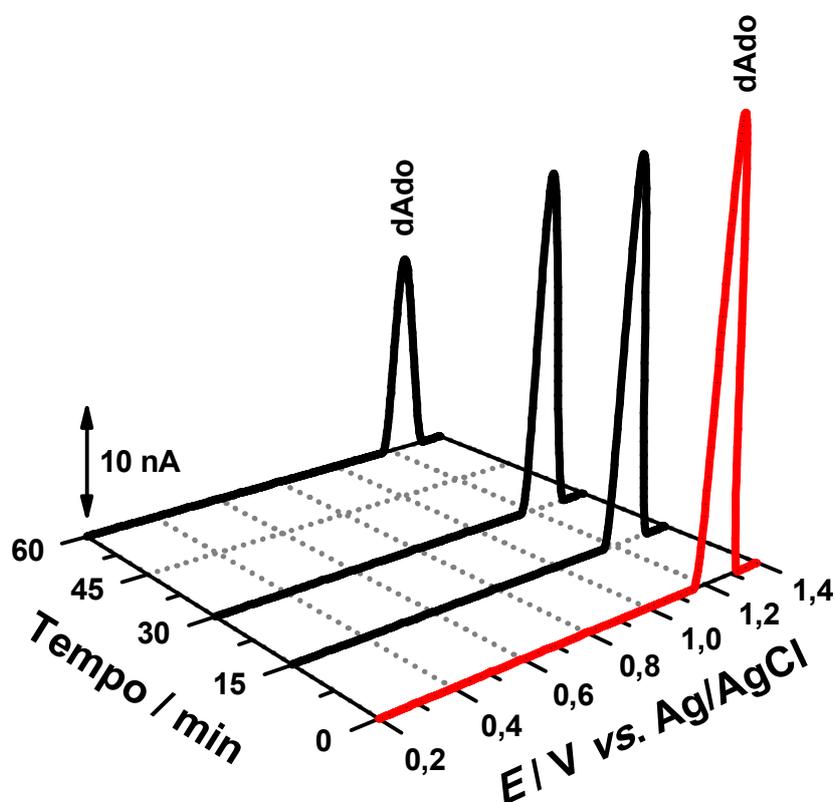


Figura 5.9. Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, em solução tampão acetato $0,1$ M pH 4,5, para (—) biossensor eletroquímico de poly[A] controle e (—) após a incubação em $0,1 \mu\text{M}$ MTF durante diferentes períodos de tempo: 15, 30 e 60 minutos, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Para todos os voltamogramas de DP, apenas um progressivo decréscimo das correntes do pico de oxidação da dAdo foi observado, **Figura 5.9 (—)**, devido às mudanças conformacionais na estrutura do poly[A], com uma menor exposição das bases Ade para oxidação na superfície do GCE.

As experiências utilizando biossensores eletroquímicos de poly[G] e poly[A] confirmaram os resultados obtidos com os biossensores eletroquímicos de dsDNA e revelaram novas importantes informações a fim de compreender o mecanismo molecular envolvendo a interação MTF-dsDNA.

O mecanismo de interação MTF-dsDNA ocorre em duas vias: primeiramente, de forma independente da sequência de dsDNA e ocasionando a condensação/agregação das fitas de DNA, produzindo uma estrutura rígida e complexa de MTF-dsDNA [11, 87], detetado em soluções incubadas, e posteriormente, uma preferencial interação entre os átomos de hidrogênio da Gua no par das bases C–G e MTF, causando a liberação de resíduos de Gua, os quais são oxidados na superfície do GCE [87], detetado utilizando biossensores eletroquímicos de dsDNA e poly[G].

5.4 Considerações Finais

A descoberta de novos fármacos para o tratamento da leishmaniose, uma das mais importantes doenças parasitárias negligenciadas, com opções terapêuticas limitadas e resistência emergente aos fármacos disponíveis, permanece muito importante. O uso de biossensores eletroquímicos de dsDNA traz novas perspectivas para uma melhor compreensão de seus mecanismos de ação, bem como o desenvolvimento e a melhoria na busca de novos agentes antileishmaniais.

A interação MTF-dsDNA foi investigada em soluções incubadas e utilizando biossensores eletroquímicos de dsDNA, e causou modificações na estrutura morfológica do DNA, a qual foi também confirmada utilizando polihomonucleotídeos de guanosina e adenosina, os biossensores eletroquímicos de poly[G] e poly[A]. O mecanismo de interação MTF evidenciou a condensação e/ou agregação das fitas de DNA e a ocorrência de um sítio abásico de Gua na estrutura do dsDNA. Ainda assim, nas condições experimentais utilizadas, a MTF não induziu dano oxidativo ao DNA, uma vez que o pico de oxidação relacionado à presença dos biomarcadores 8-oxoGua e/ou 2,8-oxoAde, em $E_{pa} = +0,45$ V [60, 68], não foi detetado.

CAPÍTULO 6

Antidiabético Metformina

Diabetes é uma doença crónica não transmissível caracterizada pela elevada concentração de glicose no sangue devido ao pâncreas não produzir insulina suficiente para sua regulação ou quando o corpo não consegue utilizar adequadamente a insulina que produz.

De acordo com o primeiro relatório global (2014) da Organização Mundial de Saúde sobre diabetes [258], o número de adultos que vivem com a doença quase quadruplicou desde 1980, para mais de 400 milhões de adultos, e mais de 1,5 milhão de mortes foram ocasionadas em decorrência do diabetes ou do alto nível de açúcar. Em Portugal estima-se que a diabetes afete cerca de 13% da população com idades entre os 20-79 anos, das quais 44% desconhecem ter a doença [259].

Neste capítulo apresentam-se os resultados da investigação da interação *in situ* do antidiabético metformina (MET) com dsDNA, em diferentes períodos de tempo, em soluções incubadas por voltametria de DP e espectrofotometria UV-Vis, e com biossensores eletroquímicos de dsDNA, poly[G] e poly[A] por voltametria de DP.

6.1 Introdução

Diabetes é uma doença grave metabólica crônica que ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente para regular o nível de açúcar (glicose) no sangue formado a partir do alimento consumido pela pessoa, ou quando o corpo não pode efetivamente usar a insulina que produz [260]. A diabetes é um importante problema de saúde pública, sendo uma das quatro doenças não transmissíveis prioritárias (DNTs) voltadas para a ação dos líderes mundiais [261], especialmente por ocasionar ao longo do tempo sérias complicações, como ataques cardíacos, derrame, cegueira, insuficiência renal e amputação dos membros inferiores.

A diabetes tipo I, também conhecida como diabetes insulino dependente, juvenil ou de início na infância, é caracterizada pela produção deficiente de insulina no organismo, o que faz com que as pessoas com diabetes deste tipo administrem diariamente insulina para regular a quantidade de glicose no sangue. A causa da diabetes tipo I não é conhecida e atualmente não é evitável [262].

A diabetes tipo II, chamada também de diabetes não insulino dependente, é a mais comum, sendo responsável por mais de 95% do diabetes em todo o mundo, e ocorre geralmente em adultos quando o corpo se torna resistente à insulina, não produz insulina suficiente ou faz o uso ineficaz. Este tipo de diabetes resulta de uma complexa interação gene-ambiente para a qual vários fatores de risco, como idade, sexo, etnia, histórico familiar, obesidade e hipertensão, são responsáveis [260].

A metformina (*N,N*-dimetilbiguanida, MET), **Figura 6.1**, é um fármaco anti-hiperglicêmico administrado oralmente pra controlar a diabetes tipo II. Embora seja amplamente utilizada em diversos países para controlo da diabete tipo II, também é usada para reduzir colesterol e triglicerídeos, por isso está na primeira linha de escolha para o

tratamento especialmente em pessoas com sobrepeso, gordura e com função renal normal [263].

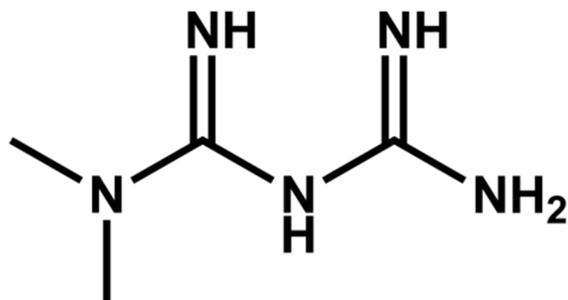


Figura 6.1. Estrutura química da metformina.

Desde a aprovação da MET no Reino Unido e Canadá, em 1958, e nos Estados Unidos da América, em 1995 [264], diversos mecanismos farmacológicos têm sido investigados e descritos, entre eles, sugere-se que a MET atua a diminuir a absorção de glicose pelo intestino, melhorar a captação de glicose periférica, diminuir os níveis de insulina no plasma em jejum e aumentar a sensibilidade a insulina, de forma a reduzir a concentração de glicose no sangue sem causar hipoglicemia [265]. Ademais, a ativação de tirosina-quinases e da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) faz com que a MET iniba a gliconeogênese, aumente o transporte celular de glicose e diminua a produção de glicose hepática, colesterol e síntese de triglicerídeos [266].

A disseminação mundial da MET tem resultado em diversos estudos sobre outras possíveis indicações, os quais evidenciaram que a MET também pode ser usada como agente antineoplásico [267], antienvhecimento [268], protetor cardiovascular [269], neuroprotetor [270] ou como medicamento opcional para síndrome dos ovários policísticos [271].

Embora a MET apresente excelente atividade antidiabética e diversas potencialidades no tratamento de outras doenças, a MET faz parte de um grupo de

contaminantes emergentes, os quais são compostos fortemente candidatos à futura regulamentação devido à sua potencial toxicidade. Os seus efeitos nocivos, uma longa lista de contraindicações, como contaminação e acumulação em águas residuais e a possibilidade de causar desordens endócrinas [272], mostram a importância de estudos relacionados à sua oxidação e quantificação no meio ambiente.

De facto, a MET é depositada no meio ambiente em concentrações relativamente altas [272], devido sua excreção nos lixos pelos pacientes em sua forma ativa e sendo convertida em subprodutos nas estações de tratamento de águas residuais.

Dessa forma, a quantificação das concentrações de MET é de interesse tanto pré-clínico como clínico, na monitorização dos medicamentos terapêuticos de pacientes diabéticos a fim de prevenir a toxicidade e garantir a adesão aos medicamentos prescritos [273]. Diferentes estratégias têm sido desenvolvidas para determinar MET, entre elas destacam-se a condutometria [274], a cromatografia gasosa acoplada a diferentes detetores [275, 276], a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a diferentes detetores [277, 278], a eletroforese capilar [279], a eletroquímica [280-282], a espectroscopia de absorção no UV-Vis [283], no infravermelho [284] e de ressonância magnética nuclear [285] e a extração de fase sólida [286]. Os métodos eletroanalíticos podem apresentar muitas vantagens, como baixo consumo de reagentes, curto tempo de análise, baixo custo da instrumentação, eliminação de processos de separação e extração e uso de reagentes com baixa toxicidade.

A investigação do mecanismo de interação MET-dsDNA também tem a sua importância considerando a possibilidade de melhor compreensão, bem como detecção, das perturbações da estrutura da dupla hélice do DNA e do dano oxidativo do DNA.

Considerando os efeitos adversos da MET, este trabalho teve por objetivo avaliar eletroquimicamente o mecanismo de interação *in situ* MET-dsDNA. Uma investigação

sistemática da interação MET-dsDNA para diferentes períodos de tempo, por voltametria de DP foi feita utilizando duas abordagens, em soluções incubadas e utilizando biossensores eletroquímicos de dsDNA, poly[G] and poly[A]. A interação MET-dsDNA também foi investigada em soluções incubadas utilizando espectrofotometria UV-Vis.

6.2 Estudo Eletroquímico

O comportamento eletroquímico do fármaco antidiabético MET foi investigado utilizando GCE por voltametria cíclica, de DP e de SW em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 contendo 50 μ M MET e em todos os voltamogramas nenhum processo redox relacionado com a oxidação da MET foi observado.

Embora um processo de redução da MET possa ser observado utilizando GCE em solução aquosa, a oxidação da MET foi apenas detetada utilizando elétrodos modificados [282, 287, 288] e catalisadores em solução [289], como iões Cu(II).

6.3 Investigação da Interação MET-dsDNA

6.3.1 Interação MET-DNA em Soluções Incubadas

A interação MET-dsDNA em soluções incubadas foi investigada utilizando voltametria de DP e espectrofotometria UV-Vis, para diferentes períodos de tempo de incubação, a fim de avaliar as possíveis alterações conformacionais na dupla hélice do DNA, o dano oxidativo às bases do dsDNA, bem como o seu mecanismo de interação molecular.

6.3.1.1 Eletroquímica

Com intuito de investigar a habilidade da MET em causar mudanças conformacionais na dupla hélice do DNA, clivagem das ligações de hidrogênio e/ou dano

oxidativo às bases do dsDNA, a interação MET-dsDNA em soluções incubadas foi avaliada.

A investigação eletroquímica da interação MET-dsDNA foi realizada em soluções incubadas contendo $25 \mu\text{M}$ MET e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA em solução tampão acetato $0,1 \text{ M}$ pH $4,5$ utilizando GCE, após diferentes períodos de tempo de incubação, 0, 15, 30, 60 e 120 minutos, **Figura 6.2** (—). Após cada experiência, a superfície do GCE foi submetida ao procedimento de pré-tratamento de acordo com a *Secção 2.4*, a fim de remover todos os produtos de oxidação adsorvidos na superfície do eletrodo e condicionar para a experiência subsequente.

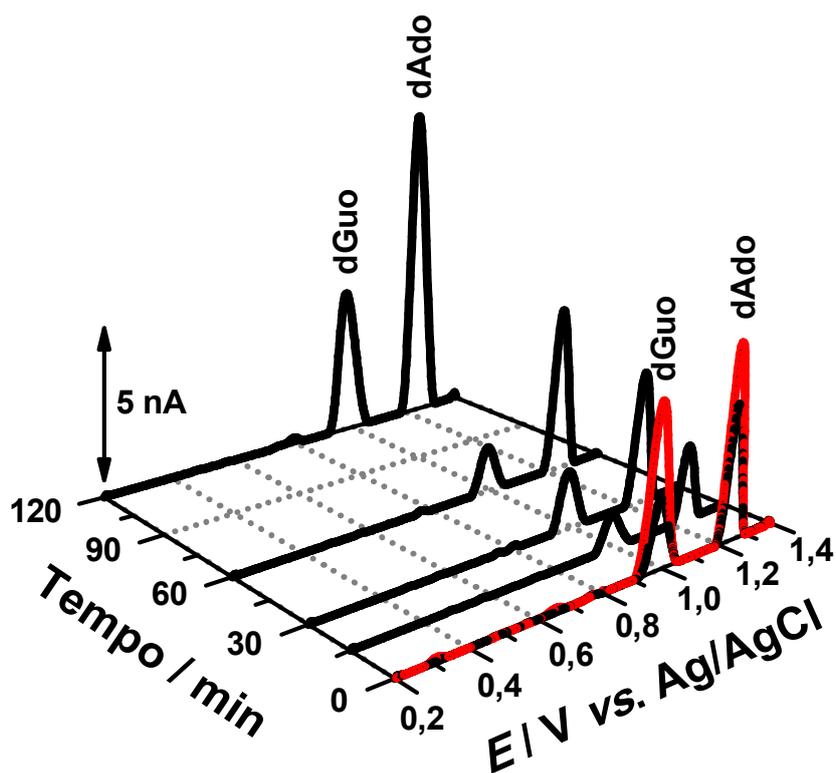


Figura 6.2. Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, em GCE, em solução tampão acetato $0,1 \text{ M}$ pH $4,5$, para (—) $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA controlo e (—) após a incubação de $25 \mu\text{M}$ MET com $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA durante diferentes períodos de tempo: 0, 15, 30, 60 e 120 minutos, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

O voltamograma de DP obtido imediatamente após a adição de 25 μM MET à solução contendo 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, **Figura 6.2 (—)**, apresentou os dois picos de oxidação do dsDNA, dGuo em $E_{\text{pa}} = +0,98$ V e dAdo em $E_{\text{pa}} = +1,25$ V, com um decréscimo na intensidade de ambas as correntes, quando comparado com o voltamograma de DP obtido para a solução de dsDNA controle.

Após 15 minutos de incubação, ambas as correntes dos picos de oxidação do dsDNA continuaram a decrescer, **Figura 6.2 (—)**, o que sugere uma mudança conformacional na estrutura morfológica do dsDNA causada pela interação MET-dsDNA [11, 67, 254]. O decréscimo das correntes dos picos de oxidação do dsDNA pode ser explicado como uma consequência da ligação da MET com dsDNA. Estudos anteriores reportaram a ligação de MET na cadeia menor da dupla fita do DNA [290].

Sendo assim, a interação MET-dsDNA provoca a formação de uma estrutura de dsDNA mais compacta, na qual as bases purínicas estão condensadas, menos expostas e disponíveis para serem oxidadas na superfície do GCE, o que torna mais difícil sua oxidação e faz com que as correntes dos picos de oxidação da dGuo e dAdo diminuam [11, 67, 254, 255].

Com o aumento dos tempos de incubação para 30, 60 e 120 minutos foi observado um incremento progressivo de ambas as correntes dos picos de oxidação da dGuo e dAdo. Este resultado sugere que, para maiores tempos de incubação, a estrutura complexa MET-dsDNA foi estabilizada, provavelmente causando uma distorção local e/ou uma pequena abertura desta estrutura promovida pela interação MET-dsDNA, a qual facilita a oxidação dos resíduos de dGuo e dAdo, uma vez que estão mais expostas à superfície do GCE.

Maiores tempos de incubação foram investigados e nenhuma mudança significativa nas intensidades das correntes dos picos de oxidação do dsDNA e/ou surgimento de novos picos após 120 minutos foram observados.

6.3.1.2 Espectrofotometria UV-Visível

As possíveis mudanças conformacionais na estrutura do dsDNA promovidas pela interação MET-dsDNA também foram avaliadas por espectrofotometria UV-Vis em soluções incubadas. As diferenças nos espectros de absorção de dsDNA foram monitorizadas na ausência e na presença de MET a fim de determinar a influência da interação MET-dsDNA na conformação e morfologia do dsDNA.

Espectros de absorção na região do UV-Vis para soluções controle de 50 μM MET e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, seguido por espectros imediatamente após a adição de 50 μM MET à solução contendo 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA e após 24 horas de incubação, em tampão acetato 0,1 M pH 4,5, **Figura 6.3**, foram registados. Também foram obtidos espectros de UV-Vis para os mesmos tempos de incubação foram registados para as soluções controle de 50 μM MET e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA.

O espectro controle obtido no intervalo de 400 a 230 nm para 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, **Figura 6.3 (—)**, apresentou uma banda de absorção, em $\lambda_{\text{max}} = 260$ nm, atribuída às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ dos anéis heterocíclicos dos nucleotídeos do dsDNA. O espectro controle para 50 μM MET nas mesmas condições, **Figura 6.3 (—)**, apresentou uma banda de absorção, em $\lambda_{\text{max}} = 230$ nm, correspondente às transições $n \rightarrow \pi^*$ dos grupos cromóforos da MET.

O espectro UV-vis obtido imediatamente após a adição de 50 μM MET à solução de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, **Figura 6.3 (—)**, mostrou uma banda de absorção, $\lambda_{\text{max}} = 260$ nm, com um decréscimo na intensidade de absorção, o que corrobora com o facto que,

inicialmente as moléculas de MET ligam-se ao dsDNA devido a forte interação MET-dsDNA. A ligação da MET ao dsDNA e, conseqüentemente, a formação de uma estrutura condensada de MET-dsDNA, dificulta as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ dos anéis heterocíclicos dos nucleotídeos do dsDNA resultando na diminuição da intensidade de absorção.

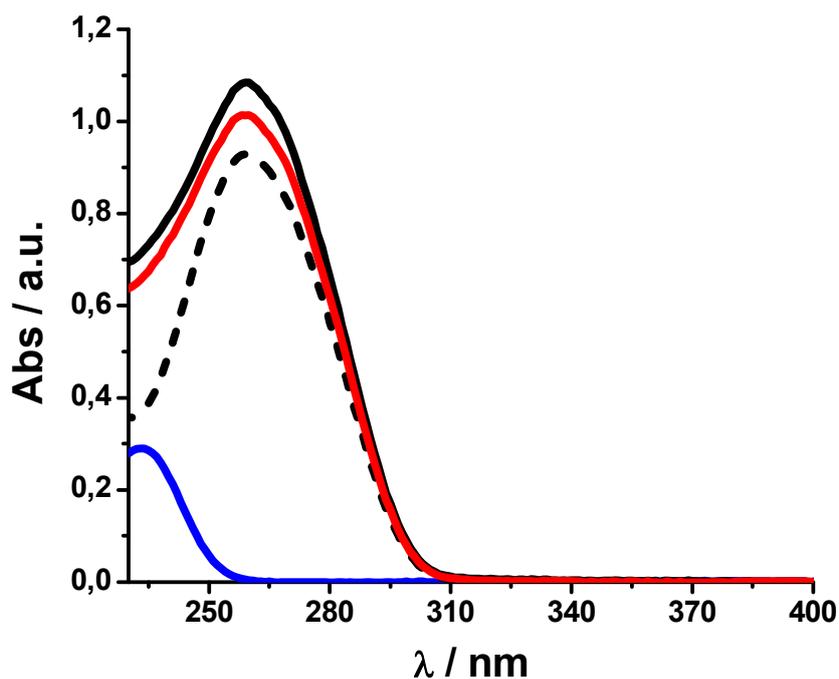


Figura 6.3. Espectros de absorção no UV-Vis, em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, para (—) $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA controle, (—) $50 \mu\text{M}$ MET controle e para soluções incubadas de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA com $50 \mu\text{M}$ MET, em diferentes períodos de tempo: (—) 0 h e (- - -) 24 h.

Por fim, o espectro de absorção UV-vis obtido após a incubação de $50 \mu\text{M}$ MET com $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA por 24 horas, **Figura 6.3** (- - -), apresentou a mesma banda de absorção, em $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$, com um aumento de intensidade de absorção, a qual está em concordância com o efeito de distorção e/ou abertura devido a maior organização conformacional do complexo MET-dsDNA consoante ao tempo de interação.

6.3.2 Interação MET-dsDNA utilizando Biossensores Eletroquímicos de dsDNA

O biossensor eletroquímico de multicamadas de dsDNA foi utilizado para investigar *in situ* e em tempo real, as mudanças ocorridas no dsDNA imobilizado na superfície do GCE durante a interação MET-dsDNA. As mudanças nas correntes dos picos de oxidação das bases purínicas do biossensor eletroquímico de dsDNA após diferentes tempos de incubação foram acompanhadas e comparadas com os resultados obtidos para o biossensor eletroquímico de dsDNA controle nas mesmas condições experimentais.

Os biossensores eletroquímicos de dsDNA utilizados para a investigação da interação MET-dsDNA foram preparados pela imobilização de multicamadas de dsDNA na superfície do eletrodo [89], conforme descrito na *Secção 2.5.2*. Para cada período de tempo de incubação, 15, 30, 60 e 120 minutos, um novo biossensor eletroquímico foi preparado, incubado em 25 μM MET, lavado com água desionizada para remover moléculas de MET que não interagiram, seco sob atmosfera de $\text{N}_{2(\text{g})}$ e transferido para a célula eletroquímica contendo solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, onde os voltamogramas de DP foram obtidos, **Figura 6.4**.

O voltamograma de DP para o biossensor eletroquímico de dsDNA controle apresentou os picos de oxidação da dGuo, em $E_{\text{pa}} = +0,99$ V, e dAdo, em $E_{\text{pa}} = +1,26$ V, **Figura 6.4 (—)**.

Para um novo biossensor eletroquímico de dsDNA incubado em 25 μM MET durante 15 minutos, o voltamograma de DP apresentou um grande decréscimo na intensidade de corrente dos picos de oxidação dos resíduos das bases purínicas dGuo e dAdo na cadeia polinucleotídica do dsDNA, devido a interação *in situ* MET-dsDNA. O

resultado observado para este biossensor foi similar ao resultado obtido com a interação MET-dsDNA em soluções incubadas por 0 e 15 minutos, **Figura 6.4.** (—).

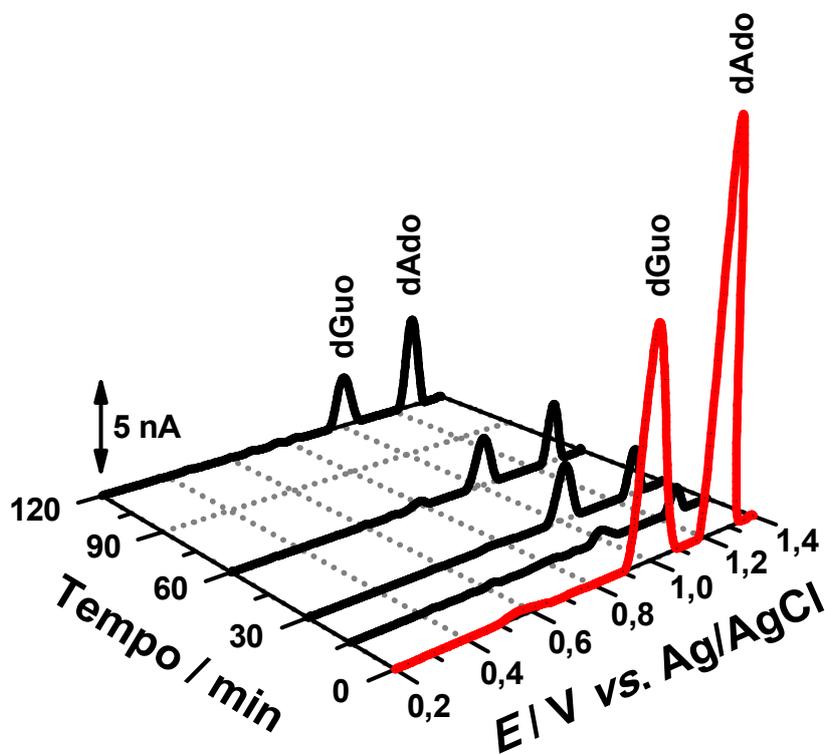


Figura 6.4. Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, para (—) biossensor eletroquímico de dsDNA controle e (—) após a incubação em MET 25 μM durante diferentes períodos de tempo: 15, 30, 60 e 120 minutos, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

O grande decréscimo na intensidade de corrente dos picos de oxidação do dsDNA deve-se a uma forte ligação da MET nos sulcos menores da dupla hélice do DNA. Devido à ligação MET-dsDNA, a oxidação das bases purínicas torna-se mais difícil uma vez que estão empilhadas no interior de uma estrutura mais rígida sendo impedidas de interagir com a superfície do eléctrodo, resultando na diminuição do sinal eletroquímico numa fase inicial.

Novos biossensores eletroquímicos de dsDNA foram incubados em MET por períodos de tempos maiores, 30, 60 e 120 minutos, **Figura 6.4** (—). O voltamograma de DP obtido para o biossensor eletroquímico de dsDNA incubado por 30 minutos

apresentou um aumento significativo para ambas as correntes dos picos de oxidação do dsDNA. Para os biossensores eletroquímicos de dsDNA incubados por 60 e 120 minutos, a corrente do pico de oxidação da dGuo manteve-se semelhante a corrente obtida para o biossensor eletroquímico de dsDNA incubado por 30 minutos, enquanto um progressivo aumento na corrente do pico de oxidação da dAdo foi observado.

O aumento das correntes dos picos de oxidação da dGuo e dAdo conforme os tempos de incubação, mesmo que ainda com intensidades de correntes menores comparados com os resultados do biossensor eletroquímico de dsDNA controle, está em conformidade com os resultados obtidos para os mesmos tempos com a interação MET-dsDNA em soluções incubadas, **Figura 6.2 (—)**. Este efeito pode ser atribuído a estabilização da estrutura complexa MET-dsDNA, causando uma distorção e/ou pequena abertura desta estrutura para maiores tempos de incubação.

6.3.3 Interação MET-dsDNA utilizando Biossensores Eletroquímicos de Poly[G] e Poly[A]

A interação MET-dsDNA também foi avaliada por voltametria de DP utilizando biossensores eletroquímicos dos polihomonucleotídeos poly[G] e poly[A], **Figura 6.5 e Figura 6.6**, a fim de obter informações sobre a interação preferencial da MET-dsDNA. Para cada experiência um novo biossensor eletroquímico de poly[G] e de poly[A] foi preparado, como descrito na *Secção 2.5.2*, e incubado em 25 μM MET por diferentes períodos de tempo; 15, 30, 60 e 120 minutos.

O voltamograma de DP obtido para o biossensor eletroquímico de poly[G] controle mostrou o pico de oxidação referente à oxidação das moléculas de guanosina, da unidade monomérica do poly[G], em $E_{pa} = +0,99 \text{ V}$, **Figura 6.5 (—)**. Após a incubação de um novo biossensor eletroquímico de poly[G] em MET por 15 minutos, o

voltamograma de DP apresentou o pico de oxidação da dGuo com um decréscimo na intensidade de corrente semelhante ao observado para o pico de oxidação da dGuo do biossensor eletroquímico de dsDNA. Após maiores tempos de incubação em MET, 30, 60 e 120 minutos, os voltamogramas de DP apresentaram um progressivo incremento na intensidade de corrente para o pico de oxidação da dGuo, **Figura 6.5 (—)**.

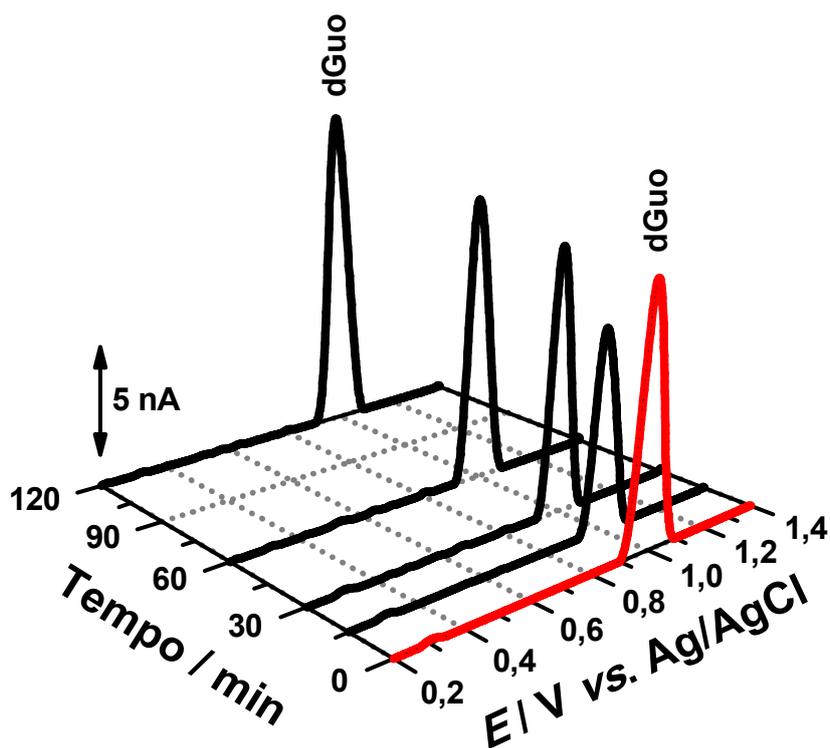


Figura 6.5. Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, para (—) biossensor eletroquímico de poly[G] controle e (—) após a incubação em 25 μM MET durante diferentes períodos de tempo: 15, 30, 60 e 120 minutos, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

O voltamograma de DP obtido para o biossensor eletroquímico de poly[A] antes da incubação em MET, **Figura 6.6 (—)**, apresentou o pico de oxidação, em $E_{\text{pa}} = +1,25 \text{ V}$, referente à oxidação das moléculas de adenosina, da unidade monomérica do poly[A]. Utilizando novos biossensores eletroquímicos de poly[A], incubações em 25 μM MET durante 15, 30, 60 e 120 minutos foram realizadas, **Figura 6.6 (—)**.

Para o biossensor eletroquímico de poly[A] incubado por 15 minutos, o voltamograma de DP apresentou um expressivo decréscimo, seguido por um progressivo incremento na intensidade de corrente do pico de oxidação da dAdo, para maiores tempos de incubação, devido a uma possível preferencial interação entre a MET e os átomos de hidrogénio da adenina no par das bases A–T.

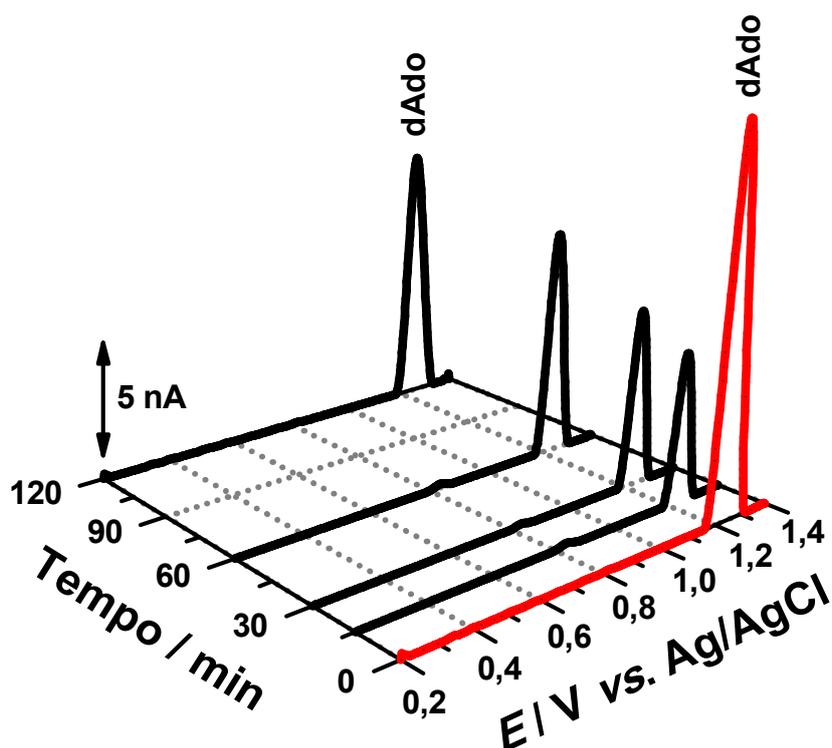


Figura 6.6. Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, para (—) biossensor eletroquímico de poly[A] controle e (—) após a incubação em 25 μ M MET durante diferentes períodos de tempo: 15, 30, 60 e 120 minutos, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

As experiências utilizando biossensores eletroquímicos de poly[G] e poly[A] também evidenciaram informações complementares para esclarecer e melhor compreender o mecanismo molecular envolvido na interação MET-dsDNA.

Em pH 4,5, o poly[G] apresenta uma mistura de configurações de fita simples, fita dupla e G-quadruplexos, **Figura 6.7**, enquanto o poly[A] apresenta uma mistura de

configurações de fita simples e dupla, devido a resíduos Ade estarem parcialmente protonados que são capazes formar ligações duplas AH^+-AH^+ [291].

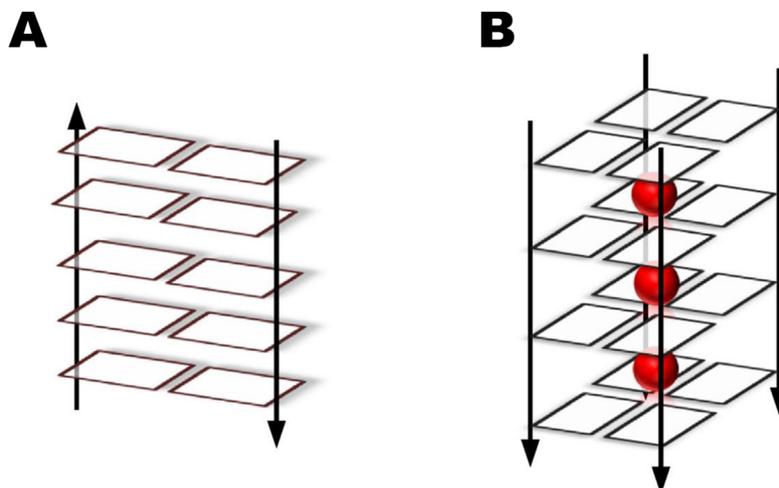


Figura 6.7. Representação esquemática da configuração de (A) fita dupla e (B) G-quadruplex [291].

As experiências usando biossensores eletroquímicos de poly[G] e poly[A] confirmaram, para o tempo de incubação mais curto, **Figura 6.5** e **Figura 6.6** (—) 15 minutos, a ligação da MET nos sulcos menores do poly[G] e poly[A] de simples e dupla hélice, deixando os resíduos de dGuo e dAdo na parte mais interior da estrutura e causando o decréscimo das correntes dos picos de oxidação da dGuo e dAdo, quando comparado com os controles, **Figura 6.5** e **Figura 6.6** (—). Assim, após maiores tempos de incubação maiores, **Figura 6.5** e **Figura 6.6** (—) 30, 60 e 120 minutos, as estruturas rígidas do complexos MET-poly[G] e MET-poly[A] são estabilizadas, causando uma distorção local e/ou uma pequena abertura das estruturas secundárias de poly[G] e poly[A], que se reflete no ligeiro aumento das correntes dos pico de oxidação da dGuo e dAdo, devido à maior exposição das bases purinas à superfície do eletrodo.

Por fim, o mecanismo de interação MET-dsDNA pode ser descrito em duas etapas consecutivas: primeiramente, para tempos curtos, a ligação de moléculas de MET

nos sulcos menores da dupla hélice do DNA, seguido pela estabilização do complexo MET-dsDNA, o qual causa uma distorção local e/ou uma pequena abertura desta estrutura. Esta estrutura rígida de MET-dsDNA [11, 87] apresenta uma possível preferência na interação entre a MET e os átomos de hidrogénio da adenina no par das bases A–T na ligação das moléculas de MET com dsDNA.

6.4 Considerações Finais

Devido a MET ser considerada um composto preocupante, dada a sua vasta utilização, persistência e presença ambiental em todo o mundo, mais investigações sobre seus potenciais impactos ambientais, bem como seus impactos no desenvolvimento biológico, devem ser realizadas. A utilização de biossensores eletroquímicos de dsDNA pode auxiliar no entendimento do seu mecanismo de ação, bem como no mecanismo de mutação endócrino, possibilitando então busca de novos agentes antidiabéticos que não ocasionem os mesmos efeitos adversos.

A interação MET-dsDNA foi investigada em soluções incubadas por voltametria de DP e espectrofotometria UV-Vis e utilizando biossensores eletroquímicos de multicamadas de dsDNA, poly[G] e poly[A] por voltametria de DP. De acordo com os resultados obtidos, a interação MET-dsDNA propiciou mudanças conformacionais na estrutura do dsDNA. O mecanismo de interação MET-dsDNA ocorre pela ligação da MET nos sulcos menores do dsDNA, seguido pela distorção local e/ou abertura da estrutura do complexo MET-dsDNA. Todavia, o pico atribuído à oxidação da 8-oxoGua e/ou 2,8-oxoAde não foi detetado, sugerindo que, nas condições experimentais utilizadas, a MET não promoveu dano oxidativo basal ao DNA.

CAPÍTULO 7

Anticorpo Monoclonal Anticancro Nivolumab

O cancro é uma das doenças mais preocupantes a nível global, sendo a segunda maior causa de mortes, responsável por mais de 9 milhões de mortos em 2016 [292]. Em Portugal, o número de casos existentes chegou a mais de 150 mil pessoas, resultando em aproximadamente 29 mil mortes nos últimos cinco anos, conforme sinalizado em 2019 pela Agência Internacional de Pesquisa em Cancro da Organização Mundial de Saúde [293].

Neste capítulo o estudo eletroquímico do anticorpo monoclonal anticancro nivolumab (NIVO) em sua forma nativa e desnaturada é inicialmente apresentado, seguido pela investigação *in situ* de sua interação com dsDNA em soluções incubadas por voltametria de DP, espectrofotometria UV-Vis e eletroforese em gel, e com biossensores eletroquímicos de dsDNA por voltametria de DP, espectroscopia de impedância eletroquímica e microbalança de cristal de quartzo. Biossensores eletroquímicos de poly[G] e poly[A] também foram utilizados para investigar a interação do NIVO com as sequências de polihomonucleotídeos por voltametria de DP.

7.1 Introdução

Cancro é o nome dado para um grande grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento desordenado de células anormais que podem invadir tecidos e órgãos, e/ou disseminarem-se (desenvolver metástases) para outras regiões do corpo. Quase qualquer parte do corpo pode ser afetada pelo cancro, o qual tem muitos subtipos anatómicos e moleculares, e cada um requer estratégias específicas de tratamento.

Diversos tipos de tratamento são utilizados para combater o cancro e cada um deles depende do tipo de cancro e da sua evolução. O tratamento pode ser único ou em combinação, como cirurgia com quimioterapia e/ou radioterapia. Além disso, imunoterapia, terapia direcionada ou terapia hormonal são opções viáveis para tratar vários tipos de cancro.

A imunoterapia é uma estratégia muito importante e bem-sucedida, devido à sua alta especificidade e às suas propriedades terapêuticas menos tóxicas e mais eficazes, na qual o sistema imunológico do corpo é usado para induzir resposta antitumoral e, assim, combater a doença [294]. Vários tipos de imunoterapia têm sido utilizados no tratamento do cancro, como a transferência celular adotiva [295], inibidores de pontos de verificação imunológico [296], vírus oncolíticos [297], vacinas [298], anticorpos monoclonais [299] e outros.

Entre estes, os anticorpos monoclonais (mAbs) têm atraído a atenção devido aos seus mecanismos de ação clinicamente relevantes. Os anticorpos monoclonais são produzidos a partir de um único clone de linfócitos B e têm afinidade monovalente, uma vez que se ligam especificamente ao mesmo epitopo do antígeno [300].

Entre os mAbs, destaca-se o nivolumab (NIVO, nome comercial OPDIVO®), **Figura 7.1**, um anticorpo monoclonal humano de imunoglobulina G4 (IgG4) (HumAb), que se liga aos recetores de morte programada-1 (PD-1) e bloqueia as interações com

PD-L1 e PD-L2 [301]. O recetor PD-1 é um regulador negativo da atividade das células T que demonstrou estar envolvido no controlo das respostas imunitárias das células T. A ligação do recetor PD-1 aos ligandos PD-L1 e PD-L2, que são expressos em células apresentadoras de antígenos e podem ser expressos por células tumorais ou outras células no microambiente tumoral, resulta na inibição da proliferação de células T e secreção de citocina. O NIVO aumenta as respostas das células T, incluindo respostas antitumorais, através do bloqueio da ligação do PD-1 aos ligandos PD-L1 e PD-L2. Em testes com ratos, o bloqueio da atividade PD-1 resultou na diminuição do crescimento do tumor.

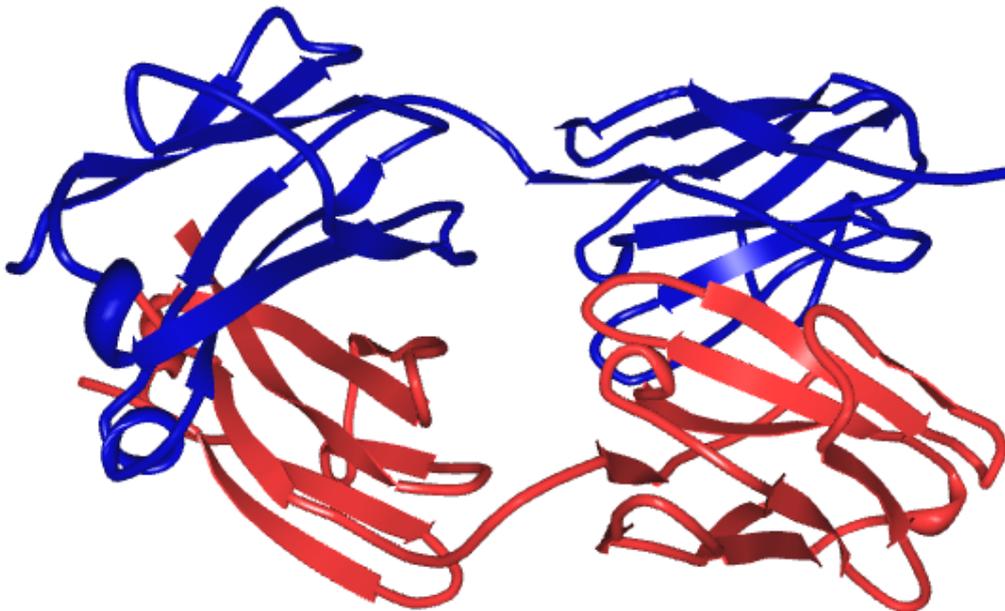


Figura 7.1. Estrutura cristalina do anticorpo monoclonal do fragmento Fab NIVO, cadeia leve em azul e cadeia pesada em vermelho (estrutura PDB ID: 5GGQ [165, 166]).

NIVO é um medicamento intravenoso primeiramente aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA em 2014 para o tratamento de melanoma avançado (irressecável ou metastático), seguido pela aprovação para o tratamento de cancro de pulmão de não pequenas células, carcinoma de células renais, carcinoma de células

escamosas da cabeça e pescoço, carcinoma urotelial e, mais recentemente, Linfoma de Hodgkin [302-304].

O anticorpo monoclonal NIVO é produzido em células de ovário de hamster chinês por fermentação em biorreator de uma linhagem celular recombinante. A estrutura química consiste em duas cadeias pesadas idênticas com 440 aminoácidos cada, e duas cadeias leves *kappa* idênticas com 214 aminoácidos cada, que são ligadas através de ligações dissulfeto inter-cadeias, com massa molecular equivalente a 146 kDa [302].

A estrutura primária do anticorpo monoclonal NIVO [161], com o total de 1737 aminoácidos, tem 20 resíduos de aminoácidos diferentes, dos quais apenas 140 aminoácidos são eletroativos: tirosina (Tyr, 54 resíduos) [105, 106], triptofano (Trp, 24 resíduos) [105, 109], cisteína (Cys, 32 resíduos) [104, 108], histidina (His, 20 resíduos) [105] e metionina (Met, 10 resíduos) [104, 108].

Embora os anticorpos monoclonais sejam uma estratégia bem sucedida, as células cancerígenas estão em constante mutação, o que muitas vezes leva à resistência ou falha na resposta ao alvo da terapia [305]. Assim, mais estudos são necessários, seja para o desenvolvimento de novos anticorpos monoclonais, para análises qualitativas e quantitativas em proteômica de domínios proteicos individuais e proteínas mutantes, como também para uma melhor compreensão de seus mecanismos de ação.

A eletroquímica direta de proteínas nativas e desnaturadas em superfícies sólidas utilizando métodos voltamétricos é uma importante ferramenta, pois pode elucidar o mecanismo de transferência de elétrons em um sistema biológico e possibilitar o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos em diferentes campos, como biotecnologia e monitoramento ambiental [306].

Considerando a constante descoberta e desenvolvimento de novos anticorpos monoclonais, bem como o potencial das técnicas eletroquímicas para um melhor

entendimento dos mecanismos de ação e oxidação, o estudo eletroquímico do NIVO é muito importante e oportuno, pois é um medicamento imunoterápico relativamente novo, que tem sido cada vez mais utilizado no tratamento de diferentes tipos de cancro.

Em uma outra perspectiva, a investigação da interação entre os mAbs, usados na terapia do cancro, e o DNA, tem grande importância para entender a atividade biológica dos mAbs e sua toxicidade *in vivo*. Embora os mAbs tenham uma alta afinidade por seu epitopo, o local específico do antígeno o qual eles se ligam, pouca atenção tem sido dada ao estudo da interação dos mAbs com o DNA. A investigação da interação anticancro mAbs-DNA oferece uma oportunidade para compreender os mecanismos de ligação e afinidade do DNA ao fármaco antineoplásico, bem como as possíveis implicações no dano da estrutura morfológica do DNA causado pela interação com mAbs [307].

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo, primeiramente, investigar o comportamento de oxidação na eletroquímica direta do NIVO nativo e desnaturado em GCE, e subsequentemente, avaliar a interação NIVO-dsDNA.

Para o estudo do comportamento eletroquímico do NIVO, três abordagens foram utilizadas com o auxílio da voltametria de DP: (i) NIVO nativo em solução, (ii) um filme espesso com multicamadas de NIVO nativo adsorvido em GCE, e (iii) um filme espesso com multicamadas de NIVO desnaturado adsorvido em GCE. Com o objetivo de caracterizar o comportamento interfacial e a adsorção do filme espesso com multicamadas de NIVO nativo e desnaturado sobre a superfície do GCE, realizaram-se experiências de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica.

Para avaliar a interação NIVO-dsDNA, uma investigação sistemática foi realizada: (i) NIVO e dsDNA em soluções incubadas, por voltametria de DP, espectrofotometria UV-Vis e eletroforese em gel; e (ii) *in situ* NIVO incubado com os

biossensores eletroquímicos de dsDNA, poly[G] ou poly[A], por voltametria de DP, EIS e microbalança de cristal de quartzo, por diferentes períodos de tempo.

7.2 Estudo Eletroquímico

7.2.1 Oxidação Eletroquímica do NIVO Nativo em Solução

Primeiramente, a oxidação eletroquímica do NIVO nativo, em GCE, foi investigada por voltametria de DP em soluções contendo diferentes concentrações de NIVO. O voltamograma de DP obtido para $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ NIVO, em tampão acetato $0,1 \text{ M}$ pH 4,5, **Figura 7.2**, mostrou dois picos de oxidação.

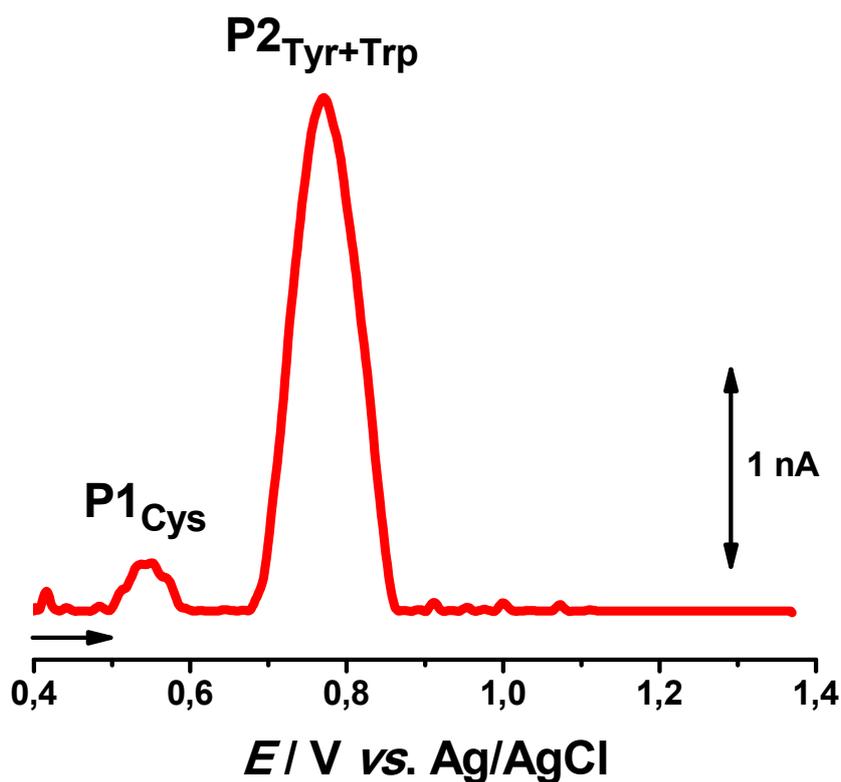


Figura 7.2. Voltamograma de DP, com linha de base corrigida, em GCE, para $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ NIVO nativo, em tampão acetato $0,1 \text{ M}$ pH 4,5, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

O primeiro pico corresponde ao primeiro pico de oxidação dos resíduos de aminoácidos da cisteína, P1_{Cys}, em $E_{P1} = +0,55 \text{ V}$ [108], e o segundo pico, P2_{Tyr+Trp}, em

$E_{P2} = +0,77$ V, corresponde a oxidação dos resíduos de aminoácidos tirosina [308-311] e ao primeiro pico de oxidação dos resíduos de aminoácidos triptofano [109, 310, 311].

A influência do pH na oxidação eletroquímica do NIVO nativo foi investigada em um amplo intervalo de pH, utilizando o GCE, em diferentes eletrólitos inertes com força iônica 0,1 M, por voltametria de DP, e nenhum pico de oxidação para $\text{pH} > 9,0$ foi observado. Os voltamogramas de DP mostraram um deslocamento dos potenciais de pico dos resíduos de aminoácidos cisteína, tirosina e triptofano para potenciais mais negativos com o aumento do pH. As correntes de pico do NIVO nativo com baixas intensidades, observadas nos voltamogramas de DP, mostram claramente a grande dificuldade dos processos de transferência de elétrons na estrutura morfológica terciária e quaternária dobrada do NIVO.

7.2.2 Oxidação Eletroquímica do Filme Espesso com Multicamadas de NIVO Nativo Adsorvido em GCE

A oxidação eletroquímica do NIVO nativo adsorvido em GCE foi também estudada por voltametria de DP em eletrólitos inertes tampão no intervalo $3,0 < \text{pH} < 9,0$, com força iônica de 0,1 M, utilizando um filme espesso com multicamadas de NIVO nativo adsorvido na superfície do GCE, *Secção 2.8.2, Figura 7.3 (A)*.

Similarmente aos voltamogramas de DP obtidos em GCE com NIVO nativo em solução, **Figura 7.2**, os voltamogramas de DP para o filme espesso com multicamadas de NIVO nativo adsorvido em GCE, **Figura 7.3 (A)**, apresentaram os mesmos dois picos de oxidação para todos os pHs estudados.

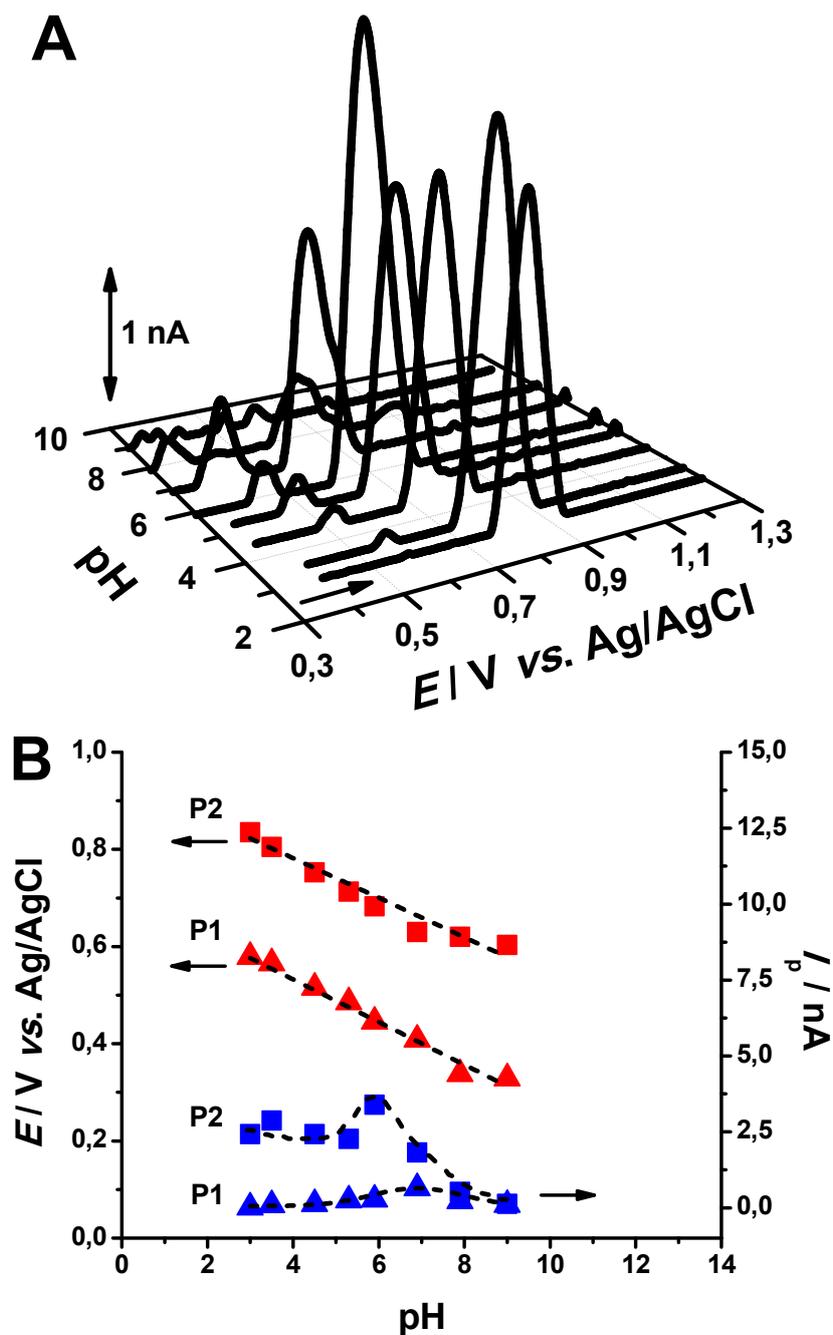


Figura 7.3. (A) Voltamogramas de DP em 3D, com linha de base corrigida, para o filme espesso com multicamadas de NIVO nativo adsorvido em GCE, em eletrólitos inertes com diferentes valores de pH, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Gráfico da variação de (\blacktriangle) E_{p1} e da (\blacktriangle) I_{p1} do pico P1_{Cys} e (\blacksquare) E_{p2} e (\blacksquare) I_{p2} do pico P2_{Tyr+Trp}.

Com o aumento do pH, os potenciais foram deslocados para valores mais negativos e a corrente de pico mais alta foi obtida em tampão acetato 0,1 M pH 6,0, **Figura 7.3 (A)**. O aumento das correntes de pico pode ser explicado, considerando que a orientação da molécula, na superfície hidrofóbica do GCE, causa um aumento na

adsorção dos resíduos de aminoácidos cisteína, em $E_{P1} = +0,45$ V, e de tirosina e triptofano, em $E_{P2} = +0,68$ V, tornando esses resíduos de aminoácidos mais acessíveis para serem oxidados na superfície do eletrodo e, assim, aumentando as correntes dos picos de oxidação em pH 6,0.

Para $3,0 < \text{pH} < 9,0$, ambos os picos $P1_{\text{Cys}}$ e $P2_{\text{Tyr+Trp}}$ apresentaram uma dependência linear com o pH (~ 59 mV/pH), **Figura 7.3 (B)**, mostrando a existência de um equilíbrio ácido-base, no qual o processo eletroquímico envolve um número igual de prótons e elétrons no mecanismo de oxidação dos resíduos de aminoácidos eletroativos. Também, considerando que a largura do pico a meia-altura, $W_{1/2} \sim 90/n$, onde n é o número de elétrons, ambas as reações de oxidação envolvem um próton e um elétron, o qual está de acordo com o mecanismo de oxidação dos resíduos de aminoácidos Cys [108], Tyr [309] e Trp [109].

Considerando ambos os potenciais dos picos de oxidação, $P1_{\text{Cys}}$ and $P2_{\text{Tyr+Trp}}$, e que o pico de oxidação com maior intensidade de corrente foi obtido em pH 6,0, todas as experiências subsequentes foram realizadas utilizando tampão acetato 0,1 M pH 6,0.

7.2.3 Oxidação Eletroquímica do Filme Espesso com Multicamadas de NIVO Desnaturado Adsorvido em GCE

Embora todos os aminoácidos eletroativos, cisteína, tirosina, triptofano, histidina e metionina [161, 165, 166] estejam presentes na estrutura terciária e quaternária do NIVO não é possível que todos atinjam a superfície do eletrodo, por esta razão os resultados obtidos evidenciaram uma dificuldade nos processos de transferência de elétrons dos resíduos de aminoácidos das regiões mais internas do NIVO. Na estrutura 3D do NIVO, os aminoácidos estão organizados de acordo com a

polaridade/hidrofobicidade, o que torna muito difícil o contato entre os resíduos de aminoácidos eletroativos mais internos com a superfície hidrofóbica do GCE.

A desestabilização de proteínas ocorre em soluções contendo agentes desnaturantes, como ureia, SDS, TCEP ou DTT, **Figura 7.4**, os quais são normalmente usados em procedimentos eletroforéticos com o intuito de desestabilizar e desdobrar as estruturas proteicas [159]. Os processos de desnaturação provocam alterações morfológicas na estrutura 3D das proteínas, que se desdobram e cobrem a superfície do eletrodo, possibilitando uma melhor detecção da oxidação eletroquímica dos resíduos de aminoácidos eletroativos [164, 310-312].

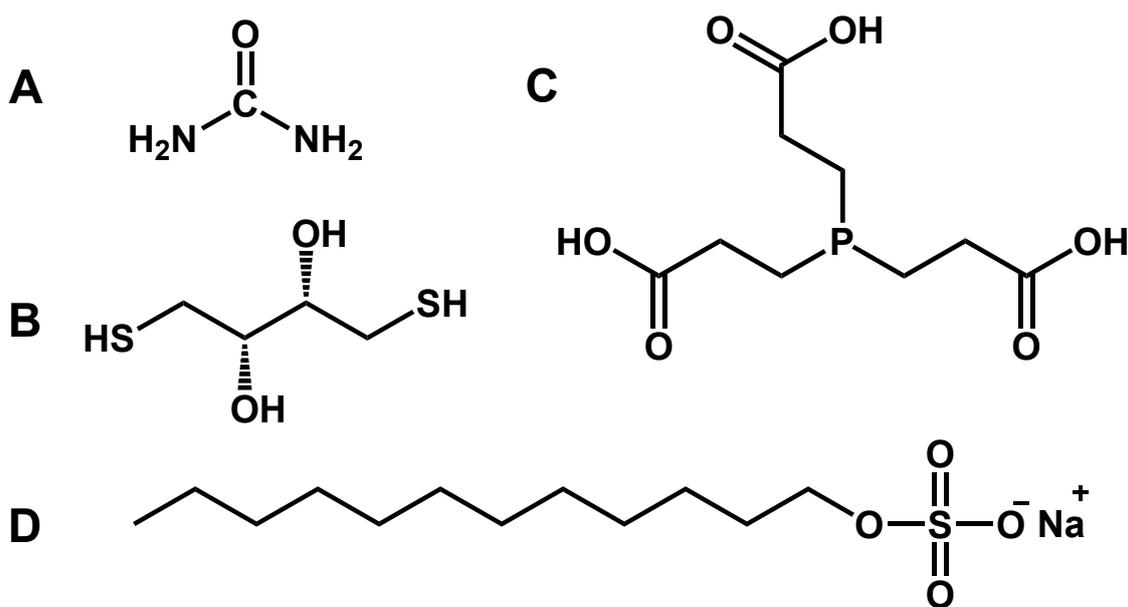


Figura 7.4. Representação esquemática da estrutura química dos agentes desnaturantes; (A) Ureia, (B) DTT, (C) TCEP e (D) SDS.

A fim de investigar o mecanismo de oxidação do filme espesso com multicamadas de NIVO desnaturado imobilizado em GCE, utilizou-se sempre um novo filme espesso com multicamadas de NIVO adsorvido em GCE para cada experiência. A imobilização do filme espesso com multicamadas de NIVO em GCE assegurou uma cobertura total da superfície, como revelado nas experiências EIS, *Secção 7.2.5*, a qual

evita a adsorção não específica e a ligação das moléculas desnaturantes à superfície do elétrodo.

As alterações antes e após a incubação do filme espesso com multicamadas de NIVO adsorvido em GCE nos agentes desnaturantes, 6 M ureia, 50 mM SDS, 50 mM TCEP ou 10 mM DTT, em tampão acetato 0,1 M pH 6,0, foram avaliadas em diferentes períodos de tempo: 30, 60, 120 e 180 minutos. Cada filme espesso com multicamadas de NIVO desnaturado adsorvido em GCE foi então lavado com água desionizada, para remover o excesso de desnaturante, e somente depois os voltamogramas DP foram registados, **Figura 7.5**.

Entre os quatro agentes desnaturantes usados, ureia e SDS não são eletroativos, apenas TCEP e DTT apresentam comportamento eletroquímico na superfície do GCE [235]. Voltamogramas de DP foram obtidos para os agentes redutores em tampão acetato 0,1 M pH 6,0 e mostraram um pico de oxidação, para TCEP, em $E_{TCEP} = +0,97$ V, e para DTT, em $E_{DTT} = +1,09$ V.

De modo a identificar claramente os novos picos de oxidação ocorridos após a desnaturação, voltamogramas de DP controlo para o GCE incubado em 6 M urea, 50 mM SDS, 50 mM TCEP ou 10 mM DTT, em tampão acetato 0,1 M pH 6,0, foram obtidos para os mesmos intervalos de tempo e sob as mesmas condições experimentais.

O filme espesso com multicamadas de NIVO desnaturado adsorvido em GCE após incubação em ureia mostrou o desaparecimento do pico de oxidação da Cys, P_{1Cys} , em $E_{P1} = +0,45$ V, e um aumento da corrente do pico de oxidação dos resíduos de aminoácidos Tyr e Trp, $P_{2Tyr+Trp}$, em $E_{P2} = +0,70$ V, com o tempo de incubação, sem o aparecimento de novos picos de oxidação do NIVO, **Figura 7.5 (A)**.

A ureia enquanto agente desnaturante liga-se às áreas polarizadas com carga na proteína, tais como grupos peptídicos, e enfraquece as ligações intermoleculares e as

interações nativas, afetando a estrutura proteica secundária e terciária sem afetar a estrutura primária [313], causando um aumento da corrente do pico de oxidação dos resíduos de aminoácidos Tyr, devido ao seu melhor acesso à superfície do GCE.

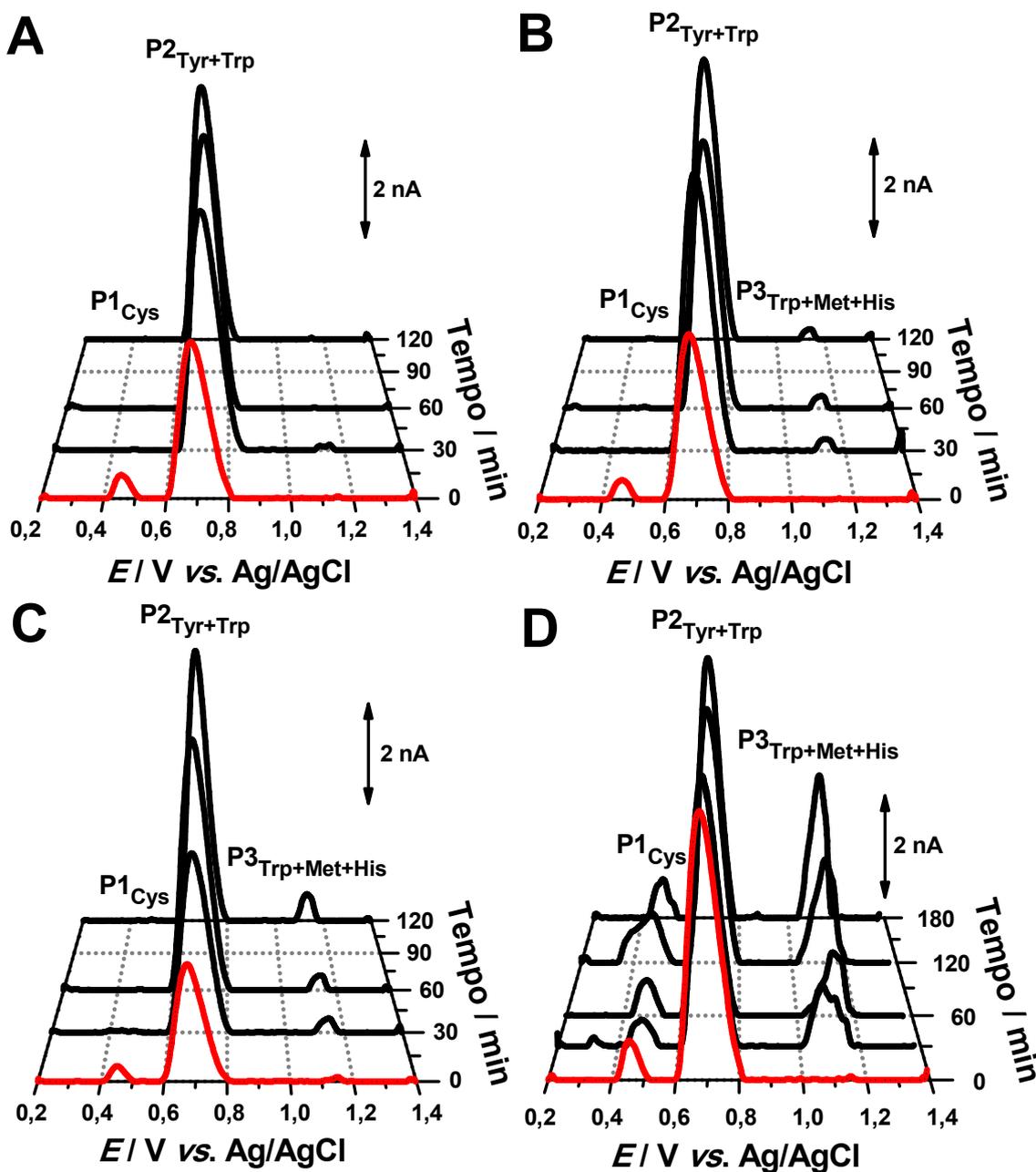


Figura 7.5. Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, para o filme espesso com multicamadas de NIVO adsorvido em GCE, em tampão acetato 0,1 M pH 6,0: (—) nativo e (—) desnaturado em (A) 6 M ureia, (B) 50 mM SDS, (C) 50 mM TCEP e (D) 10 mM DTT, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

O voltamograma de DP para o filme espesso com multicamadas de NIVO desnaturado adsorvido em GCE, após incubação em SDS, **Figura 7.5 (B)**, quando comparado com o controlo, apresentou também o desaparecimento do pico de oxidação da Cys. Também foi detetado um grande aumento da corrente do pico de oxidação dos resíduos de aminoácidos Tyr e Trp, $P2_{\text{Tyr+Trp}}$, em $E_{P2} = +0,70$ V, e um novo pico de oxidação após 30 minutos de incubação, o qual corresponde ao segundo pico de oxidação dos resíduos de aminoácidos Trp e à oxidação dos aminoácidos Met e His, $P3_{\text{Trp+Met+His}}$, em $E_{P3} = +1,13$ V. A corrente do pico de oxidação dos resíduos de aminoácidos Tyr e Trp, $P2_{\text{Tyr+Trp}}$, continuou a aumentar durante 60 e 120 minutos de incubação, enquanto a corrente do novo pico de oxidação, $P3_{\text{Trp+Met+His}}$, permaneceu constante. O processo de desnaturação causado por SDS ocorre ligando-se à cadeia proteica com sua cauda de hidrocarboneto, expondo regiões normalmente mais internas e revestindo a cadeia proteica com moléculas de surfactante [314].

O TCEP e o DTT são agentes redutores de proteínas que interrompem as ligações dissulfeto, impedindo a formação dessas ligações intramoleculares e intermoleculares entre os resíduos de aminoácidos de cisteína e metionina das proteínas [235].

Os voltamogramas de DP do filme espesso com multicamadas de NIVO desnaturado adsorvido em GCE, obtido após a incubação em TCEP, **Figura 7.5 (C)**, mostraram novamente o desaparecimento do pico de oxidação da Cys, $P1_{\text{Cys}}$, um grande e progressivo aumento na corrente do pico de oxidação dos resíduos de aminoácidos Tyr e Trp, $P2_{\text{Tyr+Trp}}$, em $E_{P2} = +0,68$ V, e também o aparecimento de um novo pico, com um pequeno aumento na corrente, $P3_{\text{Trp+Met+His}}$, em $E_{P3} = +1,12$ V, correspondente ao segundo pico de oxidação dos resíduos de aminoácidos Trp e a oxidação dos aminoácidos Met e His. O potencial de pico correspondente à oxidação do Trp, Met e His, $P3_{\text{Trp+Met+His}}$, em $E_{P3} = +1,12$ V, é mais positivo que o potencial do pico de oxidação do TCEP controlo,

em $E_{TCEP} = +0,97$ V, o que garante que o novo pico, $P3_{Trp+Met+His}$, é o resultado da desnaturação do filme espesso com multicamadas de NIVO pelo agente redutor TCEP.

Por fim, o voltamograma de DP para o filme espesso com multicamadas de NIVO adsorvida em GCE após a incubação em DTT mostrou, **Figura 7.5 (D)**, um aumento da corrente do pico de oxidação dos resíduos de aminoácidos Cys, $P1_{Cys}$, em $E_{P1} = +0,49$ V, um aumento na corrente do pico da oxidação dos resíduos de aminoácidos Tyr e Trp, $P2_{Tyr+Trp}$, em $E_{P2} = +0,68$ V, e também o aparecimento de um novo pico, que aumentou progressivamente com o tempo de incubação, $P3_{Trp+Met+His}$, em $E_{P3} = +1,11$ V, atribuído à oxidação dos resíduos de aminoácidos Trp, Met e His. Também, é possível que este pico tenha alguma contribuição da oxidação de DTT, em $E_{DTT} = +1,09$ V, tendo em consideração a proximidade de sua oxidação com a oxidação dos resíduos de aminoácidos do NIVO.

De acordo com estes resultados, o agente redutor de DTT promoveu claramente um desdobramento mais extenso da estrutura morfológica do NIVO, o que tornou os resíduos de aminoácidos alocados no interior da estrutura mais expostos à superfície do GCE, de modo que pudessem ser mais facilmente oxidados. Uma maior interação, uma vez que todas as correntes de pico aumentaram, correspondendo ao desdobramento da estrutura 3D do NIVO, também pôde ser observada com o tempo de incubação, o que indica que ocorreu uma maior desnaturação do NIVO pelo agente redutor DTT.

7.2.4 CV do Filme Espesso com Multicamadas de NIVO Nativo e Desnaturado Adsorvido em GCE

Os filmes espessos com multicamadas de NIVO foram imobilizados na superfície do GCE, *Secção 2.8.2*, e usados para investigar a oxidação eletroquímica do

NIVO nativo e desnaturado immobilizado na superfície do GCE, **Figura 7.3** e **Figura 7.5**, por voltametria de DP.

Os filmes espessos com multicamadas de NIVO nativo e desnaturado adsorvidos em GCE também foram eletroquimicamente caracterizados por voltametria cíclica, usando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ como sonda redox, **Figura 7.6**. A imobilização dos filmes espessos de NIVO na superfície do GCE causam alterações na corrente de pico e no potencial do processo redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ nos voltamogramas cíclicos, as quais estão relacionados com o valor da constante de transferência de elétrões.

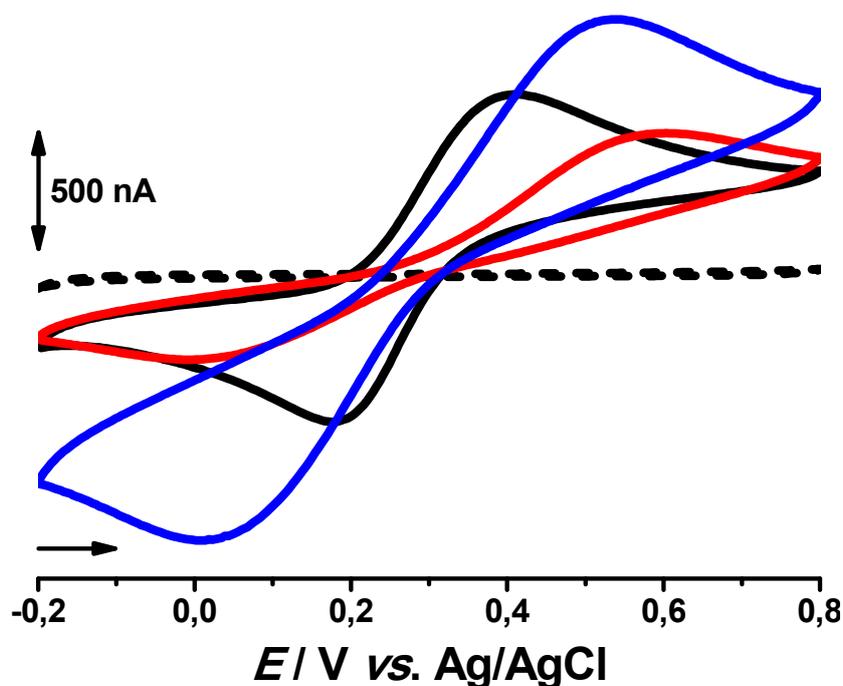


Figura 7.6. Voltamogramas cíclicos, em tampão acetato 0,1 M pH 6,0, obtido com o (- - -) GCE não modificado, (—) GCE não modificado em 1,0 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e filme espesso com multicamadas de NIVO (—) nativo e (—) desnaturado adsorvidos em GCE em 1,0 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

O voltamograma cíclico numa solução de 1,0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ registrado com uma superfície limpa do GCE em tampão acetato 0,1 M pH 6,0, **Figura 7.6** (—), apresentou um processo redox *quasi-reversível*, com uma separação entre os potenciais de pico de $\Delta E_p \sim 238 \text{ mV}$.

No entanto, o voltamograma cíclico obtido nas mesmas condições com o filme espesso de multicamadas de NIVO nativo adsorvido em GCE mostrou que o processo de oxidação e redução do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ se tornou irreversível e os picos foram deslocados para potenciais mais positivos e negativos, quando comparados com o voltamograma cíclico registado com o GCE não modificado, resultando em uma separação entre os potenciais de pico de $\Delta E_p \sim 610 \text{ mV}$, **Figura 7.6 (—)**.

O voltamograma cíclico para o filme espesso de multicamadas de NIVO adsorvido em GCE após a desnaturação em DTT foi também obtido em tampão acetato 0,1 M pH 6,0 contendo 1,0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, o qual revelou um processo redox irreversível para a sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ com uma separação entre os potenciais de pico de $\Delta E_p \sim 532 \text{ mV}$, **Figura 7.6 (—)**.

A fim de determinar eletroquimicamente a área eletroativa da superfície do GCE limpo, voltamogramas cíclicos foram realizados em solução tampão acetato 0,1 M pH 6,0 contendo 1,0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, para diferentes velocidades de varrimento entre 5 e 100 mV s^{-1} . Com o aumento das velocidades de varrimento, as correntes de pico aumentaram linearmente com $\nu^{1/2}$, comportamento característico de um processo de oxidação controlado por difusão [137], de acordo com a equação de Randles-Sevcik, $I_{pa} (\text{A}) = 2,69 \times 10^5 n (\alpha_c n')^{1/2} A [\text{R}]_{\infty} D_0^{1/2} \nu^{1/2}$, e a área eletroativa do GCE foi estimada em $A = 1,20 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$.

A influência da velocidade de varrimento no processo redox do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ foi também investigada utilizando o filme espesso com multicamadas de NIVO nativo adsorvido em GCE pelo registo de voltamogramas cíclicos em tampão acetato 0,1 M pH 6,0 a velocidades de varrimento entre 5 e 100 mV s^{-1} . Ambas as correntes dos picos anódicos e catódicos aumentaram linearmente com $\nu^{1/2}$, indicando um processo redox controlado por difusão [137].

A concentração de espécie eletroativa na superfície do GCE modificado com o filme espesso com multicamadas de NIVO nativo foi determinada a partir do voltamograma cíclico obtido em solução tampão à baixa velocidade de varrimento (5 mV s^{-1}), de acordo com a relação teórica [315]:

$$\Gamma = \frac{Q}{n F A}$$

onde Γ representa a concentração de espécie eletroativa (mol cm^{-2}), Q a carga obtida a partir da integral da área dos valores de corrente de pico anódico em função do tempo de varrimento com correção de linha base (C), n o número de elétrons transferidos no processo redox ($n = 1$), F a constante de Faraday ($96485,3399 \text{ C mol/e}^{-}$) e A a área eletroativa do GCE ($1,20 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$). Dessa forma, a concentração de NIVO na superfície do GCE foi estimada em $9,52 \times 10^{-7} \text{ mol cm}^{-2}$, o que está de acordo com um filme espesso com multicamadas.

7.2.5 EIS do Filme Espesso com Multicamadas de NIVO Nativo e Desnaturado Adsorvido em GCE

A técnica de EIS é uma importante ferramenta no monitoramento das mudanças nas propriedades interfaciais na superfície do eletrodo/solução [146], na investigação dos processos de transferência de massa e cinética da adsorção na superfície, e no fornecimento de informações complementares à voltametria cíclica, *Secção 7.2.4*, assim tem sido usada para a caracterização interfacial de várias superfícies de eletrodos [316] e eletrodos modificados com moléculas biológicas [148, 317].

Para caracterizar o GCE não modificado, o filme espesso com multicamadas de NIVO nativo e após sua desnaturação adsorvidos em GCE, experiências de EIS foram efetuadas, em $E_{ap} = +0,25 \text{ V}$, o qual corresponde ao potencial formal das espécies redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ obtido pelo potencial de meia-onda, em tampão acetato $0,1 \text{ M}$

pH 6,0, para diferentes concentrações de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, conforme descrito na *Secção 2.13*.

Os espectros de EIS no plano complexo para o GCE não modificado, **Figura 7.7 (A)**, mostraram um semicírculo correspondente à ocorrência do processo de transferência de elétron, com uma resistência de transferência de carga (R_{ct}), representada pelo diâmetro do semicírculo, menor do que aquele obtido para a superfície do GCE com filme espesso com multicamadas de NIVO nativo adsorvido, **Figura 7.7 (B)**. Os maiores valores de R_{ct} obtidos usando o filme espesso com multicamadas de NIVO nativo adsorvido em GCE eram esperados, uma vez que as moléculas NIVO imobilizadas na superfície do GCE bloqueiam a transferência de elétron entre a sonda redox e a superfície do GCE.

Os espectros de EIS no plano complexo obtidos para o filme espesso com multicamadas de NIVO adsorvido em GCE após a desnaturação em DTT, **Figura 7.7 (C)**, mostraram uma resistência de transferência de carga maior que a obtida para o GCE não modificado, uma vez que as moléculas de NIVO adsorvidas na superfície do eletrodo dificultam a transferência de elétron, e uma menor resistência de transferência de carga do que a obtida para o filme espesso com multicamadas de NIVO nativo adsorvido em GCE, uma vez que a transferência de elétron após a desnaturação do NIVO na superfície do eletrodo é mais fácil devido ao desdobramento da estrutura morfológica do NIVO, como mencionado na *Secção 7.2.3*.

Por fim, tanto para o GCE não modificado, como para o filme espesso com multicamadas de NIVO nativo e desnaturado adsorvidos em GCE, os valores de R_{ct} diminuíram com o aumento da concentração de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, como suposto.

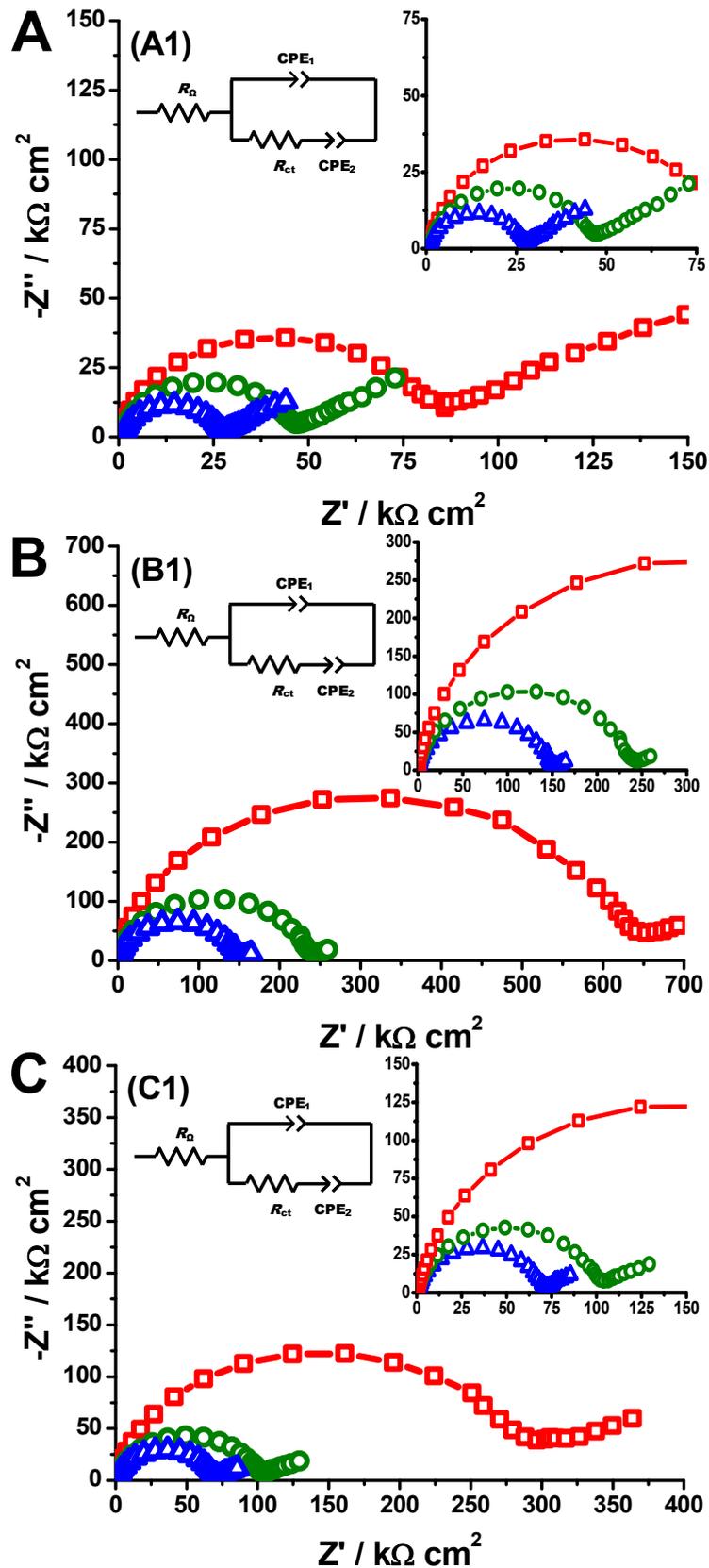


Figura 7.7. Espectros de EIS no plano complexo, em tampão acetato 0,1 M pH 6,0 para \square 1,0, \circ 3,0 and \triangle 5,0 mM $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$, com a aplicação de potencial, $E_{ap} = +0,25$ V: (A) GCE não modificado, filme espesso com multicamadas de NIVO (B) nativo e (C) desnaturado adsorvido em GCE; (A1), (B1) e (C1) circuitos elétricos equivalentes usados nos ajustes dos dados de EIS.

A modelação dos espectros de EIS no plano complexo foi feita de acordo com um circuito elétrico equivalente do tipo Randles, **Figura 7.7 (A1), (B1) e (C1)**. No circuito, R_{Ω} corresponde à resistência da célula, CPE_1 ao elemento de fase constante, R_{ct} à resistência de transferência de carga através da interface da superfície do eléctrodo e CPE_2 a um novo elemento de fase constante. O CPE foi modelado como um condensador não ideal [36], dado por $CPE = -(Ci\omega)^{-\alpha}$, onde C é a capacitância, que descreve a separação de carga da dupla camada na interface eléctrodo-solução, ω é a frequência em rad s^{-1} e o expoente α é devido à heterogeneidade da superfície ($0,5 < \alpha < 1$).

Os resultados das EIS foram ajustados aos circuitos eléctricos equivalentes apropriados, para o GCE não modificado, e para o filme espesso com multicamadas de NIVO nativo e desnaturado adsorvido no GCE. Os valores obtidos para os parâmetros equivalentes do circuito eléctrico estão resumidos na **Tabela 7.1**.

7.3 Investigação da Interação NIVO-dsDNA

7.3.1 Interação NIVO-dsDNA em Soluções Incubadas

A interação NIVO e dsDNA em soluções incubadas foi investigada utilizando voltametria de DP, espectrofotometria UV-Vis e eletroforese em gel, para diferentes períodos de tempo de incubação, com intuito de avaliar o risco causado pelo mAb NIVO ao DNA, como alterações conformacionais na dupla hélice do DNA, quebra das ligações de hidrogénio e/ou dano oxidativo às bases do dsDNA.

Tabela 7.1. Parâmetros de Randles obtidos para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ a partir dos espectros de EIS no plano complexo para o GCE não modificado, filme espesso com multicamadas de NIVO nativo e desnaturado adsorvido em GCE.

Superfície do eletrodo	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4/3}$ (mM)	R_Ω ($\Omega \text{ cm}^2$)	CPE_1 ($\mu\text{F cm}^{-2} \text{ S}^{\alpha-1}$)	α_1	R_{ct} ($\text{k}\Omega \text{ cm}^2$)	CPE_2 ($\mu\text{F cm}^{-2} \text{ S}^{\alpha-1}$)	α_2
GCE	1,0	642 ± 13	$0,24 \pm 0,01$	$0,92 \pm 0,01$	75 ± 10	43 ± 10	$0,43 \pm 0,06$
	3,0	1072 ± 11	$0,22 \pm 0,01$	$0,92 \pm 0,01$	43 ± 10	106 ± 10	$0,48 \pm 0,03$
	5,0	1067 ± 12	$0,21 \pm 0,01$	$0,92 \pm 0,01$	25 ± 10	173 ± 14	$0,46 \pm 0,03$
Filme espesso com multicamadas de NIVO nativo adsorvido em GCE	1,0	527 ± 22	$0,19 \pm 0,01$	$0,93 \pm 0,01$	604 ± 50	29 ± 10	$0,36 \pm 0,40$
	3,0	571 ± 56	$0,17 \pm 0,02$	$0,95 \pm 0,02$	98 ± 10	40 ± 10	$0,20 \pm 0,75$
	5,0	1054 ± 10	$0,21 \pm 0,01$	$0,93 \pm 0,01$	25 ± 10	172 ± 10	$0,46 \pm 0,02$
Filme espesso com multicamadas de NIVO desnaturado adsorvido em GCE	1,0	634 ± 10	$0,332 \pm 0,01$	$0,90 \pm 0,01$	269 ± 10	34 ± 10	$0,45 \pm 0,05$
	3,0	548 ± 32	$0,318 \pm 0,01$	$0,90 \pm 0,01$	97 ± 10	100 ± 10	$0,43 \pm 0,23$
	5,0	759 ± 10	$0,308 \pm 0,01$	$0,90 \pm 0,01$	67 ± 10	171 ± 10	$0,43 \pm 0,03$

7.3.1.1 Eletroquímica

A interação NIVO-dsDNA em solução foi acompanhada eletroquimicamente pela comparação das alterações nos picos de oxidação do dsDNA, dGuo e dAdo, na ausência e na presença do NIVO, pelo monitoramento da ocorrência de picos de oxidação da Gua e Ade livres, e dos biomarcadores 8-oxoGua e 2,8-oxoAde, as bases purinas dos produtos de oxidação da Gua e Ade.

O comportamento eletroquímico dos controles de NIVO e dsDNA foi estudado por voltametria de DP em tampão acetato 0,1 M, pH 4,5, a fim de possibilitar a identificação dos picos de oxidação ocorridos após a interação NIVO-dsDNA em solução. Após cada medição, a superfície do GCE foi sempre limpa e condicionada, conforme o procedimento descrito na *Secção 2.4*, para remover todos os produtos de oxidação adsorvidos na superfície do eletrodo.

O voltamograma de DP para $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA controle apresentou dois picos correspondentes à oxidação da dGuo, em $E_{pa} = +0,98 \text{ V}$, e dAdo, em $E_{pa} = +1,25 \text{ V}$, **Figura 7.8 (—)**. O voltamograma de DP obtido para NIVO controle apresentou dois picos de oxidação, **Figura 7.8 (—)**. O primeiro pico corresponde ao primeiro pico de oxidação dos resíduos de aminoácidos da cisteína, $P1_{Cys}$, em $E_{p1} = +0,55 \text{ V}$ [108], e o segundo pico, $P2_{Tyr + Trp}$, corresponde à oxidação da tirosina [309-311]. e o primeiro pico de oxidação dos resíduos de aminoácidos do triptofano [109, 310, 311], em $E_{p2} = +0,77 \text{ V}$.

O voltamograma de DP obtido após a adição de uma solução concentrada de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ NIVO à solução de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA apresentou imediatamente um grande decréscimo para ambas as correntes dos picos de oxidação da dGuo e dAdo, com quase desaparecimento, quando comparadas com a solução de dsDNA controle.

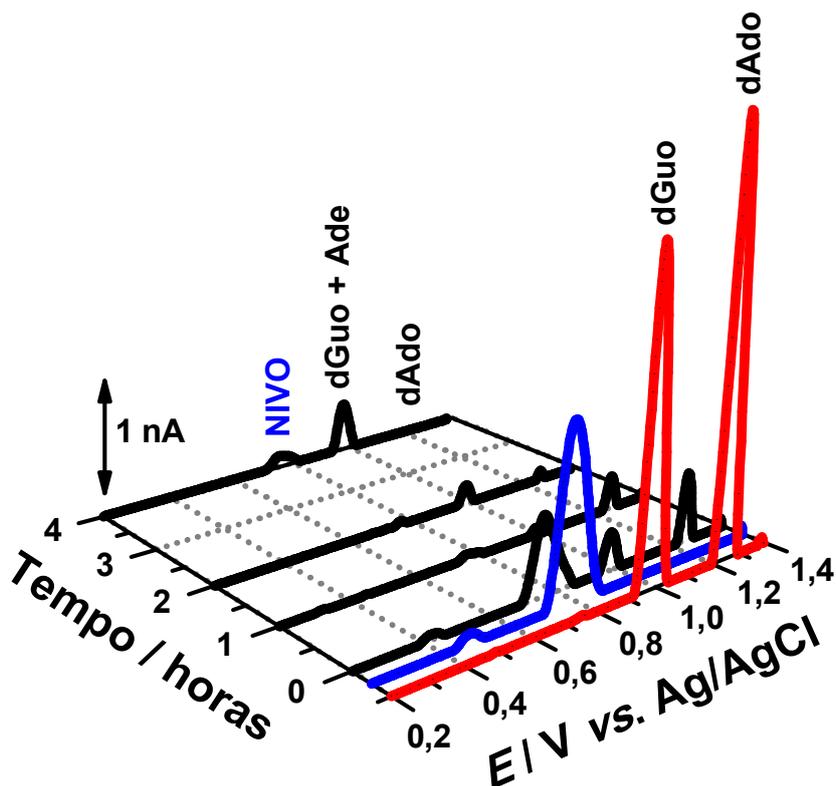


Figura 7.8. Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, para (—) $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA controle, (—) $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ NIVO controle e (—) após a incubação de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA com $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ NIVO durante diferentes períodos de tempo: 0, 15, 30 e 60 minutos, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Nesse sentido, a concentração de NIVO foi reduzida para $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ e o efeito da interação NIVO-dsDNA em solução ao longo do tempo foi investigado para melhor compreensão do mecanismo de interação. O voltamograma da DP obtido após a adição de uma solução diluída de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ NIVO à solução de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA mostrou uma forte diminuição dos picos de oxidação da dGuo e dAdo e dois novos picos de oxidação, **Figura 7.8** (—), correspondentes à oxidação do NIVO, o primeiro pico de oxidação dos resíduos de aminoácidos cisteína, $P1_{\text{Cys}}$, em $E_{\text{pa}} = +0,42 \text{ V}$ [108], e o segundo à oxidação dos resíduos de aminoácidos tirosina [308-311] e o primeiro pico de oxidação dos resíduos de aminoácidos triptofano, $P2_{\text{Tyr+Trp}}$, $E_{\text{pa}} = +0,76 \text{ V}$ [109, 310, 311]. Após 1 hora de incubação, as correntes dos picos de oxidação do dsDNA e do NIVO

continuaram a diminuir e o primeiro pico de oxidação do resíduo de cisteína, P1_{Cys}, desapareceu completamente.

A grande diminuição nas correntes dos picos de oxidação do dsDNA observados após a interação NIVO-dsDNA, em tempos mais curtos, demonstrou claramente que uma mudança conformacional na estrutura do dsDNA ocorreu [38-40]. A diminuição das correntes de pico de oxidação do dsDNA corresponde à ligação do NIVO à dupla hélice do DNA através de interações proteína-fosfatos do DNA, o que promove a formação de um complexo rígido de NIVO-dsDNA. Como consequência, as bases purinas do DNA ficaram embebidas na estrutura mais compacta de dsDNA e estão menos exposta à superfície do GCE, o que faz com que as correntes dos picos de oxidação da dGuo e dAdo diminuam, já que o acesso destas ao GCE é mais difícil [11, 254, 255, 318].

O pequeno deslocamento para potenciais menos positivos do pico de oxidação da Cys pode ser explicado pela ligação do NIVO ao dsDNA, o que torna os resíduos de aminoácidos Cys mais facilmente oxidáveis. O desaparecimento deste pico deve-se à forte ligação do NIVO ao dsDNA, o que altera a conformação estrutural do mAb, dificultando a oxidação dos resíduos de aminoácido Cys.

Ao aumentar o tempo de incubação para 2 horas, a corrente do pico de oxidação da dGuo aumentou, enquanto a corrente do segundo pico de oxidação do NIVO, P2_{Tyr+Trp}, e corrente do pico de oxidação da dAdo diminuíram, sugerindo que uma modificação adicional ocorreu. Essa mudança pode ser explicada pela forte interação entre os resíduos de dGuo e dAdo com NIVO, causando a clivagem da ligação entre a porção de açúcar e Ade, e sua liberação do esqueleto de dsDNA, que pode ser observada pelo aumento da corrente no mesmo potencial de oxidação da dGuo, em $E_p = +0,98$ V. Além disso, essa clivagem causa uma pequena desestabilização da estrutura do DNA promovendo o seu relaxamento, o que também pode ser observado pelo aumento da corrente do pico de

oxidação da dGuo. A formação de um complexo proteína-DNA, seguido por relaxamento do DNA foi relatado anteriormente [319, 320].

Após 4 horas de incubação esta alteração foi consolidada pelo desaparecimento completo do pico de oxidação da dAdo e aumento da corrente do pico correspondente à oxidação dos resíduos de dGuo e Ade liberados. A presença do segundo pico de oxidação do NIVO, P2_{Tyr+Trp}, sugere que o relaxamento da dupla hélice do DNA facilita a oxidação dos resíduos de aminoácidos NIVO do complexo NIVO-dsDNA. Períodos mais longos de incubação foram avaliados, no entanto, não foram observadas mais mudanças.

7.3.1.2 *Espectrofotometria UV-Vis*

A avaliação UV-Vis da interação do anticorpo monoclonal NIVO-dsDNA em soluções incubadas também foi investigada, **Figura 7.9**. Para determinar a influência da interação do NIVO na conformação e morfologia do dsDNA foram monitoradas as diferenças nos espectros de absorção do dsDNA, na ausência e presença do anticorpo monoclonal.

Espectros de UV-Vis para soluções controle de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA e 0,1 mg mL^{-1} NIVO, em tampão acetato de 0,1 M pH 4,5, para as mesmas condições, foram registrados. O espectro controle obtido na faixa de 400 a 230 nm para 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, **Figura 7.9 (—)**, mostrou uma banda de absorção, em $\lambda_{\text{max}} = 260$ nm, atribuída às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ dos anéis heterocíclicos dos nucleotídeos. O espectro controle obtido para 0,1 mg mL^{-1} NIVO nas mesmas condições, **Figura 7.9 (—)**, exibiu uma banda de absorção, próximo a $\lambda_{\text{max}} = 280$ nm, atribuída às cadeias laterais aromáticas dos resíduos de aminoácidos triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe) [321].

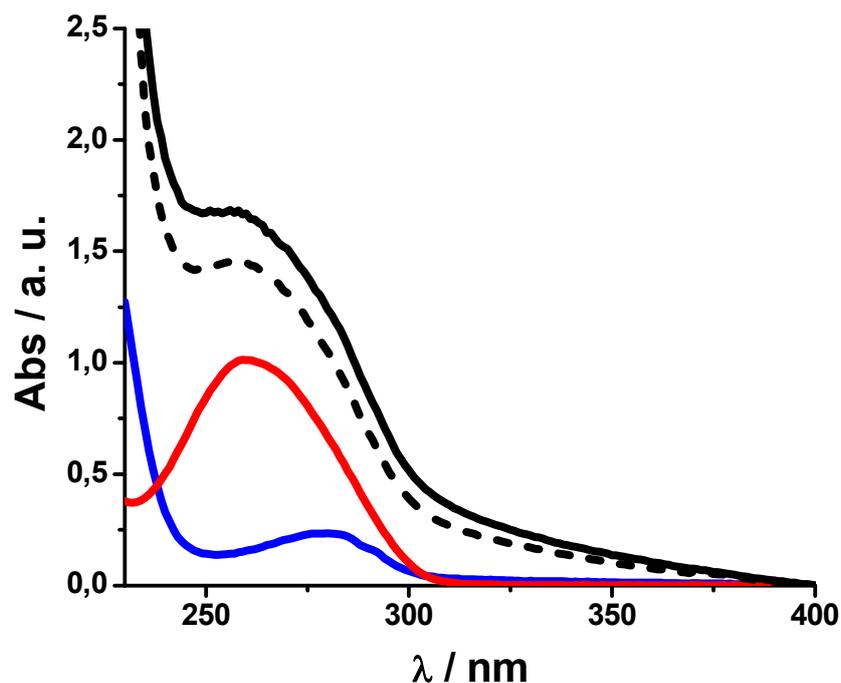


Figura 7.9. Espectros de absorção no UV-Vis, em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, para (—) 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA controlo, (—) 0,1 mg mL^{-1} NIVO controlo e para soluções incubadas de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA com 0,1 mg mL^{-1} NIVO, em diferentes períodos de tempo: (- - -) 0 h e (—) 4 h.

Os espectros UV-Vis foram registados para a solução contendo 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA imediatamente após a adição de 0,1 mg mL^{-1} NIVO, e após 4 horas de incubação. O espectro obtido imediatamente após a adição de NIVO à solução de dsDNA, **Figura 7.9** (- - -) apresentou um grande aumento na intensidade da banda de absorção do dsDNA, em $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$, sem deslocamento, a qual pode ser explicada pela sobreposição das bandas de absorção do NIVO e dsDNA e, conseqüentemente, a formação do complexo NIVO-dsDNA. Após 4 horas de incubação, um novo espectro mostrou um aumento na intensidade de absorção.

Os deslocamentos no comprimento de onda e os efeitos hiperocrômicos (ou hipocrômicos) são propriedades espectrais da interação fármaco-DNA, os quais estão intimamente relacionadas com a estrutura da dupla hélice. Desta forma, a hiperocromicidade na absorbância máxima do dsDNA, observada após 4 horas de incubação, **Figura 7.9** (—), indica que um mecanismo de relaxamento ocorreu para

períodos mais longos, em concordância com os resultados obtidos para a interação NIVO-dsDNA em soluções incubadas por voltametria de DP.

7.3.1.3 *Eletroforese em gel*

A interação NIVO-dsDNA também foi investigada por eletroforese em gel de agarose, a fim de permitir a avaliação das alterações conformacionais do dsDNA, levando em consideração o perfil de migração relativo e a intensidade da banda do dsDNA antes e após a interação NIVO-dsDNA. Para visualizar a mobilidade do DNA, intensidade da banda e possíveis danos, o ensaio de ligação EtBr para danos no DNA foi utilizado [322].

O perfil eletroforético das soluções incubadas contendo $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ NIVO com $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA (linhas 3-5), para diferentes períodos de incubação, 24 horas (linha 3), 4 horas (linha 4) e 1 hora (linha 5), é apresentado na **Figura 7.10**. As soluções controle de $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA (linha 1) e $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ NIVO (linha 2) foram incubadas por 24 horas nas mesmas condições experimentais.

Na amostra controle de $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA (linha 1) foi observado uma larga banda devido aos fragmentos tridimensionais de dsDNA com grande comprimento e diferentes tamanhos (entre 10000 e 15000 bp). O controle de NIVO (linha 2) mostrou também uma larga banda uma vez que a proteína tem uma estrutura 3D complexa.

A amostra NIVO-dsDNA incubada por 1 hora (linha 5), quando comparada com dsDNA controle (linha 1), apresentou um poço escuro e o desaparecimento da banda de fluorescência, mostrando que o marcador EtBr foi excluído da intercalação nos sítios de ligação do dsDNA devido a forte formação da estrutura do complexo NIVO-dsDNA.

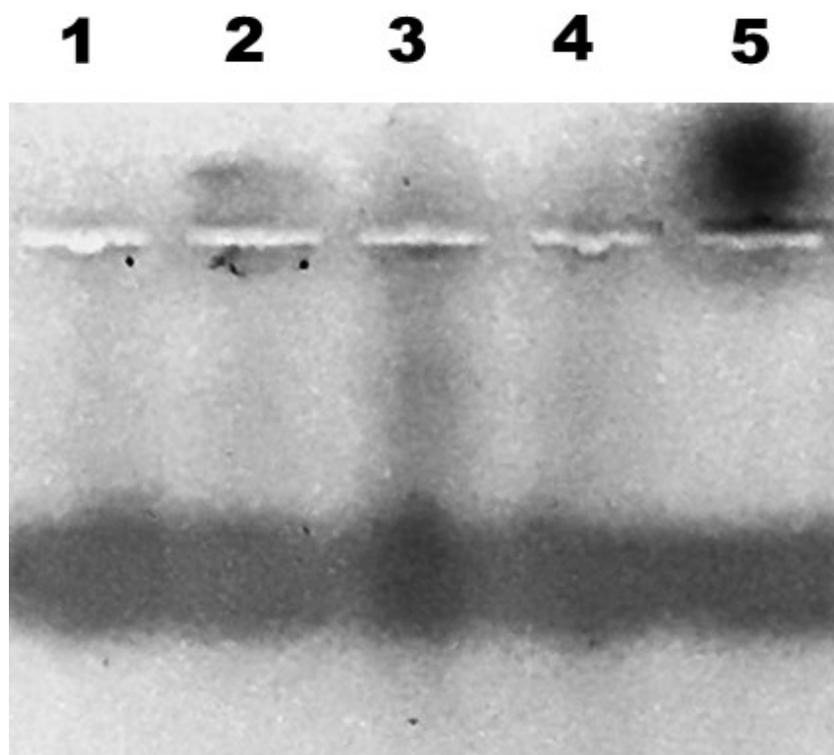


Figura 7.10. Eletroforese em gel de agarose da amostra de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA controlo (linha 1), $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ NIVO controlo, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA incubado com $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ NIVO por 24 horas (linha 3), 4 horas (linha 4) e 1 hora (linha 5).

Por outro lado, o aumento progressivo na intensidade de fluorescência observado para NIVO-dsDNA incubado por 4 horas (linha 4) e 24 horas (linha 3) revelou o relaxamento e/ou desenrolamento da estrutura do dsDNA causado pela maior exposição ao NIVO, a qual facilita a intercalação do marcador EtBr.

Consequentemente, pode-se concluir que as alterações conformacionais do dsDNA durante a incubação com NIVO, observadas por voltametria DP e espectrofotometria UV-Vis, estão de acordo com as obtidas por eletroforese em gel de agarose.

7.3.2 Interação NIVO-dsDNA utilizando Biossensores Eletroquímicos de dsDNA

Os biossensores eletroquímicos de dsDNA foram usados para investigar a interação NIVO-dsDNA durante diferentes intervalos de tempo, por voltametria de DP, EIS e QCM.

7.3.2.1 Eletroquímica

O biossensor eletroquímico de dsDNA permite avaliar claramente as mudanças ocorridas no dsDNA imobilizado na superfície do eletrodo durante a interação NIVO-dsDNA. A metodologia baseada na imobilização multicamadas de dsDNA na superfície do GCE [89], *Secção 2.5.2*, propicia uma cobertura completa da superfície do GCE, importante e necessária, para evitar a indesejável co-adsorção de moléculas livres do anticorpo monoclonal NIVO e dsDNA e os complexos NIVO-dsDNA [256].

Um novo biossensor eletroquímico de dsDNA foi sempre preparado para cada experiência e incubado durante um período de tempo específico, em soluções diluídas de NIVO, contendo $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$, em tampão acetato $0,1 \text{ M}$ pH 4,5. Após interação, o biossensor eletroquímico de dsDNA foi lavado com água desionizada de modo a remover as moléculas de NIVO não ligadas, e transferido para tampão acetato $0,1 \text{ M}$ pH 4,5, onde os voltamogramas de DP foram registados, **Figura 7.11**.

O voltamograma de DP obtido após 1 hora de incubação mostrou o segundo pico de oxidação do NIVO, atribuído a oxidação dos resíduos de aminoácidos tirosina e triptofano, $P_{2\text{Tyr+Trp}}$, em $E_{pa} = +0,76 \text{ V}$, e uma grande diminuição das correntes dos picos de oxidação dos resíduos dGuo e dAdo, devido à interação NIVO-dsDNA. Diante dos resultados obtidos evidencia-se que ocorreu uma mudança conformacional na estrutura

do DNA, relacionada à ligação do NIVO às moléculas de DNA imobilizadas na superfície do eletrodo e à formação do complexo NIVO-dsDNA.

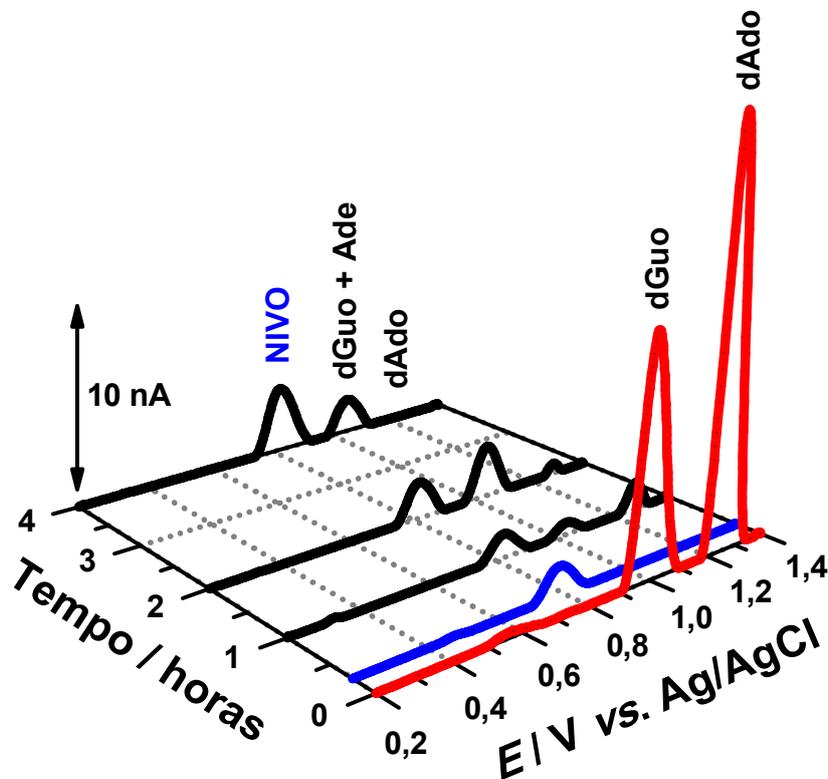


Figura 7.11. Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, para (—) biossensor eletroquímico de dsDNA controle, (—) 0,1 mg mL⁻¹ NIVO controle e (—) após a incubação do biossensor eletroquímico de dsDNA em 0,1 mg mL⁻¹ NIVO durante diferentes períodos de tempo: 1, 2 e 4 horas, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

O voltamograma de DP obtido depois de 2 horas de incubação mostrou um decréscimo na corrente do pico de oxidação do dAdo, enquanto as correntes dos picos correspondentes à oxidação da dGuo-Ade e do NIVO aumentaram. Este comportamento evidencia uma maior interação entre os resíduos purina dGuo e dAdo com NIVO, devido à oxidação do carbono C1' da desoxirribose pelo NIVO que causou a clivagem da ligação entre o açúcar e Ade, e a sua liberação do esqueleto dsDNA. O aumento do pico de oxidação da dGuo também pode ser explicado pelo relaxamento da estrutura do dsDNA promovida pela interação NIVO-dsDNA, que ocasiona, para períodos mais longos de

incubação, novas mudanças conformacionais. Sendo assim, a corrente do pico de oxidação, em $E_p = +0,98$ V, corresponde à oxidação dos resíduos de Ade liberados e dGuo da cadeia polinucleotídica.

O voltamograma de DP obtido após 4 horas de incubação mostrou o desaparecimento do pico de oxidação da dAdo, o pico de dGuo-Ade permaneceu inalterado e o pico de oxidação do NIVO aumentou, confirmando a forte interação NIVO-dsDNA, levando a alterações conformacionais do dsDNA, observado em soluções incubadas, **Figura 7.8**.

7.3.2.2 *Espectroscopia de Impedância Eletroquímica*

Experiências de EIS foram realizadas para complementar e esclarecer a interação NIVO-dsDNA utilizando biossensores eletroquímicos de dsDNA. O biossensor eletroquímico de dsDNA foi construído conforme descrito na *Secção 2.5.2* e caracterizado utilizando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ como sonda redox, por voltametria cíclica e EIS, para confirmar a adsorção e imobilização de multicamadas de dsDNA na superfície do GCE.

As mudanças na corrente de pico e a separação dos potenciais de pico nos voltamogramas cíclicos nas superfícies do GCE não modificado e do biossensor eletroquímico de dsDNA, **Figura 7.12**, relacionadas com a constante de velocidade de transferência de elétrões, e as mudanças do diâmetro dos semicírculos nos gráficos de Nyquist, relacionados com a resistência à transferência de elétrões, **Figura 7.13**, foram investigados.

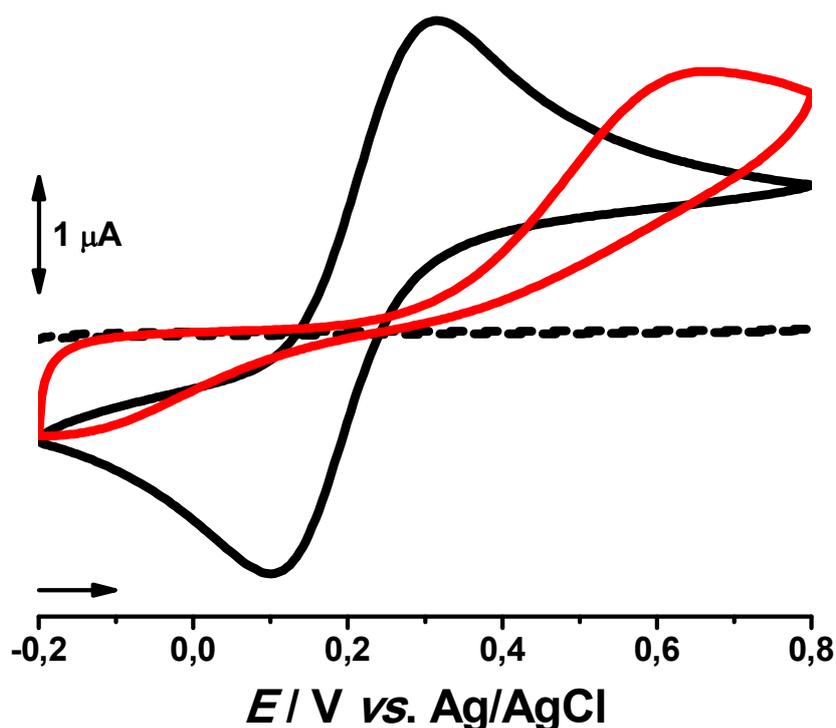


Figura 7.12. Voltamogramas cíclicos, em tampão acetato 0,1 M pH 4,5, obtido com o (---) GCE não modificado, (—) GCE não modificado em 3,0 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ e (—) biossensor eletroquímico de dsDNA em 3,0 mM $K_4[Fe(CN)_6]$, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

O voltamograma cíclico da sonda redox $[Fe(CN)_6]^{4-}$ obtido para a superfície do GCE não modificado apresentou um processo redox *quasi-reversível*, com uma separação de potenciais de pico de $\Delta E_p \sim 213 \text{ mV}$. Nas mesmas condições experimentais, utilizando o biossensor eletroquímico de dsDNA, o voltamograma cíclico mostrou que o processo redox $[Fe(CN)_6]^{4-}$ se tornou irreversível e os picos foram deslocados para potenciais mais positivos e negativos, quando comparados com o voltamograma cíclico registado com o GCE não modificado, resultando em uma separação de potenciais de pico de $\Delta E_p \sim 770 \text{ mV}$, **Figura 7.12**.

Os gráficos de EIS no plano complexo para o GCE não modificado e para o biossensor eletroquímico de dsDNA foram obtidos, em $E_{ap} = +0,25 \text{ V}$, o qual corresponde ao potencial formal das espécies redox $[Fe(CN)_6]^{4-}/[Fe(CN)_6]^{3-}$ obtido por voltametria cíclica, em tampão acetato 0,1 M pH 4,5, para diferentes concentrações de $[Fe(CN)_6]^{4-}/[Fe(CN)_6]^{3-}$, conforme descrito na *Secção 2.13*, **Figura 7.13**.

A modelação dos espectros de EIS no plano complexo foi feita de acordo com um circuito elétrico equivalente do tipo Randles, **Figura 7.13 (A1)** e **(B1)**, e **Figura 7.14**. No circuito, R_{Ω} representa a resistência da célula, CPE_1 o elemento de fase constante, R_{ct} a resistência de transferência de carga através da interface da superfície do eletrodo e CPE_2 um novo elemento de fase constante. O CPE foi modelado como um condensador não ideal [36], dado por $CPE = -(Ci\omega)^{-\alpha}$, onde C é a capacitância, que descreve a separação de carga da dupla camada na interface eletrodo-solução, ω é a frequência em rad s^{-1} e o expoente α é devido à heterogeneidade da superfície ($0,5 < \alpha < 1$).

Os resultados das EIS para o GCE não modificado e para o biossensor eletroquímico de dsDNA foram ajustados aos circuitos elétricos equivalentes apropriados e os valores obtidos para seus parâmetros estão sumarizados na **Tabela 7.2** e são mostrados como curvas contínuas nos espectros, **Figura 7.13**.

O gráfico de impedância no plano complexo observado para o GCE não modificado, **Figura 7.13 (A)**, mostrou um semicírculo correspondente à ocorrência da reação de transferência de carga, com uma resistência de transferência de carga (R_{ct}) representada pelo diâmetro do semicírculo.

A impedância no plano complexo obtida para o biossensor eletroquímico de dsDNA, **Figura 7.13 (B)**, apresentou alterações na resistência de transferência de carga, pois as multicamadas de dsDNA imobilizadas na superfície do GCE bloqueiam a transferência de elétrons entre a sonda redox e a superfície do GCE.

Ainda assim, tanto para o biossensor eletroquímico de dsDNA como para o GCE não modificado, os valores de R_{ct} diminuíram com o aumento da concentração de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, conforme esperado. O biossensor eletroquímico de dsDNA apresentou um diâmetro muito maior do semicírculo, refletido em valores de R_{ct} maiores,

comprovando a imobilização e cobertura da superfície do GCE por multicamadas de dsDNA.

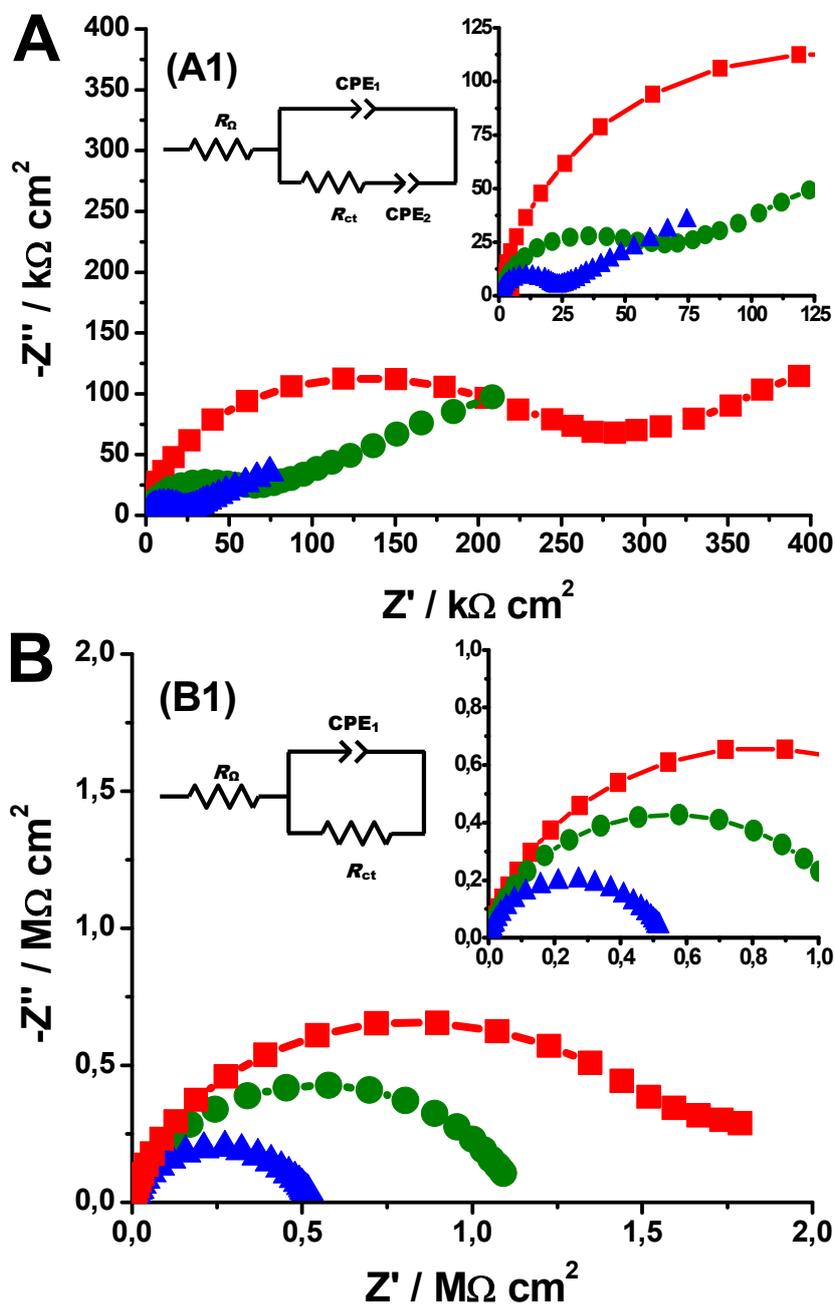


Figura 7.13. Espectros de EIS no plano complexo, em tampão acetato 0,1 M pH 4,5, para (■) 1,0, (●) 3,0 and (▲) 5,0 mM $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$, com a aplicação de potencial, $E_{ap} = +0,25$ V: (A) GCE não modificado, (B) biossensor eletroquímico de dsDNA; (A1) e (B1) circuitos elétricos equivalentes usados nos ajustes dos dados de EIS.

Os gráficos de EIS no plano complexo para o biossensor eletroquímico de dsDNA após 1 e 4 horas de incubação em $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ NIVO, ao aplicar $E_{ap} = +0,25 \text{ V}$, contendo $5,0 \text{ mM } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, foram também obtidos, **Figura 7.14**.

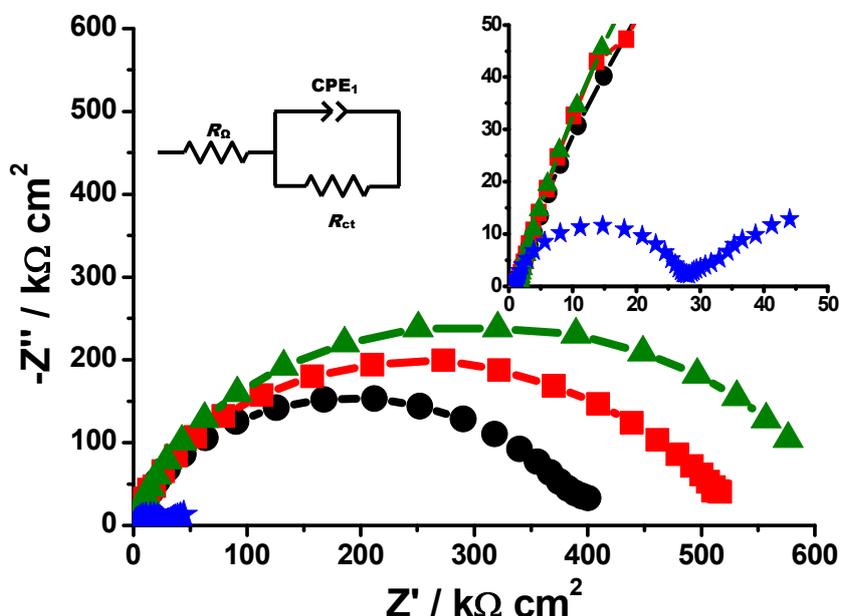


Figura 7.14. Espectros de EIS no plano complexo, em tampão acetato $0,1 \text{ M}$ pH $4,5$, para $5,0 \text{ mM } \text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, com a aplicação de potencial, $E_{ap} = +0,25 \text{ V}$: (★) GCE não modificado, biossensor eletroquímico de dsDNA (■) controle e após a incubação em $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ durante diferentes períodos de tempo, 1 (▲) e (●) 4 horas. Circuito elétrico equivalente usado no ajuste dos dados de EIS.

A impedância no plano complexo obtida após 1 hora de incubação do biossensor eletroquímico de dsDNA em $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ NIVO, **Figura 7.14** (▲), mostrou um aumento no diâmetro do semicírculo e, conseqüentemente, um aumento no valor de R_{ct} quando comparado com o biossensor eletroquímico de dsDNA controle, devido à ligação do NIVO ao dsDNA e formação do complexo NIVO-dsDNA, resultando na inibição da resistência da transferência eletrônica.

Após 4 horas de incubação, **Figura 7.14** (●) a impedância no plano complexo mostrou uma diminuição do diâmetro do semicírculo e R_{ct} , o que pode ser explicado pela relaxação e/ou desdobramento da estrutura do dsDNA diminuindo a resistência à transferência de elétrons.

Tabela 7.2. Parâmetros de Randles obtidos para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-3}$ a partir dos espectros de EIS no plano complexo para o GCE não modificado, biossensor eletroquímico de dsDNA controle e após sua incubação em NIVO durante diferentes períodos de tempo.

Superfície do eletrodo	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-3}$ (mM)	R_Ω ($\Omega \text{ cm}^2$)	CPE_1 ($\mu\text{F cm}^{-2} \text{ S}^{0-1}$)	α_1	R_{ct} ($\text{k}\Omega \text{ cm}^2$)	CPE_2 ($\mu\text{F cm}^{-2} \text{ S}^{0-1}$)	α_2
GCE	1,0	659 ± 10	0,22 ± 0,01	0,93 ± 0,01	76 ± 15	41 ± 10	0,41 ± 0,02
	3,0	1091 ± 10	0,21 ± 0,01	0,93 ± 0,01	43 ± 20	103 ± 10	0,46 ± 0,01
	5,0	1078 ± 10	0,21 ± 0,01	0,93 ± 0,01	25 ± 10	169 ± 10	0,46 ± 0,01
Biossensor eletroquímico de dsDNA controle	1,0	1224 ± 16	0,48 ± 0,08	0,87 ± 0,01	1660 ± 31	–	–
	3,0	1114 ± 14	0,58 ± 0,01	0,86 ± 0,02	1100 ± 18	–	–
	5,0	1157 ± 15	0,55 ± 0,02	0,85 ± 0,01	514 ± 10	–	–
NIVO- Biossensor eletroquímico de dsDNA (1h)	5,0	1399 ± 13	0,41 ± 0,06	0,90 ± 0,01	604 ± 10	–	–
	5,0	1205 ± 17	0,52 ± 0,01	0,86 ± 0,01	389 ± 10	–	–

7.3.2.3 *Microbalança de Cristal de Quartzo*

A microbalança de cristal de quartzo (QCM) é uma importante ferramenta que permite medir as alterações de massa na superfície do cristal de quartzo. As medições gravimétricas foram realizadas utilizando um biossensor eletroquímico de dsDNA, preparado conforme descrito na *Secção 2.5.2*, na superfície de cristal de quartzo piezoelétrico revestido com grafite (AuQC_Gr). Após a secagem à temperatura ambiente sob atmosfera de N_{2(g)}, o biossensor eletroquímico de dsDNA no cristal de quartzo foi colocado na QCM e coberto com 5,0 mL de tampão acetato 0,1 M pH 4,5.

A variação da frequência após sucessivas adições de NIVO, **Figura 7.15 (A)**, foi registada e as mudanças de massa no biossensor eletroquímico de dsDNA no cristal de quartzo foram determinadas. A frequência obtida após a estabilização do sistema foi tomada como valor referência, para facilitar o acompanhamento das mudanças de frequência correspondentes a cada adição de NIVO.

Após a primeira adição de NIVO à solução observou-se uma grande mudança na frequência do biossensor eletroquímico de dsDNA no cristal de quartzo, **Figura 7.15 (A)**. O grande decréscimo na frequência é devido à ligação NIVO-dsDNA causando forte condensação e/ou agregação de dsDNA.

Adições sucessivas de NIVO ao biossensor eletroquímico de dsDNA no cristal de quartzo foram realizadas. Após a estabilização do sistema, observou-se uma diminuição progressiva da frequência de oscilação, causada pela ligação do anticorpo monoclonal NIVO ao dsDNA e consequentemente o aumento da massa.

A diminuição da frequência e consequentemente o aumento de massa foi mais significativo até a adição de aproximadamente 0,23 mg mL⁻¹ NIVO, que coincide com 1 hora de incubação. Após isso, não foram observadas mudanças mais significativas na

frequência, o que indica que a mudança no mecanismo de interação ocorreu, sendo esta relacionada ao relaxamento e/ou desenrolamento da estrutura da dupla hélice do DNA.

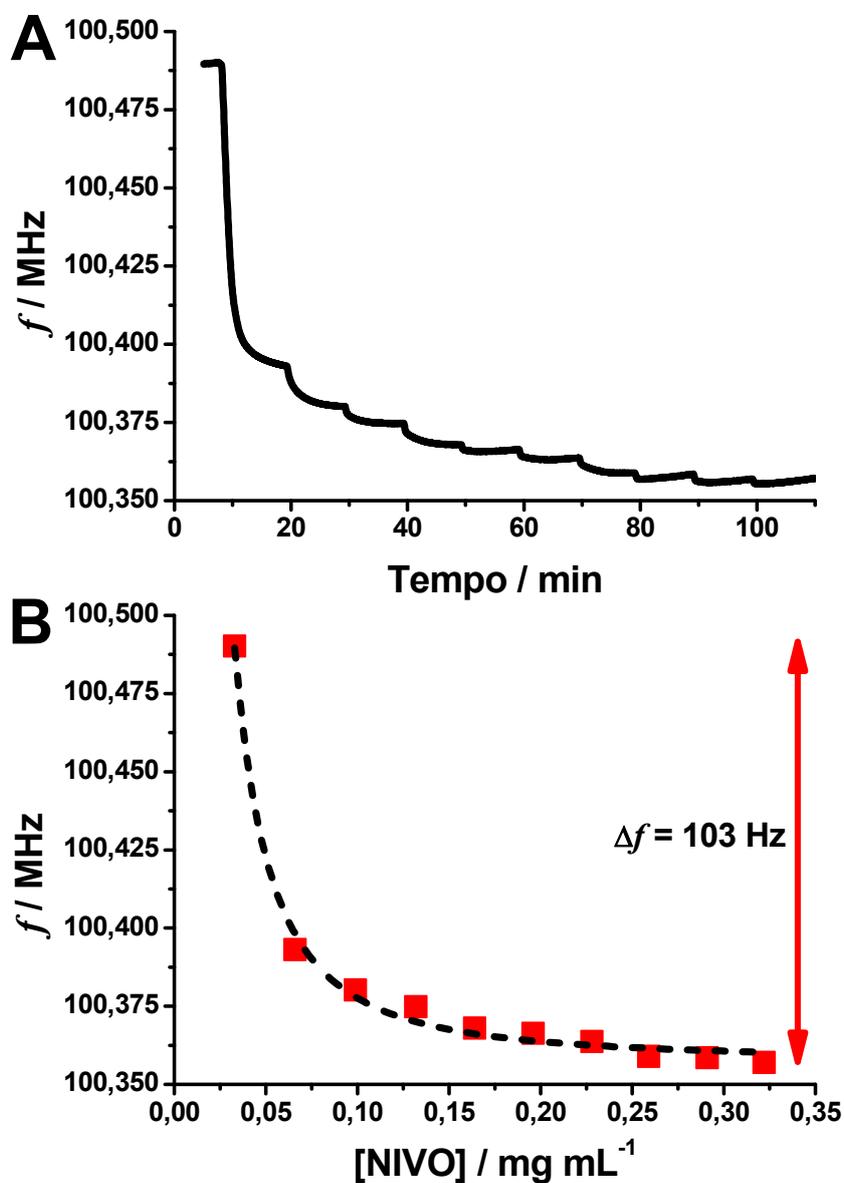


Figura 7.15. Variação de frequência do biossensor eletroquímico de dsDNA no imobilizado no cristal de quartzo piezoelétrico revestido com grafite em função (A) do tempo após sucessivas adições de NIVO e (B) da concentração de NIVO em solução.

A variação da frequência total, após as sucessivas adições de NIVO, detetadas por 2 horas de incubação foi de 103 Hz, o que corresponde a um aumento de massa de 0,115 μg do biossensor eletroquímico de dsDNA no cristal de quartzo.

7.3.3 Interação NIVO-dsDNA utilizando Biossensores Eletroquímicos de Poly[G] e Poly[A]

Os polihomonucleotídeos, poly[G] e poly[A], foram usados para preparar biossensores eletroquímicos de poly[G] e poly[A], *Secção 2.5.2*, a fim de esclarecer com qual base purina, Gua ou Ade, uma interação NIVO-dsDNA preferencial e mais específica ocorreu.

O voltamograma de DP do biossensor eletroquímico de poly[G] controlo apresentou o pico de oxidação da dGuo, em $E_{pa} = +1,08$ V, **Figura 7.16** (—).

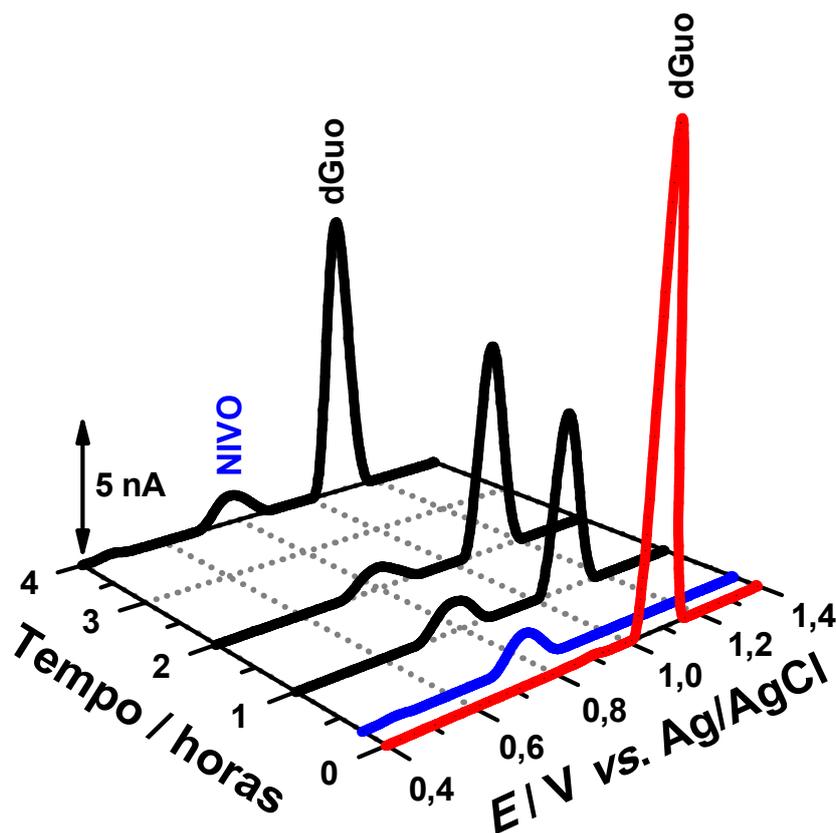


Figura 7.16. Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, para (—) biossensor eletroquímico de poly[G] controlo, (—) 0,1 mg mL⁻¹ NIVO controlo e (—) após a incubação do biossensor eletroquímico de poly[G] em 0,1 mg mL⁻¹ NIVO durante diferentes períodos de tempo: 1, 2 e 4 horas, $\nu = 5$ mV s⁻¹.

O voltamograma de DP para um novo biossensor eletroquímico de poly[G] incubado por 1 hora em $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ NIVO mostrou a oxidação da dGuo, com uma grande diminuição na corrente de pico, no mesmo potencial que o controle, em $E_{pa} = +1,08 \text{ V}$, e o aparecimento de um novo pico de oxidação, $P2_{\text{Tyr+Trp}}$, em $E_{pa} = +0,76 \text{ V}$, correspondente ao segundo pico de oxidação do NIVO, de acordo com o NIVO controle.

Os voltamogramas de DP após maiores tempos de incubação, 2 e 4 horas, mostraram o aumento progressivo do pico de oxidação da dGuo, enquanto o pico de oxidação do NIVO permaneceu constante.

Os resultados obtidos utilizando biossensores eletroquímicos de poly[G], **Figura 7.16 (—)**, confirmaram os obtidos em soluções incubadas e utilizando biossensores eletroquímicos de dsDNA. Para tempos de incubação mais curtos, ocorreu a formação de uma estrutura complexa de NIVO-poly[G], enquanto que para períodos mais longos de incubação ocorreu o relaxamento da estrutura de poly[G].

O voltamograma de DP do biossensor eletroquímico de poly[A] controle apresentou o pico de oxidação da dAdo, em $E_{pa} = +1,26 \text{ V}$, **Figura 7.17 (—)**.

O voltamograma de DP de um novo biossensor eletroquímico de poly[A] incubado em $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ NIVO, **Figura 7.17 (—)**, mostrou, em 1 e 2 horas de incubação, uma grande diminuição progressiva da corrente do pico da oxidação da dAdo e após 4 horas de incubação o desaparecimento completo do pico de oxidação da dAdo, e o aparecimento do pico de oxidação dos resíduos de Ade, em $E_{pa} = +1,05 \text{ V}$.

Os biossensores eletroquímicos de poly[G] e poly[A] confirmaram os resultados obtidos com os biossensores eletroquímicos de dsDNA e revelaram novas informações importantes para o entendimento do mecanismo molecular envolvido na interação NIVO-dsDNA.

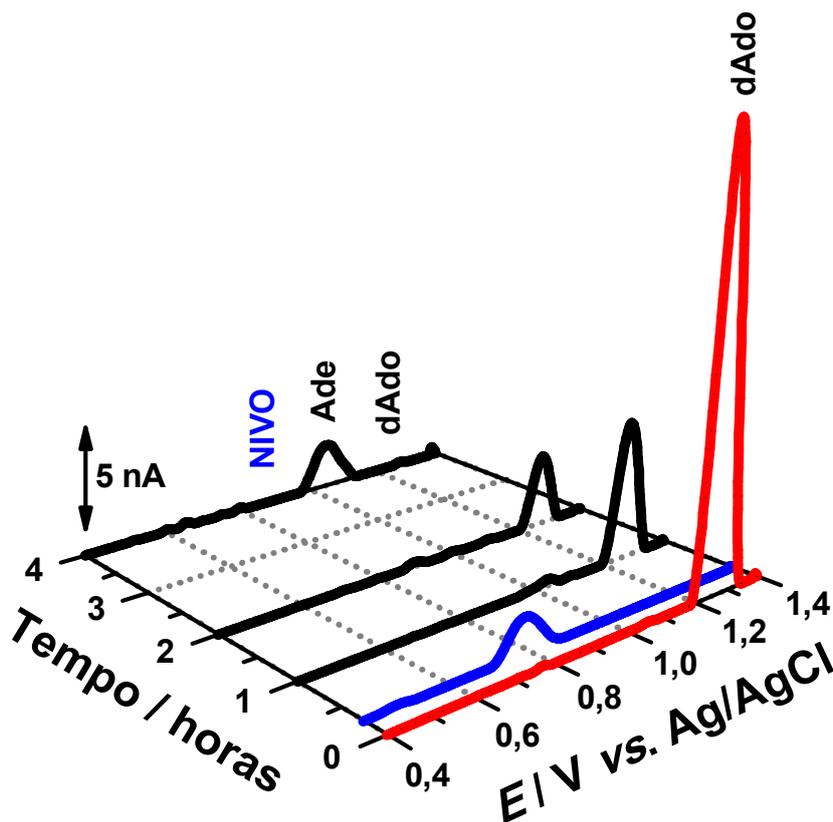


Figura 7.17. Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, para (—) biossensor eletroquímico de poly[A] controle, (—) 0,1 mg mL⁻¹ NIVO controle e (—) após a incubação do biossensor eletroquímico de poly[A] em 0,1 mg mL⁻¹ NIVO durante diferentes períodos de tempo: 1, 2 e 4 horas, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Efetivamente, o mecanismo de interação NIVO-dsDNA ocorre inicialmente independente da sequência de DNA, levando o anticorpo monoclonal NIVO a ligar-se ao dsDNA e formar uma estrutura complexa de NIVO-dsDNA. Para tempos mais longos, o mecanismo de interação sofre uma mudança, na qual a estrutura complexa NIVO-dsDNA sofre um relaxamento e/ou desenrolamento da estrutura do dsDNA, com uma interação preferencial entre os resíduos de adenosina e NIVO, causando a liberação de Ade livre.

7.4 Considerações Finais

O nivolumab (NIVO) é um anticorpo monoclonal humanizado recombinante utilizado no tratamento do cancro. Inicialmente, a oxidação eletroquímica do filme

espesso com multicamadas de NIVO nativo e desnaturado adsorvido em GCE foi investigada pela primeira vez utilizando voltametria DP. O comportamento interfacial e de adsorção do NIVO na superfície do GCE também foi avaliado por EIS.

As interações proteína-elétrodo são de fundamental importância na bioeletroquímica, sendo estas interações diretamente influenciadas pelas propriedades da superfície do eletrodo. Outro fator importante é a orientação da proteína, pois os aminoácidos eletroativos que normalmente estão no interior da morfologia 3D da proteína dificultam os processos de transferência de elétrons. Dessa forma, considerando que a superfície do GCE é hidrofóbica, as interações com domínios proteicos hidrofóbicos são favorecidas.

Para melhor compreender o comportamento eletroquímico do anticorpo monoclonal anticâncer NIVO é importante e necessário analisar a sua estrutura morfológica e química, **Figura 7.1**. Os cinco aminoácidos eletroativos estão distribuídos 102 nas cadeias pesadas do NIVO, 36 Tyr, 18 Trp, 22 Cys, 16 His e 10 Met, e 38 nas cadeias leves do NIVO, 18 Tyr, 6 Trp, 10 Cys e 4 His. Os resíduos de aminoácidos Met não estão presentes na composição da cadeia leve do NIVO.

Uma maneira de identificar a hidrofobicidade e/ou polaridade de uma proteína, ou ao longo do comprimento de uma sequência peptídica é usando a escala de hidropatia de Kyte-Doolittle [101, 161]. O gráfico de Kyte-Doolittle para ambas as cadeias pesada e leve, **Figura 7.18**, do NIVO apresentou um caráter geral hidrofílico, com sequências hidrofóbicas intercaladas.

Como pode ser observado, a maioria dos cinco aminoácidos eletroativos presentes na molécula NIVO estão incorporados nas regiões hidrofílicas localizadas na/ou próximo da superfície da proteína, e que não interagirão facilmente com a superfície

hidrofóbica do GCE, tornando a oxidação dos aminoácidos presentes no NIVO mais difícil.

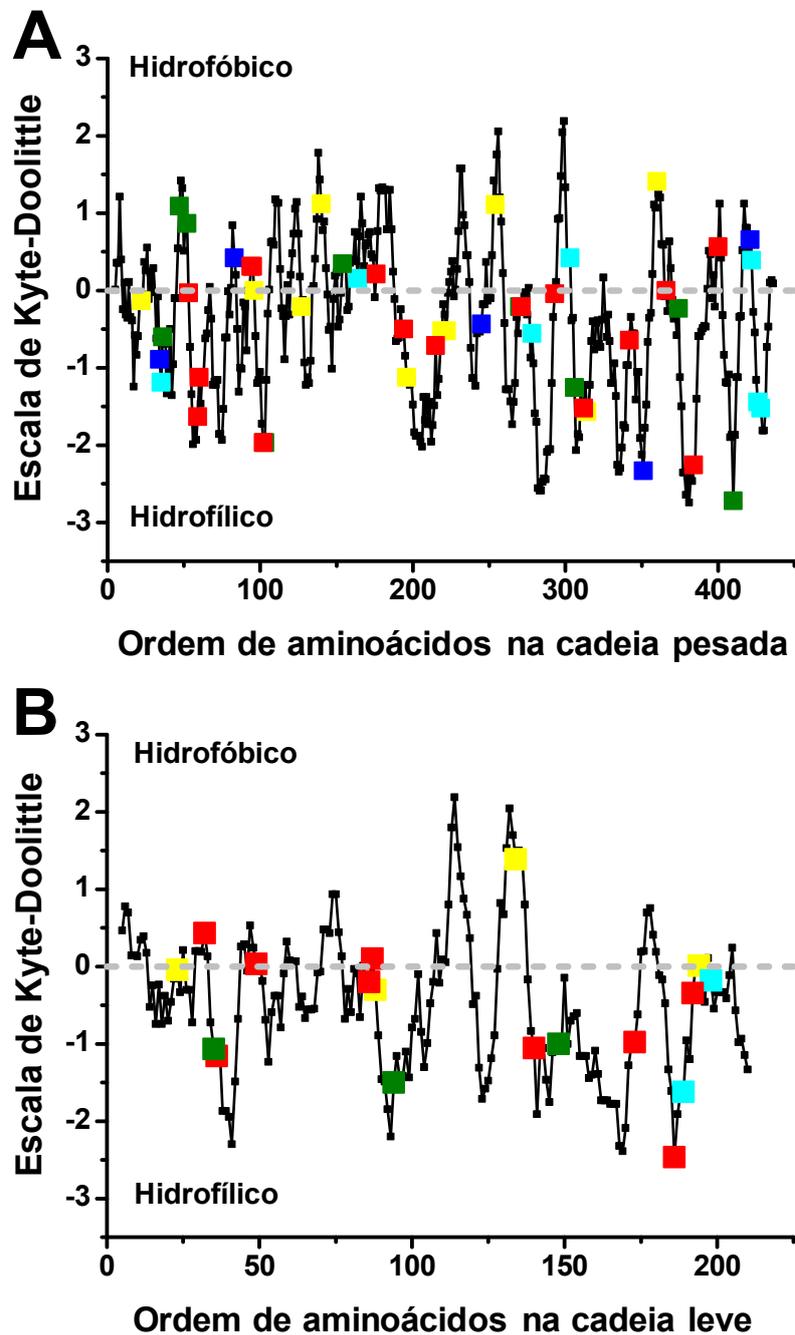


Figura 7.18. Gráfico de hidropatia da sequência de aminoácidos do NIVO: cadeia (A) pesada e (B) leve. Aminoácidos eletroativos: Cys em amarelo, Tyr em vermelho, Trp em verde, His em ciano e Met em azul.

Outros anticorpos monoclonais apresentaram perfis semelhantes quando comparadas as escalas de hidropatia de Kyte-Doolittle [234, 310], a qual também revelou que os resíduos de aminoácidos eletroativos estão principalmente na cadeia pesada e na região hidrofílica. Assim, a dificuldade no processo de transferência de elétrons observada para NIVO é semelhante a outros anticorpos monoclonais.

A oxidação eletroquímica do NIVO nativo em solução e adsorvido na superfície do GCE mostrou dois picos anódicos dependentes do pH, correspondentes às reações de transferência de carga dos resíduos de aminoácidos Cys, Tyr e Trp, os quais estão localizados principalmente nas regiões hidrofílicas, **Figura 7.18**.

No entanto, embora a maioria dos aminoácidos eletroativos do NIVO esteja nas regiões hidrofílicas, uma pequena quantidade irá interagir com a superfície do eletrodo, efeito este observado pelos picos de oxidação atribuídos aos resíduos de aminoácidos Cys, Tyr e Trp. Estes resultados mostram claramente a maior dificuldade dos processos de transferência de elétrons dos resíduos de aminoácidos eletroativos mais internos da proteína, nas estruturas terciária e quaternária do anticorpo NIVO, organizados de acordo com a polaridade/hidrofobicidade, para ocorrer na superfície do GCE.

Uma alternativa para investigar melhor a eletroquímica direta de proteínas é imobilizar o material biológico na superfície do eletrodo. A velocidade de transferência de elétrons aumenta exponencialmente, uma vez que a adsorção de proteínas faz com que os resíduos de aminoácidos sejam imobilizados proximamente à superfície do eletrodo.

A oxidação eletroquímica do filme espesso com multicamadas de NIVO nativo adsorvido em GCE mostrou, **Figura 7.3**, assim como observado para a oxidação do NIVO nativo em solução, dois picos anódicos dependentes do pH atribuídos aos resíduos de aminoácidos Cys, P1, e Tyr e Trp, P2, com correntes de pico com maiores intensidades quando comparado com o NIVO nativo em solução, **Figura 7.2**.

Com o intuito de desdobrar a estrutura morfológica 3D do anticorpo NIVO e possibilitar uma maior exposição dos resíduos de aminoácidos eletroativos à superfície do elétrodo, o filme espesso com multicamadas de NIVO adsorvido em GCE foi desnaturado empregando os agentes desnaturantes, ureia e SDS, e agentes redutores, TCEP e DTT, **Figura 7.5**.

O filme espesso com multicamadas de NIVO desnaturado adsorvido na superfície do GCE sofreu alterações substanciais e novas reações de transferência de carga foram observadas. Efetivamente, as correntes de pico dos resíduos de aminoácidos eletroativos aumentaram e o aparecimento de novos picos de oxidação foram observados nos voltamogramas de DP do filme espesso com multicamadas de NIVO desnaturado adsorvido em GCE, quando comparado com o filme espesso com multicamadas de NIVO nativo adsorvido em GCE. Este facto claramente confirma o desdobramento da estrutura morfológica 3D do NIVO causada pelos agentes desnaturantes e redutores.

A desnaturação do anticorpo monoclonal NIVO adsorvido em GCE com DTT mostrou ser a mais efetiva, uma vez que as correntes dos picos de oxidação $P1_{Cys}$ e $P2_{Tyr+Trp}$ aumentaram gradualmente com o tempo de incubação, assim como o aparecimento do novo pico, $P3_{Trp+Met+His}$, o qual também aumentou significativamente com o tempo de incubação.

Isto pode ser explicado pela alta reatividade do DTT, o qual reduz eficientemente todas as ligações dissulfeto na molécula da proteína e promove o desdobramento total da estrutura morfológica 3D do anticorpo monoclonal NIVO. Neste caso, o DTT causou o rompimento das ligações dissulfeto, que impedem a formação de ligações intramoleculares e intermoleculares entre os resíduos de aminoácidos cisteína e metionina presentes na molécula do NIVO, e a ligação da cadeia pesada à cadeia leve do NIVO, que estão conectadas através de ligações dissulfeto intercadeias.

As grandes modificações estruturais da estrutura do NIVO nativo promovidas pelos agentes desnaturantes e redutores, as quais tornaram todos os resíduos de aminoácidos eletroativos mais expostos à superfície do eletrodo, possibilitando uma oxidação mais fácil, também foram observadas para outros anticorpos monoclonais [234, 310]. Facto que indica que o uso de agentes desnaturantes e redutores [159] são uma excelente estratégia para desdobrar a estrutura 3D da proteína e, conseqüentemente, possibilitar uma melhor investigação do comportamento dos resíduos de aminoácidos eletroativos por meio das técnicas eletroquímicas.

A eletroquímica direta de anticorpos monoclonais traz novas perspectivas para a aplicação de métodos eletroquímicos na investigação proteômica e biomédica, para um melhor entendimento das propriedades e mecanismos de ação dos anticorpos, e suas diferentes funções, bem como o desenvolvimento e a melhoria na procurando novos anticorpos monoclonais.

Por fim, a interação NIVO-dsDNA foi avaliada em soluções incubadas, por voltametria de DP, espectrofotometria UV-Vis e eletroforese em gel, e utilizando biossensores eletroquímicos dsDNA, e polihomonucleotídeos de guanosina e adenosina, os biossensores eletroquímicos de poly[G] e poly[A], por voltametria de DP. As modificações causadas pelo NIVO na estrutura morfológica do biossensor eletroquímico dsDNA, também foram confirmadas usando EIS e QCM. A interação NIVO-dsDNA ocorre pela ligação do anticorpo monoclonal NIVO ao DNA, resultando em um complexo NIVO-dsDNA, seguido pelo relaxamento e/ou desdobramento da dupla hélice do DNA, além da formação de um sítio abásico no DNA após a liberação dos resíduos Ade de sua estrutura.

No entanto, nenhum pico de oxidação relacionado à presença dos biomarcadores do dano oxidativo do DNA, 8-oxoGua e/ou 2,8-oxoAde, em $E_{pa} = 0,45$ V, foi observado

em todos os voltamogramas de DP dos biossensores eletroquímicos de dsDNA, poly[G] e poly[A] incubados em NIVO, indicando que não há dano oxidativo nas condições experimentais utilizadas.

CAPÍTULO 8

Xylella fastidiosa e Cobre(II)

A *Xylella fastidiosa* é uma bactéria que ameaça uma das espécies de árvores mais importantes em Portugal, a oliveira, e não só. Antes nunca detetada em território nacional, a bactéria foi reportada em Vila Nova de Gaia e logo se espalhou para outros sítios dentro daquele concelho, trazendo além de preocupações aos agricultores, prejuízos aos parques e jardins contaminados.

Neste capítulo apresenta-se primeiramente a investigação do comportamento eletroquímico de oxidação do biossensor eletroquímico de DNA de dupla hélice da *Xylella fastidiosa* (XF-dsDNA) por voltametria de DP. Posteriormente, apresenta-se o mecanismo de interação entre XF-dsDNA e Cu(II), um potencial pesticida, investigado por diferentes tempos de incubação por voltametria de DP e EIS utilizando biossensores eletroquímicos de XF-dsDNA. Como forma de comparação, a interação entre dsDNA do timo de vitela (CT-dsDNA) e Cu(II) foi também investigada, nas mesmas condições e pelos mesmos períodos de tempo de incubação, utilizando biossensores eletroquímicos de CT-dsDNA.

8.1 Introdução

As bactérias são células biológicas encontradas entre as primeiras formas de vida na Terra e estão presentes na maioria dos habitats, como solo, água, fontes termais ácidas, resíduos radioativos, entre outros [323].

De acordo com a classificação de Whittaker de cinco reinos, as bactérias enquadram-se no reino Monera. Já de acordo com a classificação mais atual em três domínios, esses organismos estão divididos no domínio Archaea, que engloba as arqueobactérias, e no domínio Bactéria, que engloba os outros grupos de bactérias [324].

As bactérias são organismos unicelulares e possuem o seu material genético disperso no citoplasma, sendo, portanto, denominados de procariontes, **Figura 8.1**. Em sua maioria são compostas por uma membrana plasmática encontrada em todas as células e uma parede celular externa constituída, principalmente, por peptidoglicanos. Essa parede celular apresenta como principal função manter a forma das células bacterianas e garantir proteção. Além disso, é possível perceber em algumas espécies uma cápsula polissacarídica a envolver a parede.

No citoplasma da célula bacteriana encontra-se apenas um tipo de organelo, os ribossomas. Esses ribossomas são menores que aqueles encontrados em células eucarióticas, mas desempenham a mesma função, que é a síntese de proteínas. Ademais, estão presentes grânulos ou inclusões com função de armazenamento.

O citoplasma, por sua vez, apresenta uma região, chamada de nucleóide, onde está localizado o cromossomo bacteriano, único e circular. Além do DNA cromossomial, observa-se o plasmídeo, formado por uma molécula pequena de DNA circular de duplicação independente.

Em algumas bactérias, é possível encontrar ainda estruturas de locomoção conhecidas como flagelos, que são compostos por uma proteína denominada de flagelina.

Existem ainda estruturas mais finas e mais curtas que os flagelos, denominadas de pili e fimbria, que estão relacionadas com a fixação no momento de reprodução e com a fixação das bactérias em superfícies, respetivamente.

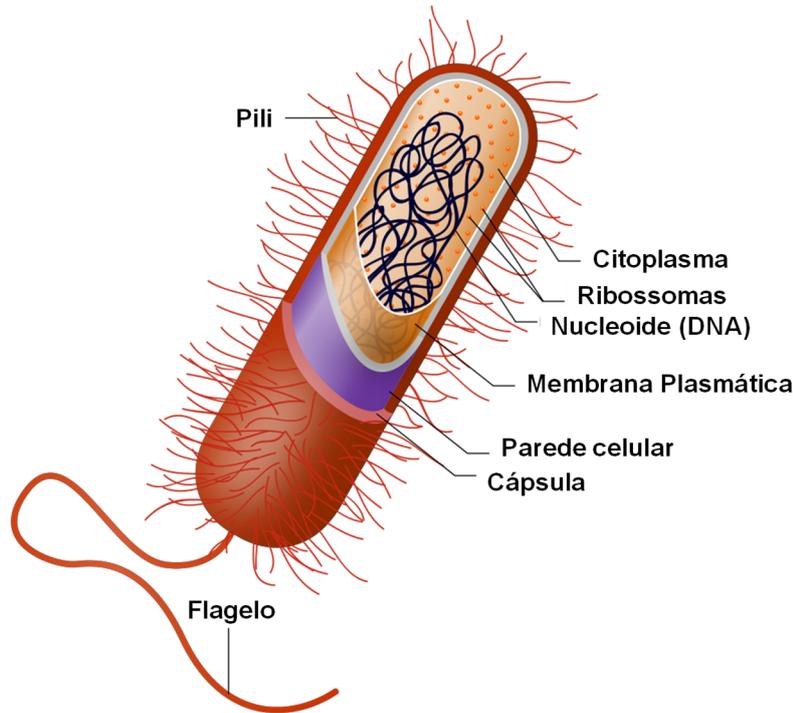


Figura 8.1. Representação esquemática da composição e estrutura de uma bactéria gram-positiva.

Embora as bactérias desenvolvam importantes papéis nas mais diversas áreas, entre elas na agricultura, como por exemplo na decomposição de matéria orgânica morta, na transformação de compostos nitrogenados em fertilizantes, bem como no controlo de pragas, também causam problemas. Diversos tipos de culturas agrícolas podem ser afetados por doenças bacterianas que prejudicam tanto o desenvolvimento da espécie, bem como a produtividade dos campos.

Uma bactéria que tem atraído a atenção de investigadores, agricultores e órgãos governamentais, devido sua importância biológica e económica, é a *Xylella fastidiosa*, uma bactéria Gram-negativa da classe *Gammaproteobacteria*, família das

Xanthomonadaceae, que ocorre limitada aos vasos do xilema de um grande número de árvores, plantas cultivadas, ornamentais e outras plantas silvestres [325].

A *Xylella fastidiosa* enquanto bactéria patogénica infeta plantas, causando uma variedade de doenças em mais de 100 espécies, incluindo videiras, oliveiras, frutas cítricas, amêndoas, café e muitas outras espécies. Dessa forma, representa uma séria ameaça agrícola e económica, já que é responsável por grandes perdas de produção em todo o mundo [326].

Descoberta pela primeira vez associada com a doença de Pierce em videiras nos Estados Unidos da América em 1973 [325], a *Xylella fastidiosa* só foi detetada na Europa em 2013, em oliveiras afetadas por extensa queima de folhas e morte em Itália [327]. A partir de então, muitos outros surtos foram observados em arbustos com flores plantados ornamentalmente em França (2015) [328], em oliveiras silvestres e cultivadas, amendoeiras, ameixeiras, cerejeiras, videiras, oleandros e plantas mediterrânicas em Espanha (2016) [329] e em plantas ornamentais na Alemanha (2016).

No início de 2019, a *Xylella fastidiosa* foi detetada pela primeira vez em Portugal, em plantas de lavanda localizadas no jardim do Zoo de Santo Inácio, em Vila Nova de Gaia. Recentemente, foi notificado que a contaminação tinha aumentado e se estendia agora a 13 focos noutros espaços públicos e jardins particulares daquele concelho, afetando dez espécies de plantas ornamentais e espontâneas [330].

Devido à sua importância pública como uma ameaça agrícola, estudos genómicos de diferentes plantas hospedeiras têm sido realizados na tentativa de obter informações sobre fatores de virulência e, conseqüentemente, o desenvolvimento de estratégias de controlo microbiológico e de gerenciamento da doença.

À face ao exposto e considerando a grande importância em desenvolver novas metodologias baseadas em biossensores eletroquímicos de DNA, em especial com DNA

bacterial, este trabalho teve como propósito, primeiramente, investigar o comportamento eletroquímico de oxidação do DNA de dupla hélice da *Xylella fastidiosa* (XF-dsDNA) adsorvido no GCE por voltametria de DP. A seguir, o mecanismo de interação entre XF-dsDNA e Cu(II), um potencial pesticida, foi investigado *in situ* para diferentes tempos de incubação por voltametria de DP e EIS utilizando biossensores eletroquímicos de XF-dsDNA. Similarmente, a interação entre o dsDNA do timo de vitela (CT-dsDNA) e Cu(II), um metal potencialmente tóxico quando encontrado em altas concentrações no organismo, foi também investigada utilizando biossensores eletroquímicos de CT-dsDNA.

8.2 Comportamento do Biossensor Eletroquímico de XF-dsDNA Bacterial

Embora a sequência genômica do DNA bacterial da *Xylella fastidiosa* seja conhecida [331, 332], não há relatos acerca do seu comportamento eletroquímico. Assim sendo, investigou-se inicialmente a eletroquímica direta do XF-dsDNA utilizando um biossensor eletroquímico XF-dsDNA por voltametria de DP. Os resultados obtidos foram comparados com o biossensor eletroquímico de CT-dsDNA, nas mesmas condições experimentais.

O voltamograma de DP para o biossensor eletroquímico de XF-dsDNA apresentou dois picos de oxidação correspondentes aos nucleosídeos do DNA, dGuo e dAdo, em $E_{pa} = +1,06$ V e $E_{pa} = +1,29$ V, respectivamente, **Figura 8.2 (—)**. Para o biossensor eletroquímico de CT-dsDNA os mesmos dois picos de oxidação, dGuo e dAdo, foram observados, em $E_{pa} = +0,99$ V e $E_{pa} = +1,26$ V, respectivamente, **Figura 8.2 (—)**.

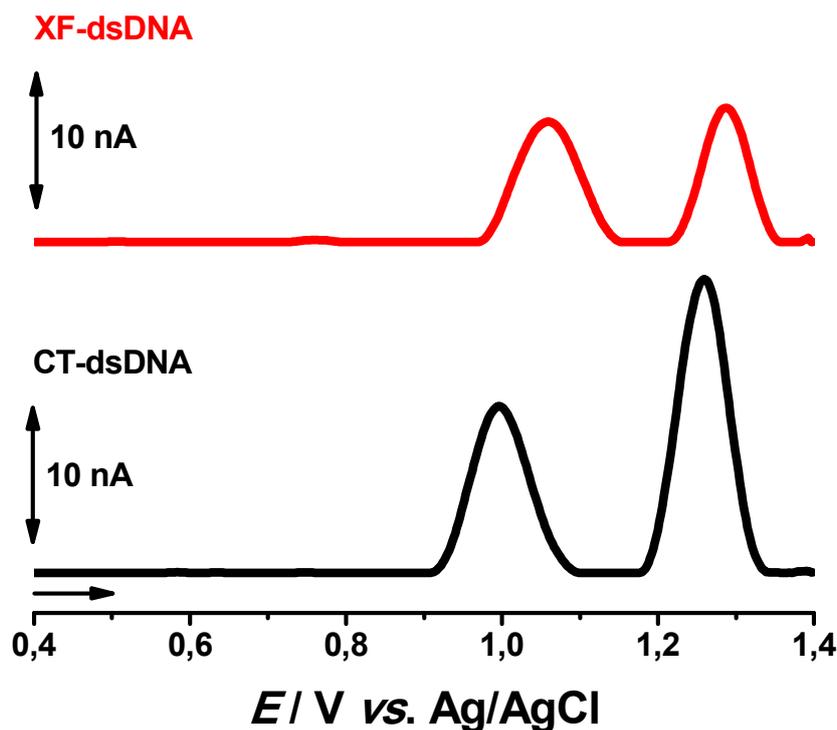


Figura 8.2. Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, para o biossensor eletroquímico de (—) XF-dsDNA e (—) CT-dsDNA, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

8.3 CV dos Biossensores Eletroquímicos de XF- e CT-dsDNA

Os biossensores eletroquímicos de XF-dsDNA e CT-dsDNA foram preparados como descrito anteriormente e utilizados para investigar a oxidação eletroquímica, bem como a interação XF-dsDNA-Cu(II) e CT-dsDNA-Cu(II), por voltametria de DP e EIS.

Os biossensores eletroquímicos de XF-dsDNA e CT-dsDNA também foram eletroquimicamente caracterizados por voltametria cíclica, usando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ como sonda redox, **Figura 8.3**. A imobilização das amostras de dsDNA na superfície do GCE causa alterações na corrente de pico e no potencial do processo redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ nos voltamogramas cíclicos, relacionada com a velocidade de transferência de elétrões.

O voltamograma cíclico numa solução de 1,0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ registrado para o GCE não modificado em tampão acetato 0,1 M pH 4,5, **Figura 8.3** (—), apresentou um

processo redox *quasi*-reversível, com uma separação entre os potenciais de pico de $\Delta E_p \sim 197$ mV.

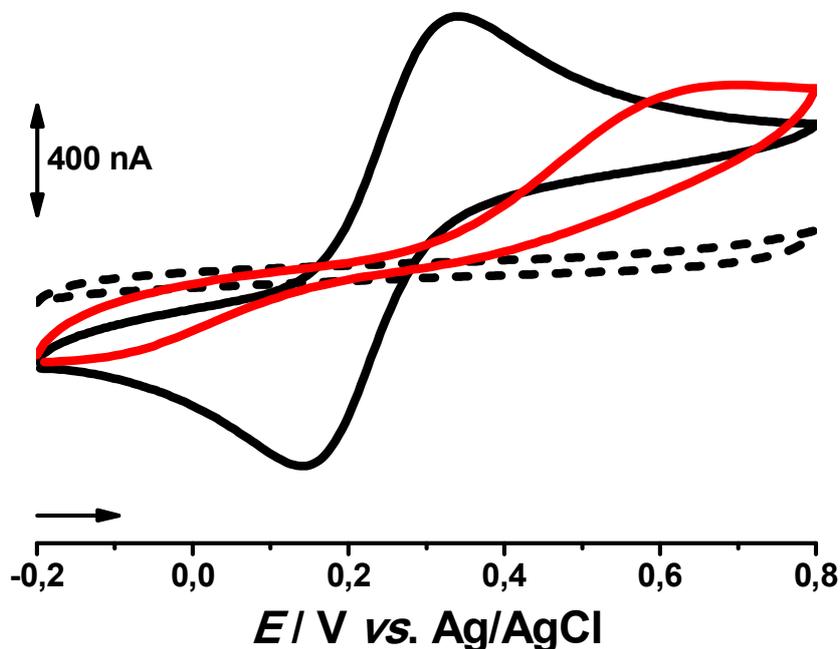


Figura 8.3. Voltamogramas cíclicos, em tampão acetato 0,1 M pH 4,5, obtido com o (---) GCE não modificado em eletrólito inerte, (—) GCE não modificado e com (—) biossensor eletroquímico de XF-dsDNA de monocamada em 1,0 mM $K_4[Fe(CN)_6]$, $\nu = 50$ mV s⁻¹.

O voltamograma cíclico obtido nas mesmas condições para o biossensor eletroquímico de XF-dsDNA mostrou que o processo de oxidação e redução do $[Fe(CN)_6]^{4-}$ se tornou irreversível e os picos foram deslocados para potenciais mais positivos e negativos, quando comparados com o voltamograma cíclico registrado com o GCE não modificado, resultando em uma separação entre os potenciais de pico de $\Delta E_p \sim 688$ mV, **Figura 8.3 (—)**. Utilizando o biossensor eletroquímico de CT-dsDNA foi observado um processo de oxidação irreversível para $[Fe(CN)_6]^{4-}$ com uma separação entre os potenciais de pico de $\Delta E_p \sim 431$ mV.

A influência da velocidade de varrimento no processo redox do $[Fe(CN)_6]^{4-}$ foi investigada para o biossensor eletroquímico de XF-dsDNA através do registo de

voltamogramas cíclicos a velocidades de varrimento entre 5 e 100 mV s^{-1} , **Figura 8.4.** A variação de ambas as correntes dos picos anódicos e catódicos foi acompanhada e revelaram uma linearidade com $\nu^{1/2}$, indicando um processo redox controlado por difusão [137].

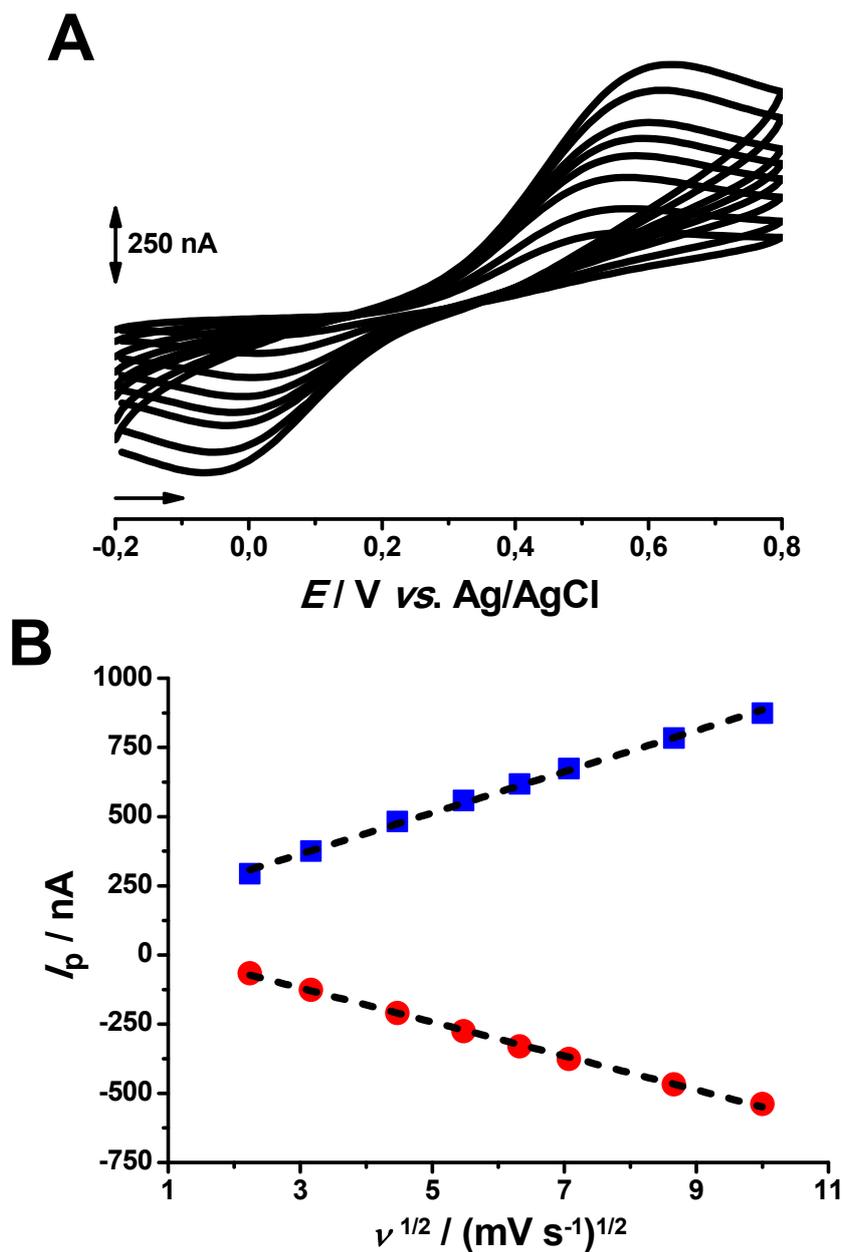


Figura 8.4. (A) Voltamogramas cíclicos, em tampão acetato 0,1 M pH 4,5, obtido com o biossensor eletroquímico de XF-dsDNA em 1,0 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ para diferentes velocidades de varrimento; (B) Dependência das correntes de pico com a raiz da velocidade de varrimento.

A concentração de espécie eletroativa na superfície do biossensor eletroquímico de XF-dsDNA determinada a partir do voltamograma cíclico obtido em solução tampão para baixa velocidade de varrimento (5 mV s^{-1}) [315] foi estimada em $1,10 \times 10^{-8} \text{ mol cm}^{-2}$, o que está de acordo com um filme fino de monocamada.

Semelhantemente, a influência da velocidade de varrimento no processo redox do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ foi avaliada para o biossensor eletroquímico de CT-dsDNA de multicamadas e indicou uma linearidade entre as correntes de pico anódicas e catódicas e $v^{1/2}$, a qual corresponde um processo controlado por difusão. Também, foi calculada a concentração de espécie eletroativa na superfície do biossensor eletroquímico de CT-dsDNA, em $1,36 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-2}$, em conformidade com um filme de multicamadas.

8.4 Investigação da Interação Cu(II)-dsDNA

Infelizmente, não há relatos de tratamentos para as doenças causadas pela *Xylella fastidiosa*. O principal objetivo é evitar sua disseminação, porém, quando as plantas são infetadas acabam por ser removidas e destruídas por incineração para interromper ou retardar a propagação da infecção. Outras doenças relacionadas a bactérias e fungos na agricultura, como cancro, míldio, pedrado, entre outras, costumam ser tratadas com agentes fitossanitários à base de cobre (sulfato tribásico de cobre, sulfato cuprocálcico, hidróxido cúprico, oxicloreto de cobre).

Em seres multicelulares, como humanos e animais, o cobre atua como cofator em diversas enzimas e desempenha um papel importante no desenvolvimento do sistema nervoso central. No entanto, níveis excessivos ou perturbação no metabolismo podem levar ao seu acúmulo e causar toxicidade intracelular, disfunção neuronal, falha crítica das funções biológicas e, por fim, a morte celular que contribui para doenças neurológicas [333], o que explica tamanha importância na investigação da interação Cu(II)-dsDNA.

Considerando a potencial ação do cobre como agente pesticida e como agente tóxico, investigou-se *in situ* a interação de Cu(II) com o DNA bacterial da *Xylella fastidiosa*, para diferentes tempos de incubação, por voltametria de DP e EIS utilizando biossensores eletroquímicos de XF-dsDNA. Do mesmo modo, a interação *in situ* Cu(II)-CT-dsDNA foi avaliada utilizando biossensores eletroquímicos de CT-dsDNA.

8.4.1 Interação Cu(II)-XF-dsDNA utilizando Biossensores Eletroquímicos de XF-dsDNA

8.4.1.1 Eletroquímica

A interação Cu(II)-XF-dsDNA foi acompanhada pela variação das intensidades de correntes dos picos de oxidação do XF-dsDNA nos biossensores eletroquímicos de XF-dsDNA de monocamada, no aparecimento de picos de oxidação de bases purínicas livres e de picos dos seus produtos de oxidação, registados após diferentes tempos de incubação e comparados com os resultados obtidos nas mesmas condições experimentais utilizando o biossensor eletroquímico de XF-dsDNA controle.

Um novo biossensor eletroquímico de dsDNA bacterial foi sempre preparado para cada experiência e incubado durante um período de tempo, 30, 60 e 120 minutos, em soluções contendo 1,0 mM Cu(II), em tampão acetato 0,1 M pH 4,5. Após interação, o biossensor eletroquímico de XF-dsDNA foi lavado com água desionizada, a fim de remover os íons Cu(II) que não interagiram, e transferido para tampão acetato 0,1 M pH 4,5, onde os voltamogramas de DP foram registados, **Figura 8.5**.

O voltamograma de DP obtido para o biossensor eletroquímico de XF-dsDNA após 30 minutos de incubação em Cu(II), **Figura 8.5 (—)**, não apresentou mudanças significativas na corrente do pico de oxidação da dGuo, em $E_{pa} = +1,06$ V, enquanto que para o pico de oxidação da dAdo, em $E_{pa} = +1,29$ V, um decréscimo foi observado. Para

um novo biossensor eletroquímico de XF-dsDNA incubado em Cu(II) por 60 minutos, **Figura 8.5** (- - -), ambos os picos de oxidação do XF-dsDNA decresceram, mostrando uma maior e efetiva interação entre Cu(II) e o DNA bacterial.

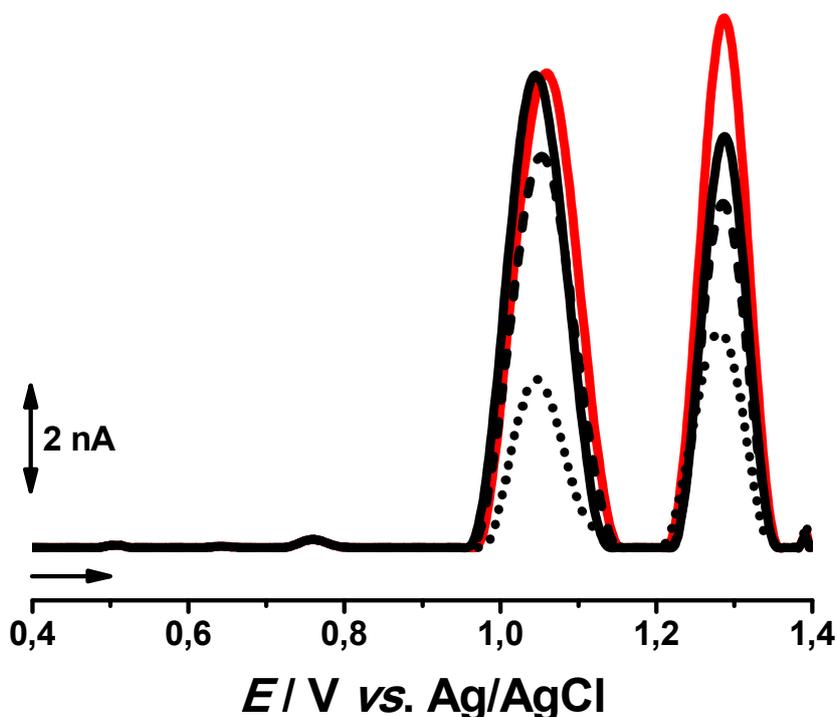


Figura 8.5. Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, para o (—) o biossensor eletroquímico de XF-dsDNA controle e após a incubação do biossensor eletroquímico de XF-dsDNA em 1,0 mM Cu(II) durante diferentes períodos de tempo: (—) 30, (- - -) 60 e (•••) 120 minutos, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Após 120 minutos de incubação em Cu(II), o voltamograma de DP registrado para o biossensor eletroquímico de XF-dsDNA, **Figura 8.5** (•••), mostrou uma grande diminuição da intensidade de corrente de ambos os picos de oxidação dGuo e dAdo, comparados ao biossensor eletroquímico de XF-dsDNA controle. De acordo com estes resultados, evidencia-se que uma mudança conformacional na estrutura do XF-dsDNA ocorreu, a qual está provavelmente relacionada com a ligação de Cu(II) ao dsDNA.

Estudos anteriores reportaram que, devido ao emparelhamento das bases dos resíduos de ácidos nucleicos, um número limitado de sítios de ligação está disponível na

dupla hélice do DNA. Dos sítios disponíveis, a interação de metais pode ser com os grupos fosfatos, afim de estabilizar a estrutura do dsDNA, enquanto que a ligação com as bases dos nucleotídeos desestabilizam a dupla hélice [160].

A natureza bioquímica dos sítios de ligação Cu(II)-dsDNA está relacionada com as propriedades do metal e ainda são desconhecidas, uma vez que, experiências de RMN de próton indicaram que Cu(II) se liga aos grupos fosfatos do DNA, dados de temperatura de fusão e viscosidade sugeriram a ligação de Cu(II) às bases no DNA, espectros de absorção indicaram a ligação do metal às bases pirimidinas do DNA e espectros no IR demonstraram uma ligação preferencial do Cu(II) pelas bases guanina e citosina de nucleosídeos [160, 334].

Assim, consoante aos resultados obtidos utilizando os biossensores eletroquímicos de XF-dsDNA, bem como os diferentes relatos na literatura, a interação Cu(II)-XF-dsDNA pode ser descrita pela formação de um complexo Cu(II)-dsDNA, no qual diferentes sítios de ligação no dsDNA são ocupados pelo íons metálicos. A formação do complexo Cu(II)-XF-dsDNA pode também ocasionar a mudança conformacional do dsDNA.

Por fim, experiências foram conduzidas para maiores tempos de incubações, porém não foram observadas mudanças significativas nas intensidades de correntes dos picos de oxidação do XF-dsDNA.

8.4.1.2 *Espectroscopia de Impedância Eletroquímica*

A interação Cu(II)-XF-dsDNA também foi avaliada por experiências de EIS utilizando biossensores eletroquímicos de XF-dsDNA. As mudanças nos espectros de impedância ao fim de cada período de incubação foram acompanhadas, as quais estão

relacionadas com os valores de resistência à transferência de elétrons a partir do diâmetro dos semicírculos nos gráficos de Nyquist.

Os gráficos de EIS no plano complexo para o biossensor eletroquímico de XF-dsDNA foram obtidos, em $E_{ap} = +0,25$ V, o qual corresponde ao potencial formal das espécies redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ obtido por voltametria cíclica, em tampão acetato 0,1 M pH 4,5, para 5,0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, conforme descrito na *Secção 2.13*, **Figura 8.6**.

A impedância no plano complexo obtida para o biossensor eletroquímico de XF-dsDNA, **Figura 8.6** (■) apresentou um aumento no semicírculo refletido no aumento na resistência de transferência de carga (R_{ct}), quando comparado com o GCE não modificado **Figura 8.6** (★), devido a imobilização de moléculas de XF-dsDNA, a qual dificulta a transferência de carga do processo redox da sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$.

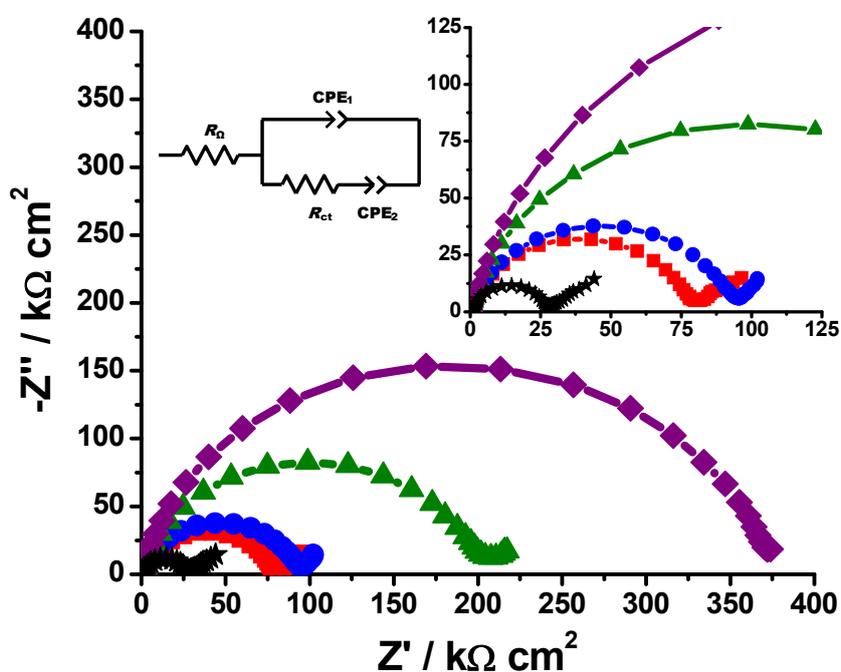


Figura 8.6. Espectros de EIS no plano complexo, em tampão acetato 0,1 M pH 4,5, para 5,0 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, com a aplicação de potencial, $E_{ap} = +0,25$ V: (★) GCE não modificado, biossensor eletroquímico de XF-dsDNA (■) controle e após a incubação em 1,0 mM Cu(II) durante diferentes períodos de tempo: 30 (●), 60 (▲) e 120 (◆) minutos. Circuito elétrico equivalente usado no ajuste dos dados de EIS.

Para o biossensor eletroquímico de XF-dsDNA incubado por 30 minutos em Cu(II), **Figura 8.6** (●), um pequeno aumento da R_{ct} foi observado, o qual pode ser explicado pela ligação do metal à estrutura do dsDNA, formando o complexo Cu(II)-XF-dsDNA na superfície do eletrodo. O pouco incremento observado no semicírculo e na R_{ct} , após 30 minutos de incubação, está em conformidade com o pequeno decréscimo nas intensidades de corrente dos picos de oxidação da dGuo e dAdo observados nos voltamogramas de DP.

Para os biossensores eletroquímicos de XF-dsDNA incubados em Cu(II) por 60 e 120 minutos, **Figura 8.6** (▲) e (◆), foi observado um progressivo aumento na R_{ct} , corroborando com o facto que uma mudança conformacional na estrutura do XF-dsDNA ocorreu, devido a ligação de Cu(II) ao dsDNA.

Os resultados das EIS para o biossensor eletroquímico de XF-dsDNA controlo e após os diferentes tempos de incubação foram ajustados aos circuitos elétricos equivalentes apropriados e os valores obtidos para seus parâmetros estão sumarizados na **Tabela 8.1** e são mostrados como curvas contínuas nos espectros, **Figura 8.6**.

8.4.2 Interação Cu(II)-CT-dsDNA utilizando Biossensores Eletroquímicos de CT-dsDNA

8.4.2.1 Eletroquímica

Os biossensores eletroquímicos de CT-dsDNA de multicamadas foram preparados conforme descrito na *Secção 2.5.2* e incubados durante 30, 60 e 120 minutos, em soluções contendo 50 μ M Cu(II), em tampão acetato 0,1 M pH 4,5. Ao fim de cada incubação, os biossensores eletroquímicos de CT-dsDNA foram lavados com água desionizada, para remover os iões Cu(II) que não interagiram, e transferidos para a célula

eletroquímica com tampão acetato 0,1 M pH 4,5, onde os voltamogramas de DP foram obtidos **Figura 8.7**.

O voltamograma de DP obtido para o biossensor eletroquímico de CT-dsDNA após 30 minutos de incubação em Cu(II), **Figura 8.7 (—)**, apresentou um grande decréscimo de ambas as correntes dos picos de oxidação da dGuo e dAdo, em $E_{pa} = +0,99$ V e $E_{pa} = +1,26$ V, respetivamente. Comparando a incubação utilizando o biossensor eletroquímico de XF-dsDNA, o biossensor eletroquímico de CT-dsDNA mostrou-se mais sensível à interação Cu(II)-dsDNA, mesmo com uma concentração de Cu(II) inferior.

Novos biossensores eletroquímicos de CT-dsDNA foram incubados em Cu(II) por 60 e 120 minutos, **Figura 8.7 (- - -)** e **(•••)**, e revelaram uma progressiva e expressiva diminuição da intensidade de correntes de ambos os picos de oxidação do CT-dsDNA.

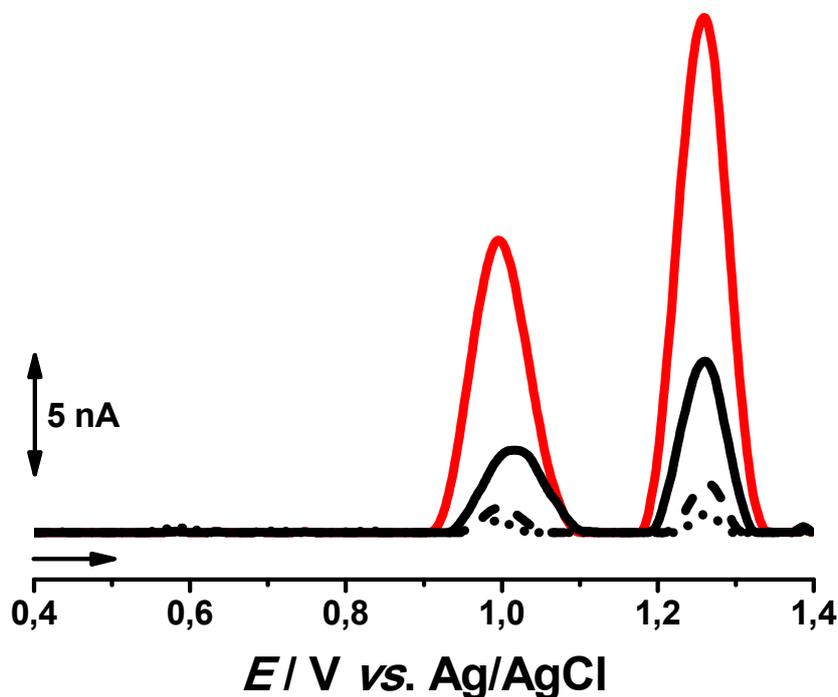


Figura 8.7. Voltamogramas de DP, com linha de base corrigida, em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,5, para o (—) o biossensor eletroquímico de XF-dsDNA controlo e após a incubação do biossensor eletroquímico de XF-dsDNA em 1,0 mM Cu(II) durante diferentes períodos de tempo: (—) 30, (- - -) 60 e (•••) 120 minutos, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Conforme observado, a interação CT-dsDNA também ocasionou mudanças conformacionais na estrutura do CT-dsDNA, as quais estão relacionadas com a formação do complexo Cu(II)-dsDNA. Comparativamente à interação Cu(II)-XF-dsDNA, a interação Cu(II)-CT-dsDNA mostrou-se mais efetiva, uma vez que a variação das correntes dos picos de oxidação do dsDNA foi maior, mesmo com uma concentração de Cu(II) inferior.

8.4.2.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

Finalmente, a interação Cu(II)-CT-dsDNA foi investigada por experiências de EIS utilizando biossensores eletroquímicos de CT-dsDNA. As experiências foram realizadas semelhantemente às utilizando biossensores eletroquímicos de XF-dsDNA e os valores de resistência à transferência de elétrons foram analisados a partir do diâmetro dos semicírculos nos gráficos de Nyquist.

Como esperado, a impedância no plano complexo obtida para o biossensor eletroquímico de CT-dsDNA, **Figura 8.8 (■)**, apresentou um aumento no semicírculo e conseqüentemente na resistência de transferência de carga (R_{ct}), quando comparado com o GCE não modificado **Figura 8.8 (★)**, a qual está relacionada a imobilização de CT-dsDNA na superfície do GCE.

Para o biossensor eletroquímico de CT-dsDNA incubado por 30 minutos em Cu(II), **Figura 8.8 (●)**, um aumento da R_{ct} foi observado, devido a ligação do Cu(II) ao CT-dsDNA imobilizado na superfície do GCE, formando o complexo, Cu(II)-CT-dsDNA, o qual dificulta a transferência de carga da sonda redox. As impedâncias no plano complexo obtidas para o biossensor eletroquímico de CT-dsDNA após 60 e 120 minutos de incubação em Cu(II), **Figura 8.8 (▲)** e **(◆)**, mostrou um progressivo aumento na R_{ct} , consolidando a forte interação entre Cu(II) e CT-dsDNA.

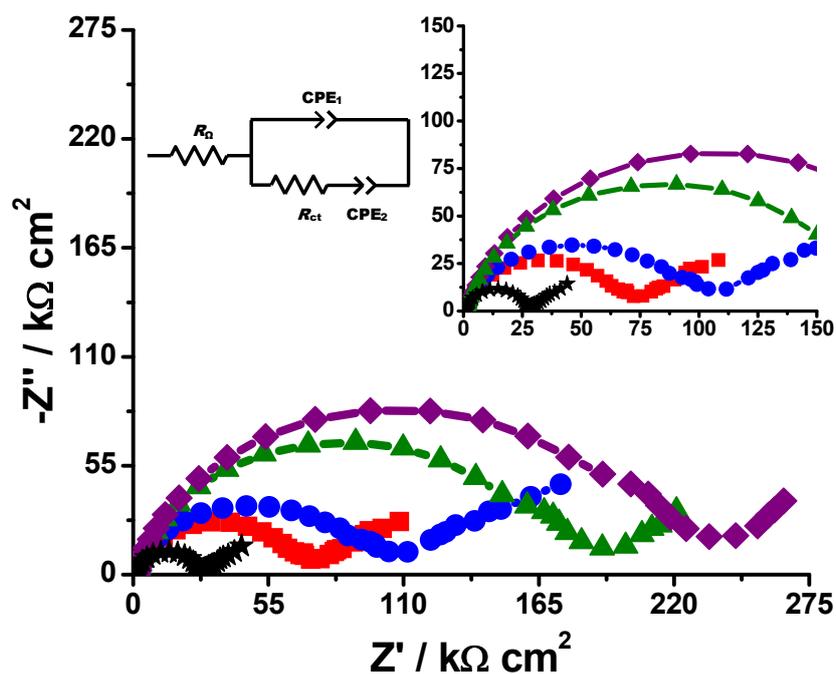


Figura 8.8. Espectros de EIS no plano complexo, em tampão acetato 0,1 M pH 4,5, para 5,0 mM $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$, com a aplicação de potencial, $E_{ap} = + 0,25$ V: (★) GCE não modificado, biossensor eletroquímico de CT-dsDNA (■) controle e após a incubação em 1,0 mM Cu(II) durante diferente períodos de tempo: 30 (●), 60 (▲) e 120 (◆) minutos. Circuito elétrico equivalente usado no ajuste dos dados de EIS.

Os resultados das EIS para o biossensor eletroquímico de CT-dsDNA controle e após os diferentes tempos de incubação foram ajustados aos circuitos elétricos equivalentes apropriados e os valores obtidos para seus parâmetros estão sumarizados na **Tabela 8.1** e são mostrados como curvas contínuas nos espectros, **Figura 8.8**.

Os resultados obtidos utilizando EIS mostraram-se complementares e similares aos obtidos por voltametria de DP, no que se diz a respeito da intensidade da interação Cu(II)-dsDNA para ambos os biossensores eletroquímicos de XF-dsDNA e CT-dsDNA.

Tabela 8.1. Parâmetros de Randles obtidos para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ a partir dos espectros de EIS no plano complexo para o biossensor eletroquímico de XF-dsDNA e CT-dsDNA, e após a incubação destes em Cu(II) por diferentes períodos de tempo.

Biossensor Eletroquímico	R_{Ω} ($\Omega \text{ cm}^2$)	CPE_1 ($\mu\text{F cm}^{-2} \text{ S}^{\alpha-1}$)	α_1	R_{ct} ($\text{k}\Omega \text{ cm}^2$)	CPE_2 ($\mu\text{F cm}^{-2} \text{ S}^{\alpha-1}$)	α_2
XF-dsDNA controle	953 ± 10	0,15 ± 0,01	0,89 ± 0,01	75 ± 10	127 ± 12	0,43 ± 0,04
Cu(II)-XF-dsDNA (30 min)	920 ± 20	0,17 ± 0,01	0,88 ± 0,01	91 ± 10	196 ± 80	0,55 ± 0,17
Cu(II)-XF-dsDNA (60 min)	822 ± 65	0,30 ± 0,01	0,89 ± 0,02	191 ± 29	82 ± 20	0,35 ± 0,71
Cu(II)-XF-dsDNA (120 min)	772 ± 10	0,56 ± 0,06	0,89 ± 0,02	368 ± 10	334 ± 30	0,70 ± 0,35
Cu(II)-CT-dsDNA controle	1245 ± 155	0,28 ± 0,12	0,95 ± 0,06	45 ± 33	32 ± 35	0,23 ± 0,26
Cu(II)-CT-dsDNA (30 min)	857 ± 62	0,25 ± 0,04	0,88 ± 0,02	70 ± 16	21 ± 10	0,26 ± 0,09
Cu(II)-CT-dsDNA (60 min)	1281 ± 22	0,59 ± 0,02	0,87 ± 0,01	150 ± 22	31 ± 20	0,23 ± 0,13
Cu(II)-CT-dsDNA (120 min)	1378 ± 19	0,56 ± 0,02	0,87 ± 0,01	164 ± 52	16 ± 13	0,26 ± 0,11

8.5 Considerações Finais

A *Xylella fastidiosa* é uma bactéria que tem causado alarme ao redor do mundo, em especial em Portugal por conta do seu recente aparecimento, que afeta as culturas agrícolas e espécies florestais de grande importância económica. Embora diversas medidas de precaução tenham sido tomadas pelo governo português, a bactéria foi detetada no início de 2019 e já se propagou para outras plantas.

Considerando a potencial ação de cobre como agente fitossanitário no tratamento de diversas doenças relacionadas com bactérias e fungos na agricultura, investigou-se a interação *in situ* Cu(II)-XF-dsDNA, por voltametria de DP e EIS, utilizando biossensores eletroquímicos de XF-dsDNA. Similarmente, a interação *in situ* Cu(II)-CT-dsDNA foi avaliada utilizando biossensores eletroquímicos de CT-dsDNA.

Conforme os resultados obtidos utilizando biossensores eletroquímicos de XF-dsDNA e CT-dsDNA, o mecanismo de interação Cu(II)-dsDNA pode ser descrito pela formação de um complexo Cu(II)-dsDNA, no qual diferentes sítios de ligação no dsDNA são ocupados pelo íons metálicos, causando uma mudança conformacional na estrutura da dupla hélice do DNA.

Nas condições experimentais utilizadas, os picos de oxidação das bases livres, Gua e Ade, e o pico de oxidação dos biomarcadores do dano oxidativo do DNA, 8-oxoGua e 2,8-oxoAde, em $E_{pa} = +0,45$ V, não foram observados, indicando que Cu(II) não induziu danos à estrutura do XF-dsDNA e do CT-dsDNA.

Por último, destaca-se a importância na investigação e desenvolvimento de biossensores eletroquímicos de DNA bacterial e na avaliação da interação destes com potenciais agentes pesticidas, afim de compreender o mecanismo molecular de interação e possibilitar a descoberta de tratamentos para as doenças causadas por essas bactérias ou reduzir seus impactos negativos na agricultura.

CAPÍTULO 9

Conclusões

O progresso alcançado nos últimos anos devido às inúmeras investigações acerca dos mecanismos de interação fármaco-DNA e proteína-DNA, utilizando biossensores eletroquímicos de DNA, resultou no aumento do desenvolvimento de tecnologias eletroquímicas avançadas para análise biomédica de infeções de diferentes etiologias, diagnóstico e tratamento do cancro, estudo de doenças neuropatológicas e genéticas, análise ambiental e controlo de qualidade de alimentos e bebidas.

Esta tese de doutoramento teve por objetivo investigar o mecanismo de interação de fármacos e proteínas com DNA detetados *in situ* com biossensores eletroquímicos modificados com nanoestruturas de dsDNA. Como ponto de partida, o comportamento eletroquímico dos fármacos e proteínas utilizados foi investigado por meio de técnicas eletroquímicas. A interação entre o antiacne isotretinoína (13-*cis*-RA), o antibiótico daptomicina (DPT), o antileishmanial miltefosina (MTF), o antidiabético (MET), o anticorpo monoclonal anticancro nivolumab (NIVO) e dsDNA foi avaliada, assim como a interação do dsDNA bacterial da *Xylella fastidiosa* (XF-dsDNA) com o potencial agente pesticida Cu(II), bem como o DNA do timo de vitela (CT-dsDNA) e Cu(II). Para tal,

foram utilizadas as técnicas voltametria de impulso diferencial (DP), espectrofotometria no UV-Visível (UV-Vis), eletroforese em gel, espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e/ou microbalança de cristal de quartzo (QCM).

Os métodos eletroquímicos mostraram-se eficientes tanto na investigação dos mecanismos de transferência de elétrons nos fármacos e proteína, como na investigação da interação destes com o DNA em solução e com os biossensores eletroquímicos de DNA. Considerando as diversas vantagens que os métodos eletroquímicos apresentam, a detecção e quantificação rápida e simultânea, com custos reduzidos e sem a utilização de solventes orgânicos, ficou demonstrado serem excelentes ferramentas para a caracterização e avaliação dos mecanismos de interação de fármacos e proteínas com DNA. Estes métodos aliados com outras técnicas podem potenciar o desenvolvimento e a caracterização das propriedades de novas moléculas de interesse farmacológico, com elevada eficácia e maior seletividade.

As metodologias utilizadas para o desenvolvimento dos biossensores eletroquímicos de dsDNA de camada fina na superfície do eletrodo de diamante dopado com boro (BDDE), e de monocamada e multicamadas na superfície do eletrodo de carbono vítreo (GCE) mostraram-se excelentes, uma vez que foi possível investigar os mecanismos de interação fármaco-dsDNA e proteína-dsDNA, e detetar mudanças conformacionais na estrutura do dsDNA relacionadas com a condensação e/ou agregação, distorção e/ou abertura da dupla hélice, ligação das moléculas nos sulcos do DNA e libertação de resíduos de guanina e adenina, de acordo com a molécula alvo.

O biossensor eletroquímico de dsDNA bacterial da *Xylella fastidiosa* foi desenvolvido e investigado pela primeira vez. Além deste biossensor eletroquímico ser apresentado como uma nova alternativa na investigação de biossensores, os resultados obtidos sugerem uma excelente metodologia para compreensão da interação do DNA

bacterial com agentes inseticidas, acaricidas, rodenticidas, fungicidas, herbicidas, antibióticos e bactericidas, e outras formas de vida animal ou vegetal prejudiciais à saúde pública e à agricultura.

Numa perspectiva relacionada com o melhoramento da qualidade de vida, os biossensores eletroquímicos de DNA utilizados neste trabalho permitiram a investigação rápida, *in situ* e em tempo real dos efeitos de diversas fontes de dano sobre o material genómico. Ademais, os estudos realizados poderão contribuir para uma melhor compreensão dos processos de interação que ocorrem *in vivo*, possibilitar o desenvolvimento de novas moléculas com potencial farmacológico e impulsionar o desenvolvimento de novos dispositivos voltados para a indústria, área da saúde, agricultura, baseados na detecção eletroquímica do DNA.

Considerando o crescente investimento financeiro no mercado de biossensores e o sucesso das plataformas de sensores eletroquímicos disponíveis comercialmente, em um futuro próximo os biossensores eletroquímicos de DNA terão a sua aplicação e ganharão relevância em diagnósticos clínicos, ambientais e agrícolas. Assim sendo, a evolução da área de investigação para a viabilidade comercial depende de mais investigações fundamentais, seja nos métodos de preparação de amostras, no desenvolvimento, caracterização e miniaturização de dispositivos com DNA integrado, e na interpretação dos resultados provenientes da interação do DNA com as moléculas alvo.

Finalmente, algumas perspectivas podem ser sugeridas para este e novos trabalhos. Para um futuro próximo, é importante e necessário investigar a interação do DNA bacterial da *Xylella fastidiosa* com outros agentes fitossanitários utilizando os biossensores eletroquímicos de XF-dsDNA desenvolvidos, bem como a preparação de diferentes biossensores eletroquímicos com DNA de bactérias, como a *Erwinia*

amylovora e as *Pseudomonas syringae*, as quais têm afetado as plantações portuguesas, e investigar as suas interações com Cu(II) e outros pesticidas.

Em uma perspectiva a longo prazo, sugere-se a investigação dos mecanismos de oxidação e de interação de proteínas recentemente descobertas, como a proteína humana RBBP6, a qual atua no combate do vírus Ébola, com DNA; o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos baseados no RNA de vírus, como dengue e Zika, que causam doenças graves principalmente em populações marginalizadas; o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos de dsDNA em elétrodos descartáveis superficiais; e a conjugação destes com um equipamento eletrônico portátil de leitura.

CAPÍTULO 10

Referências

- [1] R. Dahm, Friedrich Miescher and the discovery of DNA, *Developmental biology*, 278 (2005) 274-288.
- [2] F. Griffith, The Significance of Pneumococcal Types, *The Journal of hygiene*, 27 (1928) 113-159.
- [3] M.H. Dawson, R.H. Sia, In Vitro Transformation of Pneumococcal Types : I. A Technique for Inducing Transformation of Pneumococcal Types in Vitro, *The Journal of experimental medicine*, 54 (1931) 681-699.
- [4] O.T. Avery, C.M. Macleod, M. McCarty, Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types: Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type III, *The Journal of experimental medicine*, 79 (1944) 137-158.
- [5] M. Chase, A.D. Hershey, Independent functions of viral proteins and nucleic acid in growth of bacteriophage, *The Journal of General Physiology*, 36 (1952) 39-56.
- [6] J.D. Watson, F.H.C. Crick, Molecular Structure of Nucleic Acids - a Structure for Deoxyribose Nucleic Acid, *Nature*, 171 (1953) 737-738.
- [7] M.H.F. Wilkins, A.R. Stokes, H.R. Wilson, Molecular Structure of Deoxypentose Nucleic Acids, *Nature*, 171 (1953) 738-740.
- [8] C.V. Barra, A.V.G. Netto, Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalintercaladores, *Revista Virtual de Química*, 7 (2015) 1998-2016.
- [9] K. Masuda, T. Nakata, K. Tamagake, Atomic force microscope of drug-DNA interaction, *Nucleic acids symposium series*, (2000) 63-64.
- [10] V. Cassina, D. Seruggia, G.L. Beretta, D. Salerno, D. Brogioli, S. Manzini, F. Zunino, F. Mantegazza, Atomic force microscopy study of DNA conformation in the presence of drugs, *European biophysics journal: EBJ*, 40 (2011) 59-68.
- [11] S.C. Oliveira, A.M. Chiorcea-Paquim, S.M. Ribeiro, A.T. Melo, M. Vivan, A.M. Oliveira-Brett, In situ electrochemical and AFM study of thalidomide-DNA interaction, *Bioelectrochemistry*, 76 (2009) 201-207.
- [12] F. Araya, G. Huchet, I. McGroarty, G.G. Skellern, R.D. Waigh, Capillary electrophoresis for studying drug-DNA interactions, *Methods*, 42 (2007) 141-149.
- [13] L.I.N. Tome, N.V. Marques, V.C. Diculescu, A.M. Oliveira-Brett, In situ dsDNA-bevacizumab anticancer monoclonal antibody interaction electrochemical evaluation, *Analytica Chimica Acta*, 898 (2015) 28-33.
- [14] V.C. Diculescu, A.M. Oliveira-Brett, In situ electrochemical evaluation of dsDNA interaction with the anticancer drug danusertib nitrenium radical product using the DNA-electrochemical biosensor, *Bioelectrochemistry*, 107 (2016) 50-57.
- [15] N. Shi, V.M. Ugaz, Functional analysis of DNA and Chromatin, in: J.C. Stockert, J. Espada, A. Blázquez-Castro (Eds.) *Using microchip gel electrophoresis to probe DNA-Drug binding interactions*, Humana Press, New York, 2014, pp. 13-24.
- [16] C. Silvestri, J.S. Brodbelt, Tandem mass spectrometry for characterization of covalent adducts of DNA with anticancer therapeutics, *Mass spectrometry reviews*, 32 (2013) 247-266.
- [17] Y. Hari, A. Nyakas, S.R. Stucki, S. Schurch, Elucidation of nucleic acid-drug interactions by tandem mass spectrometry, *Chimia*, 68 (2014) 164-167.
- [18] P.S. Dorraji, F. Jalali, Investigation of the interaction of sertraline with calf thymus DNA by spectroscopic methods, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24 (2013) 939-945.

- [19] N. Li, Y. Ma, C. Yang, L. Guo, X. Yang, Interaction of anticancer drug mitoxantrone with DNA analyzed by electrochemical and spectroscopic methods, *Biophysical Chemistry*, 116 (2005) 199-205.
- [20] W. Zhong, J.S. Yu, Y. Liang, Chlorobenzylidene-herring sperm DNA interaction: binding mode and thermodynamic studies, *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 59 (2003) 1281-1288.
- [21] Y. Temerk, M. Ibrahim, H. Ibrahim, M. Kotb, Interactions of an anticancer drug Formestane with single and double stranded DNA at physiological conditions, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 149 (2015) 27-36.
- [22] S. Agarwal, D.K. Jangir, R. Mehrotra, Spectroscopic studies of the effects of anticancer drug mitoxantrone interaction with calf-thymus DNA, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 120 (2013) 177-182.
- [23] J.S. Al-Otaibiad, P.T. Spittleb, T.M.E. Gogary, Interaction of anthraquinone anti-cancer drugs with DNA: Experimental and computational quantum chemical study, *Journal of Molecular Structure*, 1127 (2017) 751-760.
- [24] W. Zhong, J.S. Yu, Y. Liang, K. Fan, L. Lai, Chlorobenzylidene-calf thymus DNA interaction II: circular dichroism and nuclear magnetic resonance studies, *Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 60 (2004) 2985-2992.
- [25] S. Agarwal, D.K. Jangir, P. Singh, R. Mehrotra, Spectroscopic analysis of the interaction of lomustine with calf thymus DNA, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 130 (2014) 281-286.
- [26] L.P. Lin, L.S. Huang, C.W. Lin, C.K. Lee, J.L. Chen, S.M. Hsu, S. Lin, Determination of binding constant of DNA-binding drug to target DNA by surface plasmon resonance biosensor technology, *Current drug targets. Immune, Endocrine and Metabolic Disorders*, 5 (2005) 61-72.
- [27] V.C. Diculescu, A.M. Chiorcea-Paquim, A.M. Oliveira-Brett, Applications of a DNA-electrochemical biosensor, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 79 (2016) 23-36.
- [28] M. Fojta, A. Danhel, L. Havran, V. Vyskocil, Recent progress in electrochemical sensors and assays for DNA damage and repair, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 79 (2016) 160-167.
- [29] B. Rafique, M. Iqbal, T. Mehmood, M.A. Shaheen, Electrochemical DNA biosensors: a review, *Sensor Review*, (2018).
- [30] S. Rauf, J.J. Gooding, K. Akhtar, M.A. Ghauri, M. Rahman, M.A. Anwar, A.M. Khalid, Electrochemical approach of anticancer drugs--DNA interaction, *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, 37 (2005) 205-217.
- [31] M.S. Cooke, M.D. Evans, M. Dizdaroglu, J. Lunec, Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease, *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17 (2003) 1195-1214.
- [32] D.C. Malins, N.L. Polissar, S.J. Gunselman, Progression of human breast cancers to the metastatic state is linked to hydroxyl radical-induced DNA damage, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (1996) 2557-2563.
- [33] S. Loft, P. Høgh Danielsen, L. Mikkelsen, L. Risom, L. Forchhammer, P. Møller, Biomarkers of oxidative damage to DNA and repair, *Biochemical Society transactions*, 36 (2008) 1071-1076.
- [34] R.A. Floyd, J.J. Watson, J. Harris, M. West, P.K. Wong, Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, hydroxyl free radical adduct of DNA in granulocytes exposed to the tumor promoter, tetradecanoylphorbolacetate, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 137 (1986) 841-846.

- [35] S. Shibutani, M. Takeshita, A.P. Grollman, Insertion of Specific Bases during DNA-Synthesis Past the Oxidation-Damaged Base 8-Oxodg, *Nature*, 349 (1991) 431-434.
- [36] S.P. Hussain, C.C. Harris, Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes, *Cancer Research*, 58 (1998) 4023-4037.
- [37] J.L. Ravanat, P. Di Mascio, G.R. Martinez, M.H. Medeiros, J. Cadet, Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA, *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (2000) 40601-40604.
- [38] B.N. Ames, Endogenous DNA damage as related to cancer and aging, *Mutation Research*, 214 (1989) 41-46.
- [39] R.C. Gupta, W.K. Lutz, Background DNA damage for endogenous and unavoidable exogenous carcinogens: a basis for spontaneous cancer incidence?, *Mutation Research*, 424 (1999) 1-8.
- [40] P. Singhal, W.G. Kuhr, Direct electrochemical detection of purine- and pyrimidine based nucleotides with sinusoidal voltammetry, *Analytical Chemistry*, 69 (1997) 3552-3557.
- [41] J. Wang, L. Chen, M. Chicharro, Trace measurements of nucleic acids using flow injection amperometry, *Analytica Chimica Acta*, 319 (1996) 347-352.
- [42] P. Singhal, W.G. Kuhr, Ultrasensitive voltammetric detection of underivatized oligonucleotides and DNA, *Analytical Chemistry*, 69 (1997) 4828-4832.
- [43] E. Palecek, Fifty Years of Nucleic Acid Electrochemistry, *Electroanalysis*, 21 (2009) 239-251.
- [44] L. Trnkova, R. Kizek, O. Dracka, Elimination voltammetry of nucleic acids on silver electrodes, *Bioelectrochemistry*, 55 (2002) 131-133.
- [45] L. Trnkova, Electrochemical behavior of DNA at a silver electrode studied by cyclic and elimination voltammetry, *Talanta*, 56 (2002) 887-894.
- [46] G. Dryhurst, Adsorption of Guanine and Guanosine at Pyrolytic Graphite Electrode - Implications for Determination of Guanine in Presence of Guanosine, *Analytica Chimica Acta*, 57 (1971) 137-149.
- [47] G. Dryhurst, P.J. Elving, Electrochemical Oxidation of Adenine - Reaction Products and Mechanisms, *Journal of Electrochemical Society*, 115 (1968) 1014-1020.
- [48] T. Yao, T. Wasa, S. Musha, Anodic Voltammetry of Deoxyribonucleic-Acid at a Glassy Carbon Electrode, *Bulletin of the Chemical Society Japan*, 51 (1978) 1235-1236.
- [49] A.M.O. Brett, F.M. Matysik, Voltammetric and sonovoltammetric studies on the oxidation of thymine and cytosine at a glassy carbon electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 429 (1997) 95-99.
- [50] A.M.O. Brett, F.M. Matysik, Sonoelectrochemical studies of guanine and guanosine, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 42 (1997) 111-116.
- [51] A.M. Oliveira-Brett, J.A.P. Piedade, L.A. Silva, V.C. Diculescu, Voltammetric determination of all DNA nucleotides, *Analytical Biochemistry*, 332 (2004) 321-329.
- [52] C. Prado, G.U. Flechsig, P. Grundler, J.S. Foord, F. Marken, R.G. Compton, Electrochemical analysis of nucleic acids at boron-doped diamond electrodes, *Analyst*, 127 (2002) 329-332.
- [53] A. Apilux, M. Tabata, O. Chailapakul, Electrochemical behaviors of native and thermally denatured fish DNA in the presence of cytosine derivatives and porphyrin by cyclic voltammetry using boron-doped diamond electrode, *Bioelectrochemistry*, 70 (2007) 435-439.
- [54] S.C.B. Oliveira, A.M. Oliveira-Brett, 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 (2010) 60-66.

[55] E.E. Ferapontova, E. Domínguez, Direct Electrochemical Oxidation of DNA on Polycrystalline Gold Electrodes, *Electroanalysis*, 15 (2003) 629-634.

[56] M.V.B. Zanoni, E.I. Rogers, C. Hardacre, R.G. Compton, The electrochemical reduction of the purines guanine and adenine at platinum electrodes in several room temperature ionic liquids, *Analytica Chimica Acta*, 5 (2010) 115-121.

[57] A.M. Oliveira-Brett, F.M. Matysik, Voltammetric and sonovoltammetric studies on the oxidation of thymine and cytosine at a glassy carbon electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 429 (1997) 95-99.

[58] S.S. Wallace, Biological consequences of free radical-damaged DNA bases, *Free Radical Biology & Medicine*, 33 (2002) 1-14.

[59] J. Cadet, T. Douki, D. Gasparutto, J.L. Ravanat, Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features, *Mutation research*, 531 (2003) 5-23.

[60] A.M.O. Brett, J.A.P. Piedade, S.H.P. Serrano, Electrochemical oxidation of 8-oxoguanine, *Electroanalysis*, 12 (2000) 969-973.

[61] A.M. Oliveira-Brett, V. Diculescu, J.A.P. Piedade, Electrochemical oxidation mechanism of guanine and adenine using a glassy carbon microelectrode, *Bioelectrochemistry*, 55 (2002) 61-62.

[62] A. Brotons, F.J. Vidal-Iglesias, J. Solla-Gullon, J. Iniesta, Carbon materials for the electrooxidation of nucleobases, nucleosides and nucleotides toward cytosine methylation detection: a review, *Analytical Methods*, 8 (2016) 702-715.

[63] J.R. Wagner, J. Cadet, Oxidation reactions of cytosine DNA components by hydroxyl radical and one-electron oxidants in aerated aqueous solutions, *Accounts of Chemical Research*, 43 (2010) 564-571.

[64] A.M. Chiorcea-Paquim, J.A. Piedade, R. Wombacher, A. Jaschke, A.M. Oliveira-Brett, Atomic force microscopy and anodic voltammetry characterization of a 49-mer diels-alderase ribozyme, *Analytical Chemistry*, 78 (2006) 8256-8264.

[65] C.M.A. Brett, A.M.O. Brett, S.H.P. Serrano, On the Adsorption and Electrochemical Oxidation of DNA at Glassy-Carbon Electrodes, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 366 (1994) 225-231.

[66] C.M.A. Brett, A.M. Oliveira-Brett, S.H.P. Serrano, On the adsorption and electrochemical oxidation of DNA at glassy carbon electrodes, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 366 (1994) 225-231.

[67] S.C.B. Oliveira, A.M. Oliveira-Brett, DNA-Electrochemical Biosensors: AFM Surface Characterisation and Application to Detection of In Situ Oxidative Damage to DNA, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 13 (2010) 628-640.

[68] V.C. Diculescu, J.A. Piedade, A.M. Oliveira-Brett, Electrochemical behaviour of 2,8-dihydroxyadenine at a glassy carbon electrode, *Bioelectrochemistry*, 70 (2007) 141-146.

[69] F. Prat, K.N. Houk, C.S. Foote, Effect of Guanine Stacking on the Oxidation of 8-Oxoguanine in B-DNA, *Journal of the American Chemical Society*, 120 (1998) 845-846.

[70] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*, 3rd ed., Oxford University Press, Oxford, 1999.

[71] Y.M. Evdokimov, S.G. Skuridin, V.I. Salyanov, A.S. Semeikin, M. Palumbo, Nucleic-Acids as a Basis for Creation of Biosensors, *Mol Biol*, 23 (1989) 1245-1251.

[72] M.S. Yang, M.E. McGovern, M. Thompson, Genosensor technology and the detection of interfacial nucleic acid chemistry, *Analytica Chimica Acta*, 346 (1997) 259-275.

- [73] S.G. Skuridin, Y.M. Yevdokimov, V.S. Efimov, J.M. Hall, A.P.F. Turner, A new approach for creating double-stranded DNA biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 11 (1996) 903-911.
- [74] A.M.O. Brett, S.H.P. Serrano, I. Gutz, M.A. La-Scalea, M.L. Cruz, Voltammetric behavior of nitroimidazoles at a DNA-biosensor, *Electroanalysis*, 9 (1997) 1132-1137.
- [75] X.H. Cai, G. Rivas, H. Shirashi, P. Farias, J. Wang, M. Tomschik, F. Jelen, E. Palecek, Electrochemical analysis of formation of polynucleotide complexes in solution and at electrode surfaces, *Analytica Chimica Acta*, 344 (1997) 65-76.
- [76] S.N. Topkaya, S. Aydinlik, N. Aladag, M. Ozsoz, D. Ozkan-Ariksoysal, Different DNA Immobilization Strategies for the Interaction of Anticancer Drug Irinotecan with DNA Based on Electrochemical DNA Biosensors, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 13 (2010) 582-589.
- [77] A.M. Chiorcea, A.M. Oliveira Brett, Atomic force microscopy characterization of an electrochemical DNA-biosensor, *Bioelectrochemistry*, 63 (2004) 229-232.
- [78] A.M. Oliveira-Brett, A.M. Chiorcea, Atomic Force Microscopy of DNA Immobilized onto a Highly Oriented Pyrolytic Graphite Electrode Surface, *Langmuir : the ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 19 (2013) 3830-3839.
- [79] A.M. Oliveira-Brett, A.M. Chiorcea, Effect of pH and applied potential on the adsorption of DNA on highly oriented pyrolytic graphite electrodes. Atomic force microscopy surface characterisation, *Electrochemistry Communications*, 5 (2003) 178-183.
- [80] A.D.R. Pontinha, S.M.A. Jorge, A.M.C. Paquim, V.C. Diculescu, A.M. Oliveira-Brett, In situ evaluation of anticancer drug methotrexate-DNA interaction using a DNA-electrochemical biosensor and AFM characterization, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13 (2011) 5227-5234.
- [81] A.D.R. Pontinha, S. Sparapani, S. Neidle, A.M. Oliveira-Brett, Triazole-acridine conjugates: Redox mechanisms and in situ electrochemical evaluation of interaction with double-stranded DNA, *Bioelectrochemistry*, 89 (2013) 50-56.
- [82] S.N. Topkaya, G. Serindere, M. Ozder, Determination of DNA Hypermethylation Using Anti-cancer Drug-Temozolomide, *Electroanalysis*, 28 (2016) 1052-1059.
- [83] A.A. Ensafi, E. Heydari-Bafrooei, M. Amini, DNA-functionalized biosensor for riboflavin based electrochemical interaction on pretreated pencil graphite electrode, *Biosensors and Bioelectronics*, 31 (2012) 376-381.
- [84] I.B. Santarino, S.C.B. Oliveira, A.M. Oliveira-Brett, In situ evaluation of the anticancer antibody rituximab-dsDNA interaction using a DNA-electrochemical biosensor, *Electroanalysis*, 26 (2014) 1304-1311.
- [85] A.D.R. Pontinha, H.E. Satana, V.C. Diculescu, A.M. Oliveira-Brett, Anodic Oxidation of Cladribine and In Situ Evaluation of DNA-Cladribine Interaction, *Electroanalysis*, 23 (2011) 2651-2657.
- [86] L.I. Tome, N.V. Marques, V.C. Diculescu, A.M. Oliveira-Brett, In situ dsDNA-bevacizumab anticancer monoclonal antibody interaction electrochemical evaluation, *Analytica Chimica Acta*, 898 (2015) 28-33.
- [87] R.M. Buoro, I.C. Lopes, V.C. Diculescu, S.H.P. Serrano, L. Lemos, A.M. Oliveira-Brett, In situ evaluation of gemcitabine-DNA interaction using a DNA-electrochemical biosensor, *Bioelectrochemistry*, 99 (2014) 40-45.
- [88] H.E. Satana, A.D. Pontinha, V.C. Diculescu, A.M. Oliveira-Brett, Nucleoside analogue electrochemical behaviour and in situ evaluation of DNA-clofarabine interaction, *Bioelectrochemistry*, 87 (2012) 3-8.

- [89] V.C. Diculescu, A.M. Chiorcea-Paquim, A.M. Oliveira-Brett, Applications of a DNA-electrochemical biosensor, *Trac-Trend Anal Chem*, 79 (2016) 23-36.
- [90] E. Katz, B. Willner, I. Willner, Amplified Electrochemical and Photoelectrochemical Analysis of DNA, *Perspectives in Bioanalysis*, 1 (2005) 195-246.
- [91] S.C.B. Oliveira, A.M. Oliveira-Brett, In situ evaluation of chromium-DNA damage using a DNA-electrochemical biosensor, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398 (2010) 1633-1641.
- [92] A.M. Chiorcea-Paquim, O. Corduneanu, S.C.B. Oliveira, V.C. Diculescu, A.M. Oliveira-Brett, Electrochemical and AFM evaluation of hazard compounds-DNA interaction, *Electrochimica Acta*, 54 (2009) 1978-1985.
- [93] S.C.B. Oliveira, O. Corduneanu, A.M. Oliveira-Brett, In situ evaluation of heavy metal-DNA interactions using an electrochemical DNA biosensor, *Bioelectrochemistry*, 72 (2008) 53-58.
- [94] I.C. Lopes, P.V.F. Santos, V.C. Diculescu, F.M.P. Peixoto, M.C.U. Araujo, A.A. Tanaka, A.M. Oliveira-Brett, Microcystin-LR and chemically degraded microcystin-LR electrochemical oxidation, *Analyst*, 137 (2012) 1904-1912.
- [95] P.V.F. Santos, I.C. Lopes, V.C. Diculescu, A.M. Oliveira-Brett, DNA - Cyanobacterial Hepatotoxins Microcystin-LR and Nodularin Interaction: Electrochemical Evaluation, *Electroanalysis*, 24 (2012) 547-553.
- [96] Y.Y. Qiu, X.J. Qu, J. Dong, S.Y. Ai, R.X. Han, Electrochemical detection of DNA damage induced by acrylamide and its metabolite at the graphene-ionic liquid-Nafion modified pyrolytic graphite electrode, *Journal of Hazardous Materials*, 190 (2011) 480-485.
- [97] S.N. Topkaya, D. Ozkan-Ariksoysal, Prostate Cancer Biomarker Detection with Carbon Nanotubes Modified Screen Printed Electrodes, *Electroanalysis*, 28 (2016) 1077-1084.
- [98] D. Voet, J.G. Voet, C.W. Pratt, *Fundamentals of biochemistry*, Wiley, New York, 1999.
- [99] D. Whitford, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, John Wiley & Sons, West Sussex, England, 2005.
- [100] IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983, *European journal of biochemistry*, 138 (1984) 9-37.
- [101] J. Kyte, R.F. Doolittle, A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *Journal of Molecular Biology*, 157 (1982) 105-132.
- [102] S.M. MacDonald, S.G. Roscoe, Electrochemical oxidation reactions of tyrosine, tryptophan and related dipeptides, *Electrochimica Acta*, 42 (1997) 1189-1200.
- [103] E.V. Suprun, S.A. Khmeleva, S.P. Radko, S.A. Kozin, A.I. Archakov, V.V. Shumyantseva, Direct electrochemical oxidation of amyloid- β peptides via tyrosine, histidine, and methionine residues, *Electrochemistry Communications*, 65 (2016) 53-56.
- [104] J.A. Reynaud, B. Malfoy, P. Canesson, Electrochemical investigations of amino acids at solid electrodes: Sulfur components: Cystine, cysteine, methionine, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 114 (1980) 195-211.
- [105] B. Malfoy, J.A. Reynaud, Electrochemical investigations of amino acids at solid electrodes: Part II. Amino acids containing no sulfur atoms: Tryptophan, tyrosine, histidine and derivatives, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 114 (1980) 213-223.

- [106] T.A. Enache, A.M. Oliveira-Brett, Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 655 (2011) 9-16.
- [107] T.A. Enache, A.M. Oliveira-Brett, Peptide methionine sulfoxide reductase A (MsrA): direct electrochemical oxidation on carbon electrodes, *Bioelectrochemistry*, 89 (2013) 11-18.
- [108] T.A. Enache, A.M. Oliveira-Brett, Boron doped diamond and glassy carbon electrodes comparative study of the oxidation behaviour of cysteine and methionine, *Bioelectrochemistry*, 81 (2011) 46-52.
- [109] T.A. Enache, A.M. Oliveira-Brett, Pathways of Electrochemical Oxidation of Indolic Compounds, *Electroanalysis*, 23 (2011) 1337-1344.
- [110] L.C. Chen, C.C. Chang, H.C. Chang, Electrochemical oxidation of histidine at an anodic oxidized boron-doped diamond electrode in neutral solution, *Electrochimica Acta*, 53 (2008) 2883-2889.
- [111] M. Baghayeri, E.N. Zare, M. Namadchian, Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin immobilized on biocompatible poly(styrene-alternative-maleic acid)/functionalized multi-wall carbon nanotubes blends, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 188 (2013) 227-234.
- [112] E.V. Suprun, V.V. Shumyantseva, A.I. Archakov, Protein Electrochemistry: Application in Medicine. A Review, *Electrochimica Acta*, 140 (2014) 72-82.
- [113] J.E. Frew, H.A. Hill, Direct and indirect electron transfer between electrodes and redox proteins, *European journal of biochemistry*, 172 (1988) 261-269.
- [114] J.J. Gooding, R. Wibowo, J. Liu, W. Yang, D. Losic, S. Orbons, F.J. Mearns, J.G. Shapter, D.B. Hibbert, Protein electrochemistry using aligned carbon nanotube arrays, *Journal of the American Chemical Society*, 125 (2003) 9006-9007.
- [115] U. Wollenberger, R. Spricigo, S. Leimkuhler, K. Schroder, Protein electrodes with direct electrochemical communication, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 109 (2008) 19-64.
- [116] V.E. Ferrero, L. Andolfi, G. Di Nardo, S.J. Sadeghi, A. Fantuzzi, S. Cannistraro, G. Gilardi, Protein and electrode engineering for the covalent immobilization of P450 BMP on gold, *Analytical Chemistry*, 80 (2008) 8438-8446.
- [117] V. Mani, B. Dinesh, S.M. Chen, R. Saraswathi, Direct electrochemistry of myoglobin at reduced graphene oxide-multiwalled carbon nanotubes-platinum nanoparticles nanocomposite and biosensing towards hydrogen peroxide and nitrite, *Biosensors and Bioelectronics*, 53 (2014) 420-427.
- [118] Z.S. Aghamiri, M. Mohsennia, H.A. Rafiee-Pour, Immobilization of cytochrome c and its application as electrochemical biosensors, *Talanta*, 176 (2018) 195-207.
- [119] E. Palecek, J. Tkac, M. Bartosik, T. Bertok, V. Ostatna, J. Palecek, Electrochemistry of Nonconjugated Proteins and Glycoproteins. Toward Sensors for Biomedicine and Glycomics, *Chemical Reviews*, 115 (2015) 2045-2108.
- [120] A.M. Kannan, V. Renugopalakrishnan, S. Filipek, P. Li, G.F. Audette, L. Munukutla, Bio-batteries and bio-fuel cells: leveraging on electronic charge transfer proteins, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 9 (2009) 1665-1678.
- [121] H. Xu, H. Dai, G. Chen, Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin protein entrapped in graphene and chitosan composite film, *Talanta*, 81 (2010) 334-338.
- [122] A.E. Cass, M.J. Eddowes, H.A. Hill, K. Uosaki, R.C. Hammond, I.J. Higgins, E. Plotkin, Electrochemical, photoelectrochemical, electrocatalytic and catalytic reduction of redox proteins, *Nature*, 285 (1980) 673-674.

- [123] M.V. Mirkin, S. Amemiya: *Nanoelectrochemistry*, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 2015.
- [124] W. Putzbach, N.J. Ronkainen, Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: a review, *Sensors (Basel)*, 13 (2013) 4811-4840.
- [125] N.F. Hu, Direct electrochemistry of redox proteins or enzymes at various film electrodes and their possible applications in monitoring some pollutants, *Pure and Applied Chemistry*, 73 (2001) 1979-1991.
- [126] M.L. Fultz, R.A. Durst, Mediator Compounds for the Electrochemical Study of Biological Redox Systems - a Compilation, *Analytica Chimica Acta*, 140 (1982) 1-18.
- [127] F.N. Crespilho, V. Zucolotto, C.M.A. Brett, O.N. Oliveira, F.C. Nart, Enhanced charge transport and incorporation of redox mediators in layer-by-layer films containing PAMAM-encapsulated gold nanoparticles, *Journal of Physical Chemistry B*, 110 (2006) 17478-17483.
- [128] F.A. Armstrong, H.A.O. Hill, N.J. Walton, Direct Electrochemistry of Redox Proteins, *Accounts of Chemical Research*, 21 (1988) 407-413.
- [129] M. Rabe, D. Verdes, S. Seeger, Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces, *Advances in Colloid Interface Science*, 162 (2011) 87-106.
- [130] Y.L. Liu, Y.F. Chen, S.P. Wen, C.C. Ren, P.Y. Cao, J.F. Huang, B. Liu, G.B. Jiang, Study of Protein Adsorption/Adhesion Behaviors on Solid Beads Surface with Different Surface Properties, *Journal of Dispersion Science and Technology*, 37 (2016) 1104-1114.
- [131] A.A. Karyakin, Principles of direct (mediator free) bioelectrocatalysis, *Bioelectrochemistry*, 88 (2012) 70-75.
- [132] W.R. Hagen, Direct Electron-Transfer of Redox Proteins at the Bare Glassy-Carbon Electrode, *European Journal of Biochemistry*, 182 (1989) 523-530.
- [133] V. Ostatna, H. Cernocka, K. Kurzatowska, E. Palecek, Native and denatured forms of proteins can be discriminated at edge plane carbon electrodes, *Analytica Chimica Acta*, 735 (2012) 31-36.
- [134] D.A. Kane, R.D. O'Neill, Major differences in the behaviour of carbon paste and carbon fibre electrodes in a protein-lipid matrix: implications for voltammetry in vivo, *Analyst*, 123 (1998) 2899-2903.
- [135] M. Chiku, T.A. Ivandini, A. Kamiya, A. Fujishima, Y. Einaga, Direct electrochemical oxidation of proteins at conductive diamond electrodes, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 612 (2008) 201-207.
- [136] E.V. Suprun, M.S. Zharkova, G.E. Morozovich, A.V. Veselovsky, V.V. Shumyantseva, A.I. Archakov, Analysis of Redox Activity of Proteins on the Carbon Screen Printed Electrodes, *Electroanalysis*, 25 (2013) 2109-2116.
- [137] C.M.A. Brett, A.M.O. Brett, *Electrochemistry: principles, methods, and applications*, Oxford University Press, Oxford, 1993.
- [138] C.M.A. Brett, A.M.O. Brett, *Electroanalysis*, Oxford University Press, Oxford; New York, 1998.
- [139] P.T. Kissinger, W.R. Heineman, Cyclic voltammetry, *Journal of Chemical Education*, 60 (1983) 702-706.
- [140] C.H. Bamford, R.G. Compton, *Comprehensive chemical kinetics*, v. 26, Electrode kinetics, Elsevier, Amsterdam; Oxford, 1986.
- [141] D.D. Macdonald, *Transient techniques in electrochemistry*, Plenum Press, New York, 1977.

- [142] E. Laviron, Adsorption, autoinhibition and autocatalysis in polarography and in linear potential sweep voltammetry, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 52 (1974) 355-393.
- [143] E. Laviron, General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 101 (1979) 19-28.
- [144] E. Laviron, R. Meunier-Prest, R. Lacasse, The reduction mechanism of aromatic nitro compounds in aqueous medium. Part IV. The reduction of p-nitrobenzophenone between $H_0 = -5$ and pH 14, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 375 (1994) 263-274.
- [145] E. Laviron, R. Meunier-Prest, Theory of EC1, EC2, EC1E, EEC1 and irreversible surface reactions in polarography, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 375 (1994) 79-87.
- [146] M.E. Orazem, B. Tribollet, *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, John Wiley and Sons, New Jersey, 2008.
- [147] E.P. Randviir, C.E. Banks, Electrochemical impedance spectroscopy: an overview of bioanalytical applications, *Analytical Methods*, 5 (2013) 1098-1115.
- [148] I.O. K'Owino, O.A. Sadik, *Impedance Spectroscopy: A Powerful Tool for Rapid Biomolecular Screening and Cell Culture Monitoring*, *Electroanal*, 17 (2005) 2101-2113.
- [149] F. Lisdat, D. Schafer, The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391 (2008) 1555-1567.
- [150] S.M.R. Niya, M. Hoorfar, Study of proton exchange membrane fuel cells using electrochemical impedance spectroscopy technique – A review, *Journal of Power Sources*, 240 (2013) 281-293.
- [151] M.D. Ward, D.A. Buttry, In situ interfacial mass detection with piezoelectric transducers, *Science*, 249 (1990) 1000-1007.
- [152] W.G. Cady, *Piezoelectricity : an introduction to the theory and applications of electromechanical phenomena in crystals*, McGraw-Hill, New York ; London, 1946.
- [153] G.Z. Sauerbrey, Use of crystal oscillators for weighing thin films and for microweighing, *Physik*, 155 (1959) 206-222.
- [154] Y. Liu, A. Jaiswal, M.A. Poggi, W.D. Wilson, Surface Plasmon Resonance and Quartz Crystal Microbalance Methods for Detection of Molecular Interactions, in: B. Wang, E.V. Anslyn (Eds.) *Chemosensors: Principles, Strategies, and Applications*, John Wiley & Sons, New Jersey, 2011, pp. 329-344.
- [155] Biolin Scientific/Q-Sense: <https://www.biolinscientific.com/qsense>
- [156] A. Arnau, *Piezoelectric transducers and applications*, Springer, Berlin ; New York, 2004.
- [157] D.D. Perrin, B. Dempsey, *Buffers for pH and metal ion control*, Chapman and Hall, London, 1974.
- [158] T.A. Enache, A.M. Chiorcea-Paquim, O. Fatibello-Filho, A.M. Oliveira-Brett, Hydroxyl radicals electrochemically generated in situ on a boron-doped diamond electrode, *Electrochemistry Communications*, 11 (2009) 1342-1345.
- [159] R. Westermeier, T. Naven, H.R. Höpker, *Proteomics in Practice: A Guide to Successful Experimental Design*, Wiley-Blackwell, Berlin, 2008.
- [160] J.L. Sagripanti, P.L. Goering, A. Lamanna, Interaction of copper with DNA and antagonism by other metals, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 110 (1991) 477-485.
- [161] DrugBank database: <https://www.drugbank.ca/>

- [162] M.R. Wilkins, E. Gasteiger, A. Bairoch, J.C. Sanchez, K.L. Williams, R.D. Appel, D.F. Hochstrasser, Protein identification and analysis tools in the ExPASy server, *Methods in Molecular Biology*, 112 (1999) 531-552.
- [163] ExPASy-Bioinformatic Resource Portal: <https://www.expasy.org/>
- [164] J.L. Moreland, A. Gramada, O.V. Buzko, Q. Zhang, P.E. Bourne, The Molecular Biology Toolkit (MBT): a modular platform for developing molecular visualization applications, *BMC bioinformatics*, 6 (2005) 21.
- [165] J.Y. Lee, H.T. Lee, W. Shin, J. Chae, J. Choi, S.H. Kim, H. Lim, T. Won Heo, K.Y. Park, Y.J. Lee, S.E. Ryu, J.Y. Son, J.U. Lee, Y.S. Heo, Structural basis of checkpoint blockade by monoclonal antibodies in cancer immunotherapy, *Nature Communications*, 7 (2016) 13354-13354.
- [166] RCSB Protein Data Bank: <https://www.rcsb.org/>
- [167] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne, The Protein Data Bank, *Nucleic acids research*, 28 (2000) 235-242.
- [168] J.M. Amado, M.E. Matos, A.M. Abreu, L. Loureiro, J. Oliveira, A. Verde, A. Massa, The prevalence of acne in the north of Portugal, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, 20 (2006) 1287-1295.
- [169] E.H. Heller, N.J. Shiffman, Synthetic retinoids in dermatology, *Canadian Medical Association journal*, 132 (1985) 1129-1136.
- [170] A. Layton, The use of isotretinoin in acne, *Dermato-endocrinology*, 1 (2009) 162-169.
- [171] S.B. Nickle, N. Peterson, M. Peterson, Updated Physician's Guide to the Off-label Uses of Oral Isotretinoin, *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, 7 (2014) 22-34.
- [172] L. Hommel, J.M. Geiger, M. Harms, J.H. Saurat, Sebum excretion rate in subjects treated with oral all-trans-retinoic acid, *Dermatology*, 193 (1996) 127-130.
- [173] G. Plewig, H. Dressel, M. Pflieger, S. Michelsen, A.M. Kligman, Low dose isotretinoin combined with tretinoin is effective to correct abnormalities of acne, *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology: JDDG*, 2 (2004) 31-45.
- [174] A.M. Nelson, K.L. Gilliland, Z. Cong, D.M. Thiboutot, 13-cis Retinoic acid induces apoptosis and cell cycle arrest in human SEB-1 sebocytes, *The Journal of Investigative Dermatology*, 126 (2006) 2178-2189.
- [175] T. Karlsson, A. Vahlquist, N. Kedishvili, H. Torma, 13-cis-retinoic acid competitively inhibits 3 alpha-hydroxysteroid oxidation by retinol dehydrogenase RoDH-4: a mechanism for its anti-androgenic effects in sebaceous glands?, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303 (2003) 273-278.
- [176] R. Ganceviciene, C.C. Zouboulis, Isotretinoin: state of the art treatment for acne vulgaris, *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 8 (2010) S47-S59.
- [177] M. Mahajan, R. Singh, S.K. Jain, Development of a Reproducible, Sensitive and Rapid Reversed Phase Chromatographic Method for the Estimation of Isotretinoin Incorporated in Bulk Drugs, *Pharmaceutical Dosage Forms and Biological Matrix, Current Pharmaceutical Analysis*, 11 (2015) 278-285.
- [178] Y.S. Yang, P.J. Faustino, P.S. Pine, H. Davis, N. Grunberg, J. Phillips, R.C. Lyon, L.X. Yu, A.B. Ciavarella, A.V. Del Grosso, J.P. Hanig, Determination of plasma and brain levels of isotretinoin in mice following single oral dose by high-performance liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37 (2005) 157-163.

- [179] R. Wyss, F. Bucheli, Determination of endogenous levels of 13-cis-retinoic acid (isotretinoin), all-trans-retinoic acid (tretinoin) and their 4-oxo metabolites in human and animal plasma by high-performance liquid chromatography with automated column switching and ultraviolet detection, *Journal of Chromatography B*, 700 (1997) 31-47.
- [180] B.M. Tashtoush, E.L. Jacobson, M.K. Jacobson, A rapid HPLC method for simultaneous determination of tretinoin and isotretinoin in dermatological formulations, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43 (2007) 859-864.
- [181] M.A. Kane, N. Chen, S. Sparks, J.L. Napoli, Quantification of endogenous retinoic acid in limited biological samples by LC/MS/MS, *Biochemical Journal*, 388 (2005) 363-369.
- [182] L.L. Wu, J.J. Wu, K. Zhou, F. Cheng, Y. Chen, Determination of isotretinoin in human plasma by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56 (2011) 324-329.
- [183] P.A. Lehman, T.J. Franz, A sensitive high-pressure liquid chromatography particle beam mass spectrometry assay for the determination of all-trans-retinoic acid and 13-cis-retinoic acid in human plasma, *Journal of Pharmaceutical Science*, 85 (1996) 287-290.
- [184] U.B. Ranalder, B.B. Lausecker, C. Huselton, Micro Liquid-Chromatography Mass-Spectrometry with Direct Liquid Introduction Used for Separation and Quantitation of All-Trans-Retinoic and 13-Cis-Retinoic Acids and Their 4-Oxo Metabolites in Human Plasma, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 617 (1993) 129-135.
- [185] Y. Wang, W.L. Chang, G.S. Prins, R.B. van Breemen, Simultaneous determination of all-trans, 9-cis, 13-cis retinoic acid and retinol in rat prostate using liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, 36 (2001) 882-888.
- [186] M. Angotti, R.W. Hartmann, A.J. Kirby, C. Simons, P.J. Nicholls, R.D.E. Sewell, H.J. Smith, Effect of 2-(4-aminophenylmethyl)-6-hydroxy-3, 4-dihydronaphthalen-1 (2H)-one on all-trans and 13-cis-retinoic acid levels in plasma quantified by high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Journal of Enzyme Inhibition and Medical Chemistry*, 20 (2005) 219-226.
- [187] R. Gatti, M.G. Gioia, V. Cavrini, Analysis and stability study of retinoids in pharmaceuticals by LC with fluorescence detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 23 (2000) 147-159.
- [188] R. Ali, B. Campos, G. Dyckhoff, W.E. Haefeli, C. Herold-Mende, J. Burhenne, Quantification of retinoid concentrations in human serum and brain tumor tissues, *Analytica Chimica Acta*, 725 (2012) 57-66.
- [189] J.J. Hagen, K.A. Washco, C.A. Monnig, Determination of retinoids by reversed-phase capillary liquid chromatography with amperometric electrochemical detection, *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications*, 677 (1996) 225-231.
- [190] L.H. Wang, J.F. Wang, Determination of retinoids in human serum, tocopherol and retinyl acetate in pharmaceuticals by RP-LC with electrochemical detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25 (2001) 785-793.
- [191] A.K. Sakhi, T.E. Gundersen, S.M. Ulven, R. Blomhoff, E. Lundanes, Quantitative determination of endogenous retinoids in mouse embryos by high-performance liquid chromatography with on-line solid-phase extraction, column switching and electrochemical detection, *Journal of Chromatography A*, 828 (1998) 451-460.
- [192] L.H. Wang, Simultaneous determination of retinal, retinol and retinoic acid (all-trans and 13-cis) in cosmetics and pharmaceuticals at electrodeposited metal electrodes, *Analytica Chimica Acta*, 415 (2000) 193-200.

- [193] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical methods: fundamentals and applications*, 2nd ed., Wiley, New York, 2001.
- [194] W.B.S. Machini, T.A. Enache, S.M.A. Jorge, A.M. Oliveira-Brett, Isotretinoin Oxidation and Electroanalysis in a Pharmaceutical Drug Using a Boron-doped Diamond Electrode, *Electroanalysis*, 28 (2016) 2709-2715.
- [195] V.C. Diculescu, A.M. Chiorcea-Paquim, A.M. Oliveira-Brett, Electrochemical DNA sensors for detection of DNA damage, *Sensors*, 5 (2005) 377-393.
- [196] S. Georgala, I. Papassotiriou, C. Georgala, E. Demetriou, K.H. Schulpis, Isotretinoin therapy induces DNA oxidative damage, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 43 (2005) 1178-1182.
- [197] P. Changenet-Barret, T. Gustavsson, R. Improta, D. Markovitsi, Ultrafast Excited-State Deactivation of 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine Studied by Femtosecond Fluorescence Spectroscopy and Quantum-Chemical Calculations, *The Journal of Physical Chemistry. A*, 119 (2015) 6131-6139.
- [198] S. Zhang, X. Song, W. Zhang, N. Luo, L. Cai, Determination of low urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion with capillary electrophoresis and molecularly imprinted monolith solid phase microextraction, *The Science of the Total Environment*, 450-451 (2013) 266-270.
- [199] H. Liu, Y.S. Wang, J.C. Wang, J.H. Xue, B. Zhou, H. Zhao, S.D. Liu, X. Tang, S.H. Chen, M.H. Li, J.X. Cao, A colorimetric aptasensor for the highly sensitive detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine based on G-quadruplex-hemin DNAzyme, *Analytical Biochemistry*, 458 (2014) 4-10.
- [200] P. Tuma, E. Samcova, V. Kvasnicova, Improved detection limit for a direct determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in untreated urine samples by capillary electrophoresis with optical detection, *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 813 (2004) 255-261.
- [201] Z. Guo, X. Liu, Y. Liu, G. Wu, X. Lu, Constructing a novel 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine electrochemical sensor and application in evaluating the oxidative damages of DNA and guanine, *Biosens Bioelectron*, 86 (2016) 671-676.
- [202] W.A. Maccreehan, E. Schonberger, Reversed-Phase High-Performance Liquid-Chromatographic Separation and Electrochemical Detection of Retinol and Its Isomers, *J Chromatogr-Biomed*, 417 (1987) 65-78.
- [203] P.A. Fernandes, M.G. Silva, A.P. Cruz, J.A. Paiva, Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos em Números – 2015, in: *Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos em Números. Antimicrobianos* (Ed.), Direção-Geral da Saúde, Lisboa, 2016, pp. 1-43.
- [204] P.R. Shankar, Book review: Tackling drug-resistant infections globally, *Archives of Pharmacy Practice*, 7 (2016) 110-+.
- [205] T. Schneider, A. Mullera, H. Miess, H. Gross, Cyclic lipopeptides as antibacterial agents - Potent antibiotic activity mediated by intriguing mode of actions, *International Journal of Medical Microbiology*, 304 (2014) 37-43.
- [206] G.H. Yu, X.Q. Jia, J.P. Wen, W.Y. Lu, G.Y. Wang, Q. Caiyin, Y.L. Chen, Strain Improvement of *Streptomyces roseosporus* for Daptomycin Production by Rational Screening of He-Ne Laser and NTG Induced Mutants and Kinetic Modeling, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 163 (2011) 729-743.
- [207] R.H. Baltz, V. Miao, S.K. Wrigley, Natural products to drugs: daptomycin and related lipopeptide antibiotics, *Natural Product Reports*, 22 (2005) 717-741.

- [208] P.H. Nakhate, V.K. Yadav, A.N. Pathak, A Review on Daptomycin; the first US-FDA approved Lipopeptide antibiotics, *Journal of Scientific and Innovative Research*, 2 (2013) 970-980.
- [209] F.P. Tally, M.F. DeBruin, Development of daptomycin for Gram-positive infections, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46 (2000) 523-526.
- [210] A. Johnson, Daptomycin in the treatment of skin, soft-tissue and invasive infections due to Gram-positive bacteria, *Future Microbiology*, 1 (2006) 255-265.
- [211] R. Saueremann, M. Rothenburger, W. Graninger, C. Joukhadar, Daptomycin: A review 4 years after first approval, *Pharmacology*, 81 (2008) 79-91.
- [212] J.A. Silverman, N.G. Perlmutter, H.M. Shapiro, Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus*, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 47 (2003) 2538-2544.
- [213] D. Jung, A. Rozek, M. Okon, R.E.W. Hancock, Structural transitions as determinants of the action of the calcium-dependent antibiotic daptomycin, *Chemistry & Biology*, 11 (2004) 949-957.
- [214] E.G. Totoli, S. Garg, H.R. Salgado, Daptomycin: Physicochemical, Analytical, and Pharmacological Properties, *Therapeutic Drug Monitoring*, 37 (2015) 699-710.
- [215] J. Martens-Lobenhoffer, J.T. Kielstein, C. Oye, S.M. Bode-Boger, Validated high performance liquid chromatography-UV detection method for the determination of daptomycin in human plasma, *Journal of Chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 875 (2008) 546-550.
- [216] C.M. Tobin, J.M. Darville, A.M. Lovering, A.P. Macgowan, An HPLC assay for daptomycin in serum, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62 (2008) 1462-1463.
- [217] M. Polillo, C. Tascini, M. Lastella, P. Malacarne, L. Ciofi, B. Viaggi, G. Bocci, F. Menichetti, R. Danesi, M. Del Tacca, A. Di Paolo, A rapid high-performance liquid chromatography method to measure linezolid and daptomycin concentrations in human plasma, *Therapeutic Drug Monitoring*, 32 (2010) 200-205.
- [218] M. Szultka, J. Szeliga, M. Jackowski, B. Buszewski, Development of novel molecularly imprinted solid-phase microextraction fibers and their application for the determination of antibiotic drugs in biological samples by SPME-LC/MSn, *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 403 (2012) 785-796.
- [219] P. Olszowy, M. Szultka, P. Fuchs, R. Kegler, R. Mundkowski, W. Miekisch, J. Schubert, B. Buszewski, New coated SPME fibers for extraction and fast HPLC determination of selected drugs in human blood, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53 (2010) 1022-1027.
- [220] L. Baietto, A. D'Avolio, F.G. De Rosa, S. Garazzino, M. Michelazzo, G. Ventimiglia, M. Siccardi, M. Simiele, M. Sciandra, G. Di Perri, Development and validation of a simultaneous extraction procedure for HPLC-MS quantification of daptomycin, amikacin, gentamicin, and rifampicin in human plasma, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396 (2010) 791-798.
- [221] M. Gregoire, A.G. Leroy, R. Bouquie, D. Malandain, E. Dailly, D. Boutoille, C. Renaud, P. Jolliet, J. Caillon, G. Deslandes, Simultaneous determination of ceftaroline, daptomycin, linezolid and rifampicin concentrations in human plasma by on-line solid phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 118 (2016) 17-26.
- [222] A.P. Christ, M.S. Machado, P. Rosa, C.F. Codevilla, C.M.B. Rolim, A.I.H. Adams, Development and validation of a stability-indication LC-UV method for determination of daptomycin injectable form and kinetic study in alkaline medium, *Analytical Methods*, 6 (2014) 1242-1247.

- [223] H.G. Gika, F. Michopoulos, D. Divanis, S. Metalidis, P. Nikolaidis, G.A. Theodoridis, Daptomycin determination by liquid chromatography-mass spectrometry in peritoneal fluid, blood plasma, and urine of clinical patients receiving peritoneal dialysis treatment, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397 (2010) 2191-2197.
- [224] M.C. Verdier, D. Bentue-Ferrer, O. Tribut, N. Collet, M. Revest, E. Bellissant, Determination of daptomycin in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Clinical application, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 49 (2011) 69-75.
- [225] M. Szultka, R. Krzeminski, M. Jackowski, B. Buszewski, Simultaneous determination of selected chemotherapeutics in human whole blood by molecularly imprinted polymers coated solid phase microextraction fibers and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 940 (2013) 66-76.
- [226] E. Gikas, F.N. Bazoti, P. Fanourgiakis, E. Perivolioti, A. Roussidis, A. Skoutelis, A. Tsarbopoulos, Development and validation of a UPLC-UV method for the determination of daptomycin in rabbit plasma, *Biomedical Chromatography*, 24 (2010) 522-527.
- [227] E. Gikas, F.N. Bazoti, P. Fanourgiakis, E. Perivolioti, A. Roussidis, A. Skoutelis, A. Tsarbopoulos, Simultaneous quantification of daptomycin and rifampicin in plasma by ultra performance liquid chromatography: Application to a pharmacokinetic study, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51 (2010) 901-906.
- [228] T. Naito, T. Yamada, T. Yagi, J. Kawakami, Simple and validated UHPLC method coupled to UV detection for determination of daptomycin in human plasma and urine, *Biomedical Chromatography*, 28 (2014) 317-319.
- [229] F.N. Bazoti, E. Gikas, A. Skoutelis, A. Tsarbopoulos, Development and validation of an ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantification of daptomycin in human plasma, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56 (2011) 78-85.
- [230] L. Baietto, A. D'Avolio, S. Pace, M. Simiele, C. Marra, A. Ariaudo, G. Di Perri, F.G. De Rosa, Development and validation of an UPLC-PDA method to quantify daptomycin in human plasma and in dried plasma spots, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 88 (2014) 66-70.
- [231] E.G. Totoli, H.R.N. Salgado, Rapid Turbidimetric Assay to Determine the Potency of Daptomycin in Lyophilized Powder, *Pharmaceutics*, 7 (2015) 106-121.
- [232] E.G. Totoli, H.R.N. Salgado, A green approach for the quantification of daptomycin in pharmaceutical formulation by UV spectrophotometry, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*, 51 (2015) 811-821.
- [233] C.M.A. Brett, A.M.O. Brett, *Electrochemistry : principles, methods, and applications*, Oxford University Press, Oxford, 1993.
- [234] S.C.B. Oliveira, I.B. Santarino, A.M. Oliveira-Brett, Direct Electrochemistry of Native and Denatured Anticancer Antibody Rituximab at a Glassy Carbon Electrode, *Electroanalysis*, 25 (2013) 1029-1034.
- [235] I.B. Santarino, S.C.B. Oliveira, A.M. Oliveira-Brett, Protein reducing agents dithiothreitol and tris(2-carboxyethyl)phosphine anodic oxidation, *Electrochemistry Communications*, 23 (2012) 114-117.
- [236] V. Brabec, V. Mornstein, Electrochemical-Behavior of Proteins at Graphite-Electrodes Electrooxidation of Amino-Acids, *Biophysical Chemistry*, 12 (1980) 159-165.
- [237] T. Kelesidis, The Interplay between Daptomycin and the Immune System, *Frontiers in Immunology*, 5 (2014) 1-6.
- [238] Leishmaniasis, World Health Organization, Switzerland, 2015.

- [239] D.R. Gwatkin, M. Guillot, P. Heuveline, The burden of disease among the global poor, *Lancet*, 354 (1999) 586-589.
- [240] TDR at a glance, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2010.
- [241] P. Hunt, R. Stewart, J.B. Mesquita, L. Oldring, Neglected diseases: a human rights analysis, World Health Organization, Switzerland, 2007.
- [242] A. Oryan, D. Mehrabani, S.M. Owji, M.H. Motazedian, Q. Asgari, Histopathologic and electron microscopic characterization of cutaneous leishmaniasis in *Tatera indica* and *Gerbillus* spp. infected with *Leishmania major*, *Comparative Clinical Pathology*, 16 (2007) 275-279.
- [243] H.W. Murray, J.D. Berman, C.R. Davies, N.G. Saraiva, Advances in leishmaniasis, *Lancet*, 366 (2005) 1561-1577.
- [244] S. Singh, R. Sivakumar, Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis, *Journal of infection and chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 10 (2004) 307-315.
- [245] A. Oryan, D. Mehrabani, S.M. Owji, M.H. Motazedian, G. Hatam, Q. Asgari, Morphologic changes due to cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice experimentally infected with *Leishmania major*, *Journal of Applied Animal Research*, 34 (2008) 87-92.
- [246] M. Akbari, A. Oryan, G. Hatam, Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review, *Acta Tropica*, 172 (2017) 86-90.
- [247] P. Hilgard, T. Klenner, J. Stekar, C. Unger, Alkylphosphocholines: a new class of membrane-active anticancer agents, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 32 (1993) 90-95.
- [248] J. Verweij, A. Planting, M. van der Burg, G. Stoter, A dose-finding study of miltefosine (hexadecylphosphocholine) in patients with metastatic solid tumours, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 118 (1992) 606-608.
- [249] S. Sundar, P.L. Olliaro, Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management, *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 3 (2007) 733-740.
- [250] T.P. Dorlo, M. Balasegaram, J.H. Beijnen, P.J. de Vries, Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67 (2012) 2576-2597.
- [251] N.R. Jena, DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair, *Journal of Biosciences*, 37 (2012) 503-517.
- [252] S.C. Oliveira, A.M. Oliveira-Brett, In situ DNA oxidative damage by electrochemically generated hydroxyl free radicals on a boron-doped diamond electrode, *Langmuir : the ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 28 (2012) 4896-4901.
- [253] C.M.A. Brett, A.M. Oliveira-Brett, Step and Pulse Techniques, in: A.J. Bard, M. Stratmann, P.R. Unwin (Eds.) *Encyclopedia of Electrochemistry*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany, 2003, pp. 105-124.
- [254] I.C. Lopes, A.M. Oliveira-Brett, Human cytochrome P450 (CYP1A2)-dsDNA interaction in situ evaluation using a dsDNA-electrochemical biosensor, *Electroanalysis*, 29 (2017) 1674-1682.
- [255] A.M. Oliveira-Brett, V.C. Diculescu, Electrochemical study of quercetin-DNA interactions: In situ sensing with DNA biosensors, *Bioelectrochemistry*, 64 (2004) 143-150.
- [256] V.C. Diculescu, A.M. Oliveira-Brett, Chapter 10 - DNA-electrochemical biosensors and oxidative damage to DNA: application to cancer. Section 2: blood, molecules and cells, in: V.R. Preedy (Ed.) *Biosensors and Cancer*, Science Publisher, CRC Press, New Hampshire, USA, 2012.

- [257] A.M. Oliveira-Brett, S.H.P. Serrano, T.A. Macedo, D. Raimundo, M.H. Marques, M.A. La-Scalea, Electrochemical determination of carboplatin in serum using a DNA-modified glassy carbon electrode, *Electroanalysis*, 8 (1996) 992-995.
- [258] W.H. Organization, Global report on diabetes, 2016.
- [259] P.N.p.a. Diabetes, Programa Nacional para a Diabetes, in: P. Ministério da Saúde (Ed.), Direção-Geral da Saúde, Lisboa, 2017, pp. 1-19.
- [260] A. American Diabetes, Diagnosis and classification of diabetes mellitus, *Diabetes care*, 32 Suppl 1 (2009) S62-67.
- [261] A.E. Kunst, K. Stronks, C. Agyemang, Non-communicable diseases, in: B. Rechel, P. Mladovsky, W. Devillé, B. Rijks, R. Petrova-Benedict, M. McKee (Eds.) *Migration and health in the European Union*, Open University Press, Glasgow, Great Britain, 2011, pp. 101-120.
- [262] M.A. Atkinson, G.S. Eisenbarth, Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment, *Lancet*, 358 (2001) 221-229.
- [263] C.R. Thomas, S.L. Turner, W.H. Jefferson, C.J. Bailey, Prevention of dexamethasone-induced insulin resistance by metformin, *Biochemical Pharmacology*, 56 (1998) 1145-1150.
- [264] S. Alusik, Z. Paluch, Metformin: the past, presence, and future, *Minerva medica*, 106 (2015) 233-238.
- [265] Y.W. Wang, S.J. He, X. Feng, J. Cheng, Y.T. Luo, L. Tian, Q. Huang, Metformin: a review of its potential indications, *Drug design, Development and Therapy*, 11 (2017) 2421-2429.
- [266] S. Matthaei, H. Greten, Evidence that metformin ameliorates cellular insulin-resistance by potentiating insulin-induced translocation of glucose transporters to the plasma membrane, *Diabetes & Metabolism*, 17 (1991) 150-158.
- [267] S. Gandini, M. Puntoni, B.M. Heckman-Stoddard, B.K. Dunn, L. Ford, A. DeCensi, E. Szabo, Metformin and cancer risk and mortality: a systematic review and meta-analysis taking into account biases and confounders, *Cancer Revention Research*, 7 (2014) 867-885.
- [268] C.A. Bannister, S.E. Holden, S. Jenkins-Jones, C.L. Morgan, J.P. Halcox, G. Scherthaner, J. Mukherjee, C.J. Currie, Can people with type 2 diabetes live longer than those without? A comparison of mortality in people initiated with metformin or sulphonylurea monotherapy and matched, non-diabetic controls, *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 16 (2014) 1165-1173.
- [269] J. Hong, Y. Zhang, S. Lai, A. Lv, Q. Su, Y. Dong, Z. Zhou, W. Tang, J. Zhao, L. Cui, D. Zou, D. Wang, H. Li, C. Liu, G. Wu, J. Shen, D. Zhu, W. Wang, W. Shen, G. Ning, S.-D. Investigators, Effects of metformin versus glipizide on cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease, *Diabetes Care*, 36 (2013) 1304-1311.
- [270] C. Cheng, C.H. Lin, Y.W. Tsai, C.J. Tsai, P.H. Chou, T.H. Lan, Type 2 diabetes and antidiabetic medications in relation to dementia diagnosis, *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 69 (2014) 1299-1305.
- [271] R. Patel, G. Shah, Effect of metformin on clinical, metabolic and endocrine outcomes in women with polycystic ovary syndrome: a meta-analysis of randomized controlled trials, *Current Medical Research and Opinion*, 33 (2017) 1545-1557.
- [272] N.J. Niemuth, R.D. Klaper, Emerging wastewater contaminant metformin causes intersex and reduced fecundity in fish, *Chemosphere*, 135 (2015) 38-45.

- [273] Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group, *Lancet*, 352 (1998) 854-865.
- [274] J.M. Calatayud, P.C. Falco, M.C.P. Marti, Metformin and moroxidine determination with Cu(II), *Analytical Letters*, 18 (1985) 1381-1390.
- [275] E. Uçaktürk, The development and validation of a gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of metformin in human plasma, *Analytical Methods*, 5 (2013) 4723-4730.
- [276] C. Goedecke, I. Fettig, C. Piechotta, R. Philippa, S.U. Geissenc, A novel GC-MS method for the determination and quantification of metformin in surface water, *Analytical Methods*, 9 (2017) 1580-1584.
- [277] H.P. Chhetri, P. Thapa, A. Van Schepdael, Simple HPLC-UV method for the quantification of metformin in human plasma with one step protein precipitation, *Saudi pharmaceutical journal: the Official Publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, 22 (2014) 483-487.
- [278] M.A. Marques, S.S. Ade, O.W. Pinto, P.T. Barroso, D.P. Pinto, M. Ferreira-Filho, E. Werneck-Barroso, Simple and rapid method determination for metformin in human plasma using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetic studies, *Journal of Chromatography B*, 852 (2007) 308-316.
- [279] Hamdan, II, A.K. Jaber, A.M. Abushoffa, Development and validation of a stability indicating capillary electrophoresis method for the determination of metformin hydrochloride in tablets, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53 (2010) 1254-1257.
- [280] J. Narang, N. Malhotra, C. Singhal, R. Bhatia, V. Kathuria, M. Jain, Graphene nanoflakes on transparent glass electrode sensor for electrochemical sensing of anti-diabetic drug, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40 (2017) 537-548.
- [281] N. Sattarahmady, H. Heli, F. Faramarzi, Nickel oxide nanotubes-carbon microparticles/Nafion nanocomposite for the electrooxidation and sensitive detection of metformin, *Talanta*, 82 (2010) 1126-1135.
- [282] S. Dehdashtian, M.B. Gholivand, S. Mojtaba, K. Ziba, A nano sized functionalized mesoporous silica modified carbon paste electrode as a novel, simple, robust and selective anti-diabetic metformin sensor, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 221 (2015) 807-815.
- [283] H.M. Lotfy, D. Mohamed, S. Mowaka, A comparative study of smart spectrophotometric methods for simultaneous determination of sitagliptin phosphate and metformin hydrochloride in their binary mixture, *Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 149 (2015) 441-451.
- [284] I.H. Habib, M.S. Kamel, Near infra-red reflectance spectroscopic determination of metformin in tablets, *Talanta*, 60 (2003) 185-190.
- [285] H. Gadape, K. Parikh, Quantitative determination and validation of metformin hydrochloride in pharmaceutical using quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy, *E-Journal of Chemistry*, 8 (2011) 767-781.
- [286] S.Y. Feng, E.P. Lai, E. Dabek-Zlotorzynska, S. Sadeghi, Molecularly imprinted solid-phase extraction for the screening of antihyperglycemic biguanides, *Journal of Chromatography A*, 1027 (2004) 155-160.
- [287] M. Hadi, H. Poorgholi, H. Mostanzadeh, Determination of metformin at metal-organic framework (Cu-BTC) nanocrystals/multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode, *South African Journal of Chemistry*, 69 (2016) 132-139.

- [288] X.J. Tian, J.F. Song, X.J. Luan, Y.Y. Wang, Q.Z. Shi, Determination of metformin based on amplification of its voltammetric response by a combination of molecular wire and carbon nanotubes, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386 (2006) 2081-2086.
- [289] X.J. Tian, J.F. Song, Catalytic action of copper (II) ion on electrochemical oxidation of metformine and voltammetric determination of metformine in pharmaceuticals, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44 (2007) 1192-1196.
- [290] N. Shahabadi, L. Heidari, Binding studies of the antidiabetic drug, metformin to calf thymus DNA using multispectroscopic methods, *Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular spectroscopy*, 97 (2012) 406-410.
- [291] A.M. Chiorcea-Paquim, P.V. Santos, A.M. Oliveira-Brett, Atomic Force microscopy and voltammetric characterisation of synthetic homo-oligodeoxynucleotides, *Electrochimica Acta*, 110 (2013) 599-607.
- [292] World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals, in: W.H. Organization (Ed.) Geneva, 2018.
- [293] I.A.f.R.o. Cancer, *Cancer Today*, World Health Organization, Geneva, 2019.
- [294] H. Zhang, J. Chen, Current status and future directions of cancer immunotherapy, *Journal of Cancer*, 9 (2018) 1773-1781.
- [295] S.A. Rosenberg, N.P. Restifo, Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer, *Science*, 348 (2015) 62-68.
- [296] S.L. Topalian, C.G. Drake, D.M. Pardoll, Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy, *Cancer Cell*, 27 (2015) 450-461.
- [297] H. Fukuhara, Y. Ino, T. Todo, Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn, *Cancer Science*, 107 (2016) 1373-1379.
- [298] C. Guo, M.H. Manjili, J.R. Subjeck, D. Sarkar, P.B. Fisher, X.Y. Wang, Therapeutic cancer vaccines: past, present, and future, *Advances in Cancer Research*, 119 (2013) 421-475.
- [299] L.M. Weiner, R. Surana, S. Wang, Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy, *Nature Reviews Immunology*, 10 (2010) 317-327.
- [300] J.K. Liu, The history of monoclonal antibody development - Progress, remaining challenges and future innovations, *Annals of Medicine and Surgery*, 3 (2014) 113-116.
- [301] M.K. Callahan, M.A. Postow, J.D. Wolchok, Targeting T Cell Co-receptors for Cancer Therapy, *Immunity*, 44 (2016) 1069-1078.
- [302] M. Hazarika, M.K. Chuk, M.R. Theoret, S. Mushti, K. He, S.L. Weis, A.H. Putman, W.S. Helms, X. Cao, H. Li, H. Zhao, L. Zhao, J. Welch, L. Graham, M. Libeg, R. Sridhara, P. Keegan, R. Pazdur, U.S. FDA Approval Summary: Nivolumab for Treatment of Unresectable or Metastatic Melanoma Following Progression on Ipilimumab, *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 23 (2017) 3484-3488.
- [303] R. Sundar, B.C. Cho, J.R. Brahmer, R.A. Soo, Nivolumab in NSCLC: latest evidence and clinical potential, *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 7 (2015) 85-96.
- [304] D. Berman, A. Korman, R. Peck, D. Feltquate, N. Lonberg, R. Canetta, The development of immunomodulatory monoclonal antibodies as a new therapeutic modality for cancer: The Bristol-Myers Squibb experience, *Pharmacology & Therapeutics*, 148 (2015) 132-153.
- [305] J.T. Pento, Monoclonal Antibodies for the Treatment of Cancer, *Anticancer Research*, 37 (2017) 5935-5939.
- [306] F.A. Armstrong, G.S. Wilson, Recent developments in faradaic bioelectrochemistry, *Electrochimica Acta*, 45 (2000) 2623-2645.

- [307] Y. Temerk, M. Ibrahim, H. Ibrahim, W. Schuhmann, Comparative studies on the interaction of anticancer drug irinotecan with dsDNA and ssDNA, *RSC Advances*, 8 (2018) 25387-25395.
- [308] I.P. Fernandes, A.M. Oliveira-Brett, Calcium-induced calmodulin conformational change. Electrochemical evaluation, *Bioelectrochemistry*, 113 (2017) 69-78.
- [309] T.A. Enache, A.M. Oliveira-Brett, Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 655 (2011) 9-16.
- [310] F.Z. Issaad, L.I.N. Tomé, N.V. Marques, C. Mouats, V.C. Diculescu, A.M. Oliveira-Brett, Bevacizumab anticancer monoclonal antibody: native and denatured redox behaviour, *Electrochimica Acta*, 206 (2016) 246-253.
- [311] S.C.B. Oliveira, I.B. Santarino, A.M. Oliveira-Brett, Direct Electrochemistry of Native and Denatured Anticancer Antibody Rituximab at a Glassy Carbon Electrode, *Electroanalysis*, 25 (2013) 1029-1034.
- [312] W.B.S. Machini, A.M. Oliveira-Brett, Cyclic lipopeptide antibiotic daptomycin electrochemical oxidation at a glassy carbon electrode, *Electroanalysis*, 29 (2017) 1490-1496.
- [313] B.J. Bennion, V. Daggett, The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (2003) 5142-5147.
- [314] A.K. Bhuyan, On the mechanism of SDS-induced protein denaturation, *Biopolymers*, 93 (2010) 186-199.
- [315] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical methods: fundamentals and applications*, 2 ed., Wiley, New York, 2001.
- [316] S.C.B. Oliveira, A.M. Oliveira-Brett, Voltammetric and electrochemical impedance spectroscopy characterization of a cathodic and anodic pre-treated boron doped diamond electrode, *Electrochimica Acta*, 55 (2010) 4599-4605.
- [317] A.M. Oliveira-Brett, C.M. Brett, L.A. Silva, An impedance study of the adsorption of nucleic acid bases at glassy carbon electrodes, *Bioelectrochemistry*, 56 (2002) 33-35.
- [318] S.C. Oliveira, A.M. Oliveira-Brett, DNA-electrochemical biosensors: AFM surface characterisation and application to detection of in situ oxidative damage to DNA, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 13 (2010) 628-640.
- [319] M.R. Redinbo, L. Stewart, P. Kuhn, J.J. Champoux, W.G. Hol, Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA, *Science*, 279 (1998) 1504-1513.
- [320] J.F. Carey, S.J. Schultz, L. Sisson, T.G. Fazzio, J.J. Champoux, DNA relaxation by human topoisomerase I occurs in the closed clamp conformation of the protein, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (2003) 5640-5645.
- [321] J.M. Antosiewicz, D. Shugar, UV-Vis spectroscopy of tyrosine side-groups in studies of protein structure selected applications, *Biophysical Reviews*, 8 (2016) 163-177.
- [322] J.R. Brody, S.E. Kern, History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis, *Analytical Biochemistry*, 333 (2004) 1-13.
- [323] J.K. Fredrickson, J.M. Zachara, D.L. Balkwill, D. Kennedy, S.M. Li, H.M. Kostandarthes, M.J. Daly, M.F. Romine, F.J. Brockman, Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the hanford site, washington state, *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (2004) 4230-4241.

- [324] C.R. Woese, O. Kandler, M.L. Wheelis, Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87 (1990) 4576-4579.
- [325] D.L. Hopkins, *Xylella Fastidiosa: Xylem-Limited Bacterial Pathogen of Plants*, *Annual Review of Phytopathology*, 27 (1989) 271-290.
- [326] H. Doddapaneni, J.Q. Yao, H. Lin, M.A. Walker, E.L. Civerolo, Analysis of the genome-wide variations among multiple strains of the plant pathogenic bacterium *Xylella fastidiosa*, *Bmc Genomics*, 7 (2006).
- [327] M. Saponari, D. Boscia, F. Nigro, G.P. Martelli, Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (Southern Italy), *Journal of Plant Pathology*, 95 (2013) 659-668.
- [328] N. Denance, B. Legendre, M. Briand, V. Olivier, C. Boisseson, F. Poliakoff, M.-A. Jacquesa, Several subspecies and sequence types are associated with the emergence of *Xylella fastidiosa* in natural settings in France, *Plant Pathology*, 66 (2017) 1054-1064.
- [329] D. Olmo, A. Nieto, F. Adrover, A. Urbano, O. Beidas, A. Juan, E. Marco-Noales, M.M. López, I. Navarro, A. Monterde, M. Montes-Borrego, J.A. Navas-Cortés, B.B. Landa, First Detection of *Xylella fastidiosa* Infecting Cherry (*Prunus avium*) and *Polygala myrtifolia* Plants, in Mallorca Island, Spain, *Plant Disease*, 101 (2017).
- [330] C. Dias, Aumentou a área contaminada com a bactéria *Xylella fastidiosa*, Público, 2019.
- [331] A.J. Simpson, F.C. Reinach, P. Arruda, F.A. Abreu, M. Acencio, R. Alvarenga, L.M. Alves, J.E. Araya, G.S. Baia, C.S. Baptista, M.H. Barros, E.D. Bonaccorsi, S. Bordin, J.M. Bove, M.R. Briones, M.R. Bueno, A.A. Camargo, L.E. Camargo, D.M. Carraro, H. Carrer, N.B. Colauto, C. Colombo, F.F. Costa, M.C. Costa, C.M. Costa-Neto, L.L. Coutinho, M. Cristofani, E. Dias-Neto, C. Docena, H. El-Dorry, A.P. Facincani, A.J. Ferreira, V.C. Ferreira, J.A. Ferro, J.S. Fraga, S.C. Franca, M.C. Franco, M. Frohme, L.R. Furlan, M. Garnier, G.H. Goldman, M.H. Goldman, S.L. Gomes, A. Gruber, P.L. Ho, J.D. Hoheisel, M.L. Junqueira, E.L. Kemper, J.P. Kitajima, J.E. Krieger, E.E. Kuramae, F. Laigret, M.R. Lambais, L.C. Leite, E.G. Lemos, M.V. Lemos, S.A. Lopes, C.R. Lopes, J.A. Machado, M.A. Machado, A.M. Madeira, H.M. Madeira, C.L. Marino, M.V. Marques, E.A. Martins, E.M. Martins, A.Y. Matsukuma, C.F. Menck, E.C. Miracca, C.Y. Miyaki, C.B. Monteriro-Vitarello, D.H. Moon, M.A. Nagai, A.L. Nascimento, L.E. Netto, A. Nhani, Jr., F.G. Nobrega, L.R. Nunes, M.A. Oliveira, M.C. de Oliveira, R.C. de Oliveira, D.A. Palmieri, A. Paris, B.R. Peixoto, G.A. Pereira, H.A. Pereira, Jr., J.B. Pesquero, R.B. Quaggio, P.G. Roberto, V. Rodrigues, M.R.A.J. de, V.E. de Rosa, Jr., R.G. de Sa, R.V. Santelli, H.E. Sawasaki, A.C. da Silva, A.M. da Silva, F.R. da Silva, W.A. da Silva, Jr., J.F. da Silveira, M.L. Silvestri, W.J. Siqueira, A.A. de Souza, A.P. de Souza, M.F. Terenzi, D. Truffi, S.M. Tsai, M.H. Tshako, H. Vallada, *et al.*, The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis, *Nature*, 406 (2000) 151-159.
- [332] M. Frohme, A.A. Camargo, S. Heber, C. Czink, A.J. Simpson, J.D. Hoheisel, A.P. de Souza, Mapping analysis of the *Xylella fastidiosa* genome, *Nucleic Acids Research*, 28 (2000) 3100-3104.
- [333] D. Strausak, J.F. Mercer, H.H. Dieter, W. Stremmel, G. Multhaup, Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases, *Brain Research Bulletin*, 55 (2001) 175-185.
- [334] H. Fritzsche, C. Zimmer, Infrared Studies of Deoxyribonucleic Acids, their Constituents and Analogues, *European Journal of Biochemistry banner*, 5 (1968) 42-44.

CAPÍTULO 11

Artigos Publicados

Isotretinoin Oxidation and Electroanalysis in a Pharmaceutical Drug Using a Boron-doped Diamond Electrode

W. B. S. Machini,^[a] T. A. Enache,^[a] S. M. A. Jorge,^[a, b] and A. M. Oliveira-Brett^{*[a]}

Abstract: Isotretinoin redox behaviour, by voltammetry, at the cathodic pre-treated boron doped diamond electrode by cyclic, differential pulse and square wave voltammetry, and by spectrophotometry in a wide pH range, was investigated. The isotretinoin oxidation was an irreversible, diffusion-controlled process, occurred in a three-step cascade mechanism, and the isotretinoin

diffusion coefficient $D_{13\text{-cis-RA}} = 7.35 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, was calculated. The UV-Vis isotretinoin maximum absorption was pH-dependent. The detection limits $\text{LOD} = 0.53 \text{ } \mu\text{M}$, by differential pulse voltammetry, and $\text{LOD} = 0.38 \text{ } \mu\text{M}$, by UV-Vis spectroscopy, were obtained. The isotretinoin in the pharmaceutical drug Roacutan[®], using differential pulse voltammetry, was determined.

Keywords: Isotretinoin • 13-cis-retinoic acid • Electrochemical oxidation • Boron-Doped Diamond

1 Introduction

The development of retinoid synthetic analogues emerged from the need to find an agent with a greater therapeutic index than vitamin A, one source retinol (ATR), or its naturally occurring derivatives. Isotretinoin ((2Z,4E,6E,8E)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohexen-1-yl)nona-2,4,6,8-tetraenoic acid), also known as 13-cis-retinoic acid (13-cis-RA), synthesized in 1955, was the first retinoid used in acne therapy or as chemotherapy medication [1].

Since its approval, 13-cis-RA has been used mainly as an oral pharmaceutical drug in the treatment of severe recalcitrant nodular, inflammatory, and conglobate acne [2], and rarely, to prevent certain skin cancers [3]. The absorption of the drug occurs in the intestine and the peak levels were reached in 2–4 hours after ingestion. *In vitro* and *in vivo* studies have evidenced the therapeutic effect of 13-cis-RA in acne treatment, such as, suppression of the size and activity of the sebaceous gland [4,5], inhibition of the inflammation and hyperkeratinisation process [5], induction of apoptosis in sebaceous glands [6], inhibition of dihydrotestosterone [7], which is the most potent androgen that directly influences acne, and normalization of the expression of tissue matrix metalloproteinases [8].

Although 13-cis-RA has revolutionized the treatment of severe acne, adverse effects such as teratogenicity, liver dysfunction, hypertriglyceridemia, hyper-cholesterolemia, skin and mucous dryness, alopecia, visual disturbances, brain pseudotumor, arthralgia and muscle pain, as well as psychiatric disorders, such as depression, suicidal ideation, psychosis, aggression and impulsivity, have been reported [8].

In order to avoid these side effects there is an ongoing need for the determination of 13-cis-RA pharmacokinetics so that issues as drug-to-drug or drug-

bimolecular complex interaction could be evaluated. Detection and quantitation of 13-cis-RA is also very important. Therefore, to support pharmacokinetic studies with sufficient speed, suitable analytical procedures are required. The separation, quantification and detection of 13-cis-RA are performed mainly using the liquid chromatographic method with different detectors, such as ultraviolet [9–12], mass spectrometry [10,13–17], tandem mass spectrometry [18], fluorescence [19], diode-array [20] and electrochemical [21–23]. The electrochemical behaviour of different retinoids, including 13-cis-RA, and their simultaneous quantification in cosmetics at electrodeposited metal modified-glassy carbon electrodes has been already reported [24].

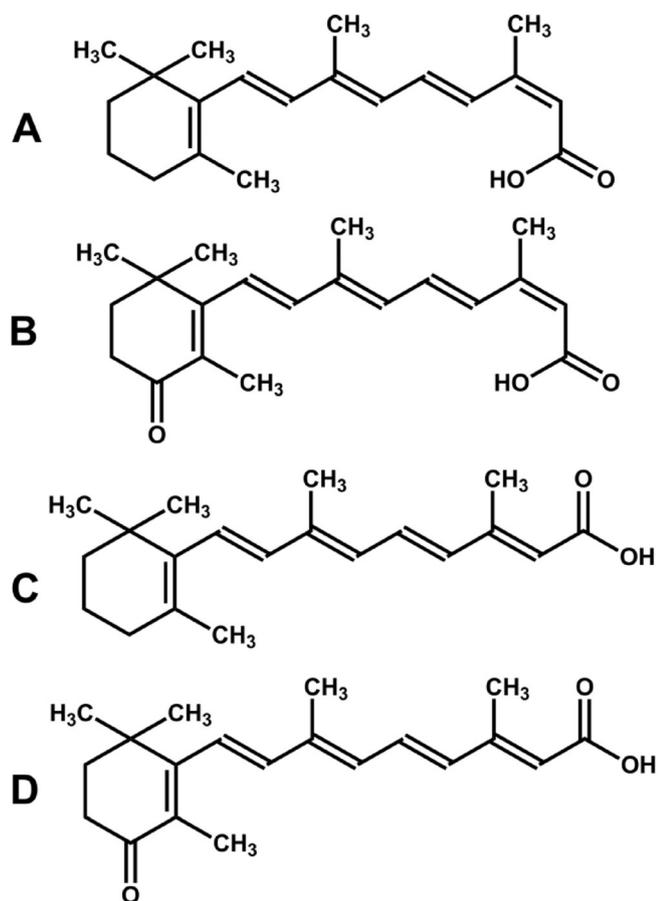
The isotretinoin (13-cis-retinoic acid (13-cis-RA)) oxidation gives rise to 4-oxo-isotretinoin, as main metabolite, tretinoin (all-trans-retinoic acid (ATRA)) and 4-oxo-tretinoin, Scheme 1, and additional studies are needed to elucidate its mechanism of action at the regulatory level of gene transcription.

The investigation of the electrochemical oxidation mechanisms of 13-cis-RA is important since this could result in a better understanding of the data already known and increase the overall knowledge of 13-cis-RA physiological mechanisms of action.

The purpose of this work was to investigate the electrochemical behaviour and the electron transfer

[a] W. B. S. Machini, T. A. Enache, S. M. A. Jorge, A. M. Oliveira-Brett
Department of Chemistry, Faculty of Sciences and Technology, University of Coimbra, 3004-535, Coimbra, Portugal
*e-mail: brett@ci.uc.pt

[b] S. M. A. Jorge
Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, 18618-000, Botucatu, SP, Brazil



Scheme 1. Chemical structures: (A) isotretinoin, (B) 4-oxo-isotretinoin, (C) tretinoin, and (D) 4-oxo-tretinoin.

mechanism of 13-cis-RA using cyclic, differential pulse and square wave voltammetry, at a boron-doped diamond electrode. The choice of boron-doped diamond as working electrode surface was based on its interesting properties, compared with carbon or gold, such as stability in both aqueous, and non-aqueous electrolyte solutions, negligible adsorption of organic molecules, low and stable voltammetric background current and low capacitance, resulting in a low detection limit [25]. The 13-cis-RA electroanalytical determination in the pharmaceutical drug Roacutan[®], was investigated.

2 Experimental

2.1 Materials and Reagents

Isotretinoin (13-cis retinoic acid (13-cis-RA)) (R3255, purity $\geq 98\%$), all-trans-retinoic acid (stereoisomer) (ATRA) (R2625, purity $\geq 98\%$), and all-trans-retinol (ATR) (R7632, purity $\geq 95\%$), were obtained from Sigma–Aldrich, Spain, and used without further purification, and hard-shelled gelatine capsules of Roacutan[®] were obtained from Roche. Stock solutions of 1.0 mM were prepared daily in methanol. Work solutions of different concentrations were prepared by dilution of the appropriate volume of methanolic stock solutions in supporting electrolyte.

Supporting electrolyte solutions, with ionic strength $I=0.1$ M, of different pH composition: pH 2.1 (HCl + KCl), pH 3.1 (HOAc + NaOAc), pH 4.5 (HOAc + NaOAc), pH 5.4 (HOAc + NaOAc), pH 6.2 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$), pH 7.2 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$), pH 8.2 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$), pH 9.2 (NaOH + $\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_7$), pH 11.2 (NaOH + Na_2HPO_4), using analytical grade reagents and purified water from a Millipore Milli-Q system (conductivity $\leq 0.1 \mu\text{S cm}^{-1}$), according to the literature, were prepared [26].

Microvolumes were measured using EP-10 and EP-100 Plus Motorized Microliter Pippettes (Rainin Instrument Co. Inc., Woburn, USA). The pH measurements were carried out with a Crison micropH 2001 pH-meter with an Ingold combined glass electrode.

Studies on the stability of isotretinoin revealed the occurrence of physical and chemical changes due to exposure to atmospheric oxygen, light, humidity and high temperatures [27].

All experiments were performed using freshly prepared solutions, $T=298$ K (25°C).

2.2 Voltammetric Parameters and Electrochemical Cells

Voltammetric experiments were carried out using a μ Autolab, running with GPES 4.9 software, Metrohm/Autolab, The Netherlands. The measurements were carried out using a three-electrode system in a 2 mL one compartment electrochemical cell (eDAQ Europe). Measurements were carried out using a boron-doped diamond electrode (BDDE), ($5 \times 5 \text{ mm}^2$), or a glassy carbon electrode (GCE) ($d=1.5 \text{ mm}$), as working electrodes, a Pt wire as counter electrode and an Ag/AgCl (3 M KCl) as reference electrode.

The boron-doped diamond films were prepared at the Centre Suisse de Electronique et de Microtechnique SA (CSEM), Neuchatel, Switzerland, on silicon wafers using the hot filament chemical vapour deposition (HF-CVD) technique with a filament temperature in the range 2440–2560 $^\circ\text{C}$ and a gaseous mixture containing methane, H_2 and trimethylboron. This HF-CVD process gives a columnar, randomly textured polycrystalline BDD film with the surface dominated by {111} facets. The final boron content was of the order of 8000 ppm, $5.5 \times 5.5 \text{ mm}^2$ surface area, and $\sim 1 \mu\text{m}$ thickness [28].

The experimental conditions for differential pulse (DP) voltammetry were: pulse amplitude 50 mV, pulse width 100 ms, step potential 2 mV and scan rate 5 mVs^{-1} . For square wave (SW) voltammetry, pulse amplitude 50 mV, frequency 13 Hz, and potential increment 2 mV, corresponding to an effective scan rate of 25 mVs^{-1} , were used. Cyclic voltammograms (CV) were obtained using potential increment 2 mV at variable scan rates.

2.3 Electrochemical Pre-treatment of BBDE

Prior to use, the BDDE was washed with ethanol and Milli-Q water, and the surface was activated in 1 M

HNO₃ solution using a cathodic pre-treatment: a potential of -2.0 V was applied for 30 s. Following this, the electrode was cycled between the potential limits of $E_1=0.0$ V and $E_2=+1.4$ V, until a stable signal was detected (15–20 cycles at a potential scan rate of 150 mVs⁻¹).

After this electrochemical activation, the BDDE was thoroughly rinsed with Milli-Q water, placed in the appropriate supporting electrolyte, and successive CVs were recorded between the potential limits of $E_1=0.0$ V and $E_2=+1.4$ V until a stable signal (3–5 cycles at a potential scan rate of 50 mVs⁻¹). This procedure ensured very reproducible experimental results.

2.4 UV-Vis Spectrophotometry

UV-Vis measurements were performed using a Spectrophotometer Hitachi U-2810 running with UV Solution Program (Digilab Hitachi, Tokyo, Japan). The experimental conditions for absorption spectra were: 400 nm/min scan rate (resolution of 1 nm). All UV-Vis spectra were measured in a quartz glass cuvette with an optical path of 10.0 mm.

2.5 Acquisition and Presentation of Data

All the voltammograms presented were background-subtracted and baseline-corrected using the moving average with a step window of 5 mV included in GPES version 4.9 software. This mathematical treatment improved the visualization and identification of peaks over the baseline without introducing any artefact, although the peak height is in some cases reduced ($<10\%$) relative to that of the untreated curve. Nevertheless, this mathematical treatment of the original voltammograms was used in the presentation of all experimental 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.

All the UV-Vis spectra presented were shown without any further mathematical treatment and all values of λ_{\max} and absorbance were obtained from the original spectra.

2.6 Sample Preparation and 13-cis-RA Determination in a Pharmaceutical Drug

The pharmaceutical oral dosage form used Roacutan® (Roche) was a hard-shelled gelatine drug delivery capsule containing 20 mg isotretinoin (13-cis-RA), as the active pharmaceutical ingredient, embedded into an unknown amount of a viscous matrix containing glycerol, soy oils and different adjuvants.

In order to extract 13-cis-RA, the hard-shelled gelatine capsule of Roacutan® (Roche) was incubated in 2 mL dimethyl sulfoxide and digested for 2 hours. After digestion, 8 mL methanol were added and the total

sample was sonicated for 1 hour, and ultracentrifuged for 15 minutes at 4000 rpm. The liquid supernatant Roacutan® stock solution was separated and electroanalysed. This procedure was repeated with a different capsule three times ($n=3$).

The multiple standard addition procedure was initiated with a sample volume of 2 μ L Roacutan® stock solution, in 2 mL supporting electrolyte 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 , in the electrochemical cell. The standard addition volumes of 2 , 4 and 6 μ M of 13-cis-RA standard solution, were added.

3 Results and Discussion

3.1 Cyclic Voltammetry

The electrochemical behaviour of 13-cis-RA at BDDE was first studied using CV in 0.1 M phosphate buffer solution pH 7.0 , at a scan rate $\nu=25$ mVs⁻¹. The CVs were recorded at BDDE, in 100 μ M 13-cis-RA, between the potential limits $+0.25$ V and $+1.15$ V, and showed three oxidation peaks, peak P1 at $E_{\text{pa}1}=+0.60$ V, peak P2 at $E_{\text{pa}2}=+0.77$ V, and peak P3 at $E_{\text{pa}3}=+0.98$ V, Fig. 1. Reversing the voltammetric scan no anodic peak appeared, indicating that the oxidation process was irreversible [29]. Recording successive scans in the same solution, without cleaning the electrode surface, a current decrease for all peaks was observed, due to the adsorption of 13-cis-RA and/or its oxidation products at the BDDE surface, Fig. 1.

CVs were also recorded in the same conditions using the GCE and only two wide anodic peaks with very low oxidation currents were obtained. On the second CV scan both peaks merged with the background electrolyte showing that 13-cis-RA and its oxidation products adsorbed very strongly at the electrode surface. Therefore, for a better reproducibility and repeatability, BDDE was chosen as working electrode.

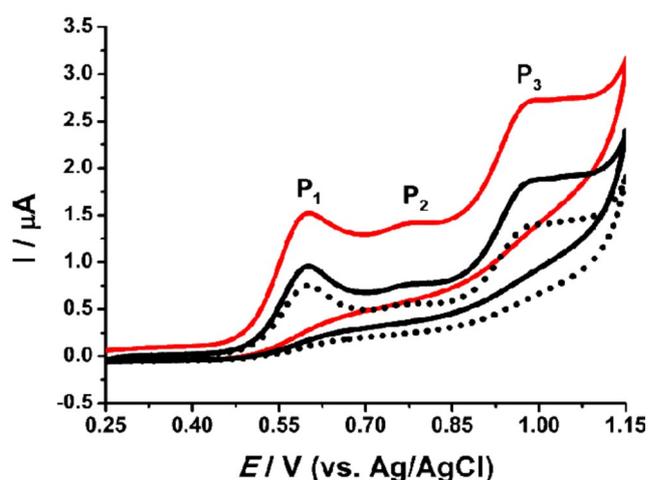


Fig. 1. CVs obtained in 100 μ M [13-cis-RA], at BDDE, in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 , (\cdots) first, (—) second and (—) third scan, $\nu=25$ mVs⁻¹.

The scan rate effect on the oxidation process of 13-cis-RA peak P1 was investigated recording CVs in 100 μM 13-cis-RA, in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0, at scan rates between 5–50 mVs^{-1} , using always a newly activated BDDE.

The oxidation peak P1 current, $I_{\text{pa}}(\text{A}) = 2.99 \times 10^5 n (\alpha_c n)^{1/2} A [R]_{\infty} D_O^{1/2} \nu^{1/2}$, increased linearly with $\nu^{1/2}$, indicating that the oxidation process was diffusion-limited [29] and the 13-cis-RA diffusion coefficient, $D_{13\text{-cis-RA}} = 1.07 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0, was calculated. The BDDE electroactive area, $A = 0.127 \text{ cm}^2$, was determined using a 1.0 mM hexacyanoferrate in phosphate buffer solution ($D_O = 7.35 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$).

3.2 Differential Pulse Voltammetry

The effect of pH on the electrochemical oxidation of 13-cis-RA at BDDE was investigated in a wide pH range using DP voltammetry. The DP voltammograms were recorded in 25 μM 13-cis-RA solutions, using a clean activated BDDE.

For $2.1 < \text{pH} < 6.2$, Fig. 2, only the oxidation peaks P1 and P3 occurred. The oxidation peak P1 was pH-dependent, following the equation $E_p(\text{V}) = 0.77 - 0.033 \text{ pH}$. The slope of the dotted line, Fig. 2B, of 33 mV/pH and the width at half-height of the peak of $W_{1/2} \sim 60 \text{ mV}$, showed that the peak P1 oxidation mechanism involved the transfer of two electrons and one proton. The oxidation peak P3 was pH-independent, the width at the half-height was close to the theoretical value of $W_{1/2} \sim 90 \text{ mV}$, and the peak P3 oxidation mechanism involved the transfer of one electron.

Increasing the supporting electrolyte $\text{pH} > 6.2$ the anodic peak P2, at $E_p = +0.71 \text{ V}$, appeared and the oxidation reaction occurred in a pH-independent manner, with the transfer of one electron, Fig. 2. Moreover, the peak P1 oxidation potential also became pH-independent, with the transfer of one electron, and the last peak P3 oxidation, remained pH-independent, Fig. 2.

3.3 Square Wave Voltammetry

One of the most important advantages of SW voltammetry is the possibility to verify the reversibility of the electron transfer reaction during only one scan. Since the current is sampled in both positive and negative-going pulses, peaks corresponding to the oxidation and reduction of the electroactive species at the electrode surface can be obtained in the same scan. Other advantages are greater speed of analysis, lower consumption of the electroactive species in relation with DP voltammetry and reduced problems with the adsorption on the GCE surface [25]. The SW voltammetry experiments enabled to confirm the 13-cis-RA oxidation mechanisms.

The SW voltammograms, in 50 μM 13-cis-RA, in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0, at a clean BDDE surface, were recorded. Similarly to CV and DP voltammetry, three

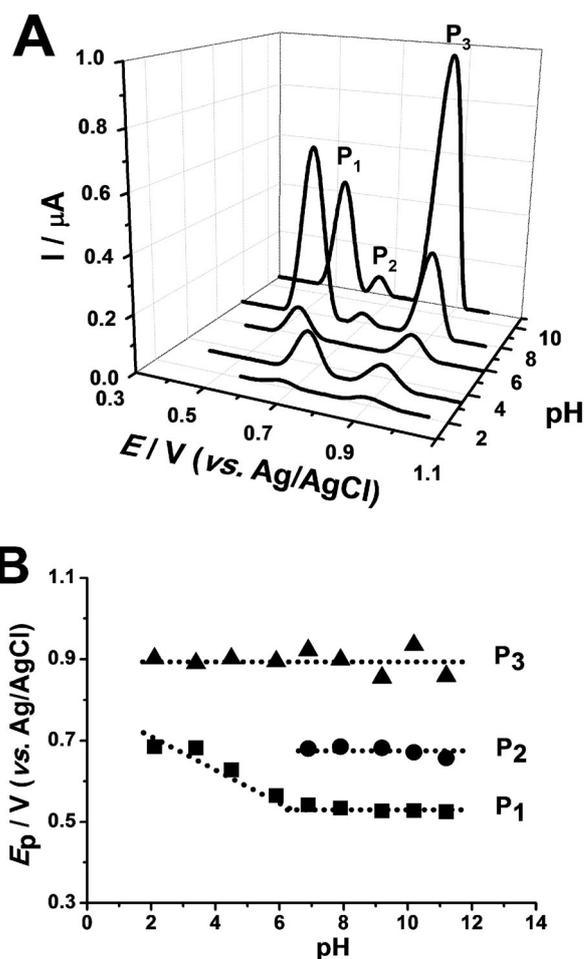


Fig. 2. (A) 3D DP voltammograms baseline corrected, at BDDE, in 25 μM of [13-cis-RA], at different pHs; (B) E_p vs. pH.

consecutive electrode reactions were observed. Plotting the forward (I_f) and backward (I_b) components of the total (I_t) current, the irreversibility of all three redox peaks was confirmed Fig. 3.

3.4 Redox Behaviour of All-trans-retinol and All-trans-retinoic Acid

In order to clarify the 13-cis-RA oxidation behaviour two similar retinoids, all-trans-retinol (ATR) and all-trans-retinoic acid (stereoisomer) (ATRA), were investigated, Fig. 4. DP voltammograms in 25 μM ATR or ATRA, at a newly activated BDDE, in 0.1 M phosphate buffer solution pH 7.0, were recorded.

In the DP voltammogram in 13-cis-RA three oxidation peaks, at $E_{\text{pa}1} = +0.54 \text{ V}$, $E_{\text{pa}2} = +0.72 \text{ V}$, and $E_{\text{pa}3} = +0.91 \text{ V}$, were observed. In the DP voltammogram of ATRA three oxidation peaks appeared. However, the oxidation peak currents were lower and the peak P1 shifted to a higher potential, Fig. 4. This behavior can be explained taking into account the 3D orientation, hydrophobicity, and the ATRA physicochemical properties.

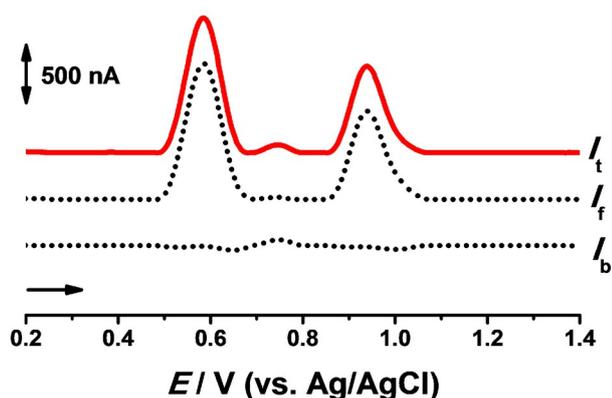


Fig. 3. SW voltammograms baseline corrected, in 50 μM of [13-cis-RA], at BDDE, in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0; pulse amplitude 50 mV, $f=13$ Hz, step potential 2 mV, $v_{\text{ef}}=25$ mV s^{-1} . I_t – total current, I_f – forward current, I_b – backward current.

In the DP voltammogram in ATR only two anodic peaks, $E_{\text{pa}1}=+0.55$ V and $E_{\text{pa}2}=+0.69$ V, were observed, similar to 13-cis-RA first two oxidation peak potentials, and peak P1 currents were similar in both compounds, Fig. 4.

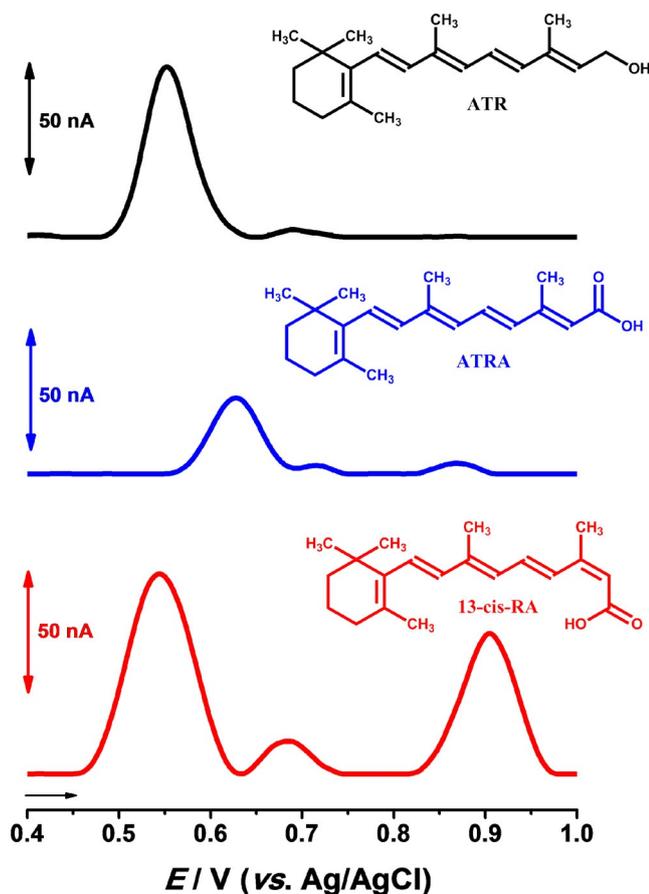


Fig. 4. DP voltammograms baseline corrected, in 25 μM : (—) 13-cis RA, (—) ATRA and (—) ATR; at BDDE, in 0.1 M phosphate buffer pH=7.0, $v=5$ mV s^{-1} .

3.5 Spectrophotometric Determination

Retinoids have strong absorption in the UV-Vis region due to their multiple conjugated carbon-carbon double bonds. ATR, which have five conjugated double bonds, absorb maximally at $\lambda=325$ nm, whereas ATRA, which has an additional double bond (C=O of the carboxyl group) in conjugation absorb at $\lambda=350$ nm, in alcohol [30]. In the same way, it was expected that 13-cis-RA, an isomer of ATRA, presented a strong absorption band near to $\lambda\sim 350$ nm.

The absorption spectra for 30 μM 13-cis-RA were obtained from 600 to 200 nm, for different supporting electrolyte pHs. As expected, all 13-cis-RA spectra presented just one absorption band corresponding to the $\pi\rightarrow\pi^*$ transition to their four conjugated carbon-carbon double bonds. A maximum absorption $\lambda_{\text{max}}=399$ nm was obtained at pH 2.0 and increasing the pH to 7.0 and 11.0 it changed to $\lambda_{\text{max}}=345$ nm. Furthermore, with the pH increase the absorbance also increased: from 0.524 a.u. at pH 2.0, to 0.747 a.u. at pH 7.0 and 0.942 a.u. at pH 11.0.

3.6 Standards Calibration

DP voltammograms, at a clean BDDE after standard additions of 13-cis-RA, corresponding to bulk concentrations between 0.5 and 100 μM , were recorded, Fig. 5A. The electroanalytical determination of 13-cis-RA standards was carried out by DP voltammetry, measuring the 13-cis-RA peak P1 oxidation current, and gave a LOD=0.53 μM and a LOQ=1.77 μM . Each measurement was always performed using a clean BDDE surface, a process that gave rise to small changes in the BDDE surface area, which can in turn cause small variations in the peak currents measured, and this was the main reason for the differences in the results obtained. The data extracted from three calibration

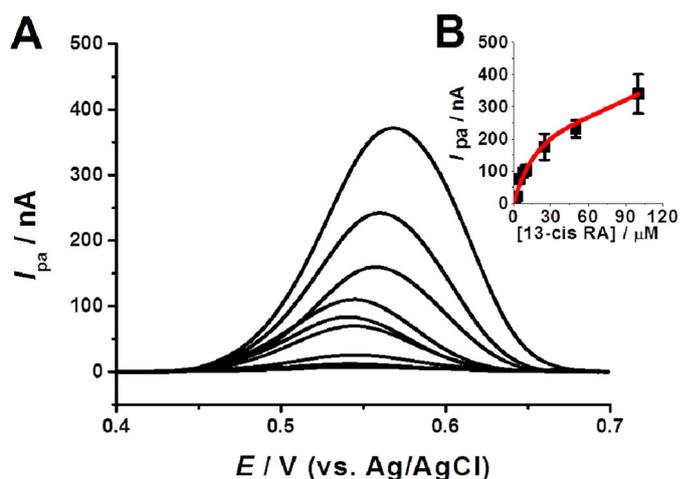


Fig. 5. (A) DP voltammograms baseline corrected, at BDDE, in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0, for 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 25.0, 50.0 and 100.0 μM [13-cis-RA]. (B) Insert: calibration curve.

Table 1. Electrochemical and spectrophotometric parameters from 13-cis-RA calibration curves.

	Linear Range	Sensitivity	Intercept	LOD	LOQ	SD	R ²
EC	0.5–5.0 μM	15.3 nA/μM	−1.66 nA	0.53 μM	1.77 μM	2.71 nA	0.995
UV-Vis	1.0–12.0 μM	0.08 a.u./μM	0.01 a.u.	0.38 μM	1.25 μM	0.01 a.u.	0.999

curves, Fig. 5B, was demonstrated by the values of $R^2=0.995$, a wider linear range following the equation $I_{pa}(nA)=15.3 (nA \mu M^{-1}) [13\text{-cis-RA}] (\mu M)-1.66 (nA)$. The relative standard deviation (R.S.D.) was less than 7 nA.

The absorption spectra, for standard additions of 13-cis-RA, corresponding to bulk concentrations between 1 and 12 μM, were obtained. The UV-Vis spectrophotometric determination of 13-cis-RA gave a LOD=0.38 μM and a LOQ=1.25 μM. The data extracted from the three calibration curves was demonstrated by the values of $R^2=0.999$, a wider linear range following the equation $A (a.u.)=0.08 (a.u. \mu M^{-1}) [13\text{-cis-RA}] (\mu M)+0.01 (a.u.)$. The relative standard deviation (R.S.D.) was less than 0.06 a.u.

The 13-cis-RA detection limit (LOD) was determined from the equation $LOD=3 \times SD \times (sensitivity)^{-1}$, where SD is the standard deviation of the peak current, for DP voltammetry, or absorbance, for spectrophotometry, and the sensitivity is the slope of the calibration plot.

The quantification limit (LOQ), the lowest concentration that can be quantified with acceptable precision and accuracy, is given by $LOQ=10 \times SD \times (sensitivity)^{-1}$.

The results obtained using DP voltammetry at BDDE were compared with those obtained by UV-Vis spectrophotometry, and are summarized in Table 1.

3.7 Determination in Roacutan® Pharmaceutical Formulation

The electrochemical technique for the quantification of 13-cis-RA in Roacutan®, was used. The 13-cis-RA standard calibration gave a LOD=0.53 μM, and the procedure used for electroanalysis of 13-cis-RA in Roacutan®, Section 2.6, was followed.

The electroanalytical determination by DP voltammetry, measuring the pharmaceutical formulation Roacutan® first peak P1 oxidation current, using the multiple standard addition method, at BDDE, was carried out. First, 2 μL of Roacutan® stock solution were added to 2 mL supporting electrolyte 0.1 M phosphate buffer pH 7.0, and the DP voltammogram was recorded. Subsequently, 2, 4 and 6 μM 13-cis-RA standard were added, and the peak P1 oxidation currents, after each 13-cis-RA standard addition, were measured. Before each measurement the BDDE was always cleaned. The amount of 19.3 ± 0.7 mg 13-cis-RA, in the hard-shelled gelatine drug delivery capsule Roacutan® pharmaceutical formulation, was found. This amount of 13-cis-RA was in agreement with 19.6 mg obtained by UV-Vis.

3.8 Discussion

The electrochemical behaviour of 13-cis-RA at BBDE in a wide pH range of electrolytes using CV, DP and SW voltammetry, was investigated. It was shown that the oxidation occurred in a three-step consecutive mechanism.

In acid media the first P1 oxidation step of 13-cis-RA involved a proton transfer, whereas the second P2 and third P3 oxidation reactions were pH-independent. For $pH > 5$, corresponding to the 13-cis-RA $pK_a=5$, all oxidation steps were pH-independent.

Two similar retinoids, ATR and stereoisomer ATRA, were also investigated and the results compared with 13-cis-RA oxidation. The oxidation of stereoisomer ATRA occurred in three oxidation steps while oxidation of ATR all-trans-retinol occurred in two steps. These results are in agreement with oxidation mechanisms of other similar compounds [31].

The 13-cis-RA and ATR are conjugated pentaenes, and the oxidation occurred in the same mechanism of other di- and trienes. The product of 13-cis-RA first one electron oxidation, at the conjugated double bond, was an unstable radical cation which reacted with the solvent or with a 13-cis-RA molecule forming a dimer.

The interaction of the unstable radical cation with the solvent occurred with the loss of a proton and a new radical, which underwent a second one-electron oxidation to another cation, and formed dihydroxy- or epoxide-derivatives, as final oxidation products after successive reactions.

The interaction of the unstable radical cation with a 13-cis-RA molecule, through the attack of a double bond, occurred producing a dimer cation. The reaction of the dimer cation and the solvent, with the loss of a proton, resulted in a new dimer radical that can undergo further one-electron oxidation at the electrode surface and further reaction with the solvent.

All 13-cis-RA absorption spectra recorded, at different pHs, showed one band corresponding to a $\pi \rightarrow \pi^*$ transition, however, a shift of λ_{max} in the spectra for pHs 2.0 to 7.0 and 11.0, was observed. These results were consistent with the fact that for $pHs > 5.0$ (pK_a) the molecule is in its ionized form, therefore, is affected by the carbonyl oxygen that is conjugated with the polyene system. Such effect is usually associated with the increase of the molar extinction coefficient. The resulting charge transfer excited state effect allowed the $\pi \rightarrow \pi^*$ transition in the ionized form of 13-cis-RA to occur more frequently, requiring less energy.

The electroanalytical determination of 13-cis-RA standards carried out by DP voltammetry (measuring the

first peak P1 oxidation current) gave a LOD = 0.53 μM , and by UV-Vis spectrophotometry (measuring the absorbance at $\lambda = 345 \text{ nm}$) gave a LOD = 0.38 μM .

The electroanalytical quantification of 13-cis-RA in the Roacutan[®] pharmaceutical formulation, was performed. The final amount of $19.3 \pm 0.7 \text{ mg}$ 13-cis-RA, by DP voltammetry, using multiple standard additions, was found in Roacutan[®] pharmaceutical formulation, in agreement with the 13-cis-RA content in the hard-shelled gelatine capsules of Roacutan[®] obtained from Roche.

4 Conclusions

The electrochemical oxidation of 13-cis-RA, an important retinoid used in the treatment of various types of acne, at a cathodic pre-treated BDDE by CV, DP and SW voltammetry, in a wide pH range, was studied. The oxidation at BDDE is a diffusion-controlled process and occurred in three irreversible consecutive steps. In acid electrolytes, the first electrode reaction involved a proton transfer, whereas the second and third oxidation reactions were pH-independent. For electrolytes with pHs above $\text{pK}_a = 5$ all oxidation steps were pH-independent.

UV-Vis spectra of 13-cis-RA recorded at different pHs showed only one absorption band. Increasing the pH, from acid to neutral and alkaline, a change of λ_{max} , from 399 nm to 345 nm was observed. At the same time the absorbance increased, explained by the increase of the molar extinction coefficient with the pH increase.

The electroanalytical quantification of 13-cis-RA, in Roacutan[®] pharmaceutical formulations, using DP voltammetry at BDDE, was in agreement with the 13-cis-RA content in the hard-shelled gelatine capsules of Roacutan[®] obtained from Roche.

Considering the toxicity and adverse reactions of retinoids family, mainly isotretinoin, this study is very interesting, enabling the development of an electroanalytical determination methodology in pharmaceutical formulations.

Acknowledgements

Financial support from Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Grant SFRH/BPD/80195/2011 (T. A. Enache), project PTDC/QEQ-MED/0586/2012, UID/EMS/00285/2013, CEMUC-R (Research Unit 285), (co-financed by the European Community Fund FEDER), FEDER funds through the program COMPETE – Programa Operacional Factores de Competitividade, and PhD Grant 232296/2014-6 (W. B. S. Machini) from CNPq/Brazil, are gratefully acknowledged.

References

- [1] E. H. Heller, N. J. Shiffman, *Can. Med. Assoc. J.* **1985**, *132*, 1129–1136.
- [2] A. Layton, *Dermatoendocrinol.* **2009**, *1*, 162–169.
- [3] S. B. Nickle, N. Peterson, M. Peterson, *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* **2014**, *7*, 22–34.
- [4] L. Hommel, J. M. Geiger, M. Harms, J. H. Saurat, *Dermatology* **1996**, *193*, 127–130.
- [5] G. Plewig, H. Dressel, M. Pflieger, S. Michelsen, A. M. Kligman, *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* **2004**, *2*, 31–45.
- [6] A. M. Nelson, K. L. Gilliland, Z. Cong, D. M. Thiboutot, *J. Invest. Dermatol.* **2006**, *126*, 2178–2189.
- [7] T. Karlsson, A. Vahlquist, N. Kedishvili, H. Torma, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *303*, 273–278.
- [8] R. Ganceviciene, C. C. Zouboulis, *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* **2010**, *8*, 47–59.
- [9] M. Mahajan, R. Singh, S. K. Jain, *Curr. Pharm. Anal.* **2015**, *11*, 278–285.
- [10] Y. S. Yang, P. J. Faustino, P. S. Pine, H. Davis, N. Grunberg, J. Phillips, R. C. Lyon, L. X. Yu, A. B. Ciavarella, A. V. Del Grosso, J. P. Hanig, *J. Pharmaceut. Biomed.* **2005**, *37*, 157–163.
- [11] R. Wyss, F. Bucheli, *J. Chromatogr. B* **1997**, *700*, 31–47.
- [12] B. M. Tashtoush, E. L. Jacobson, M. K. Jacobson, *J. Pharmaceut. Biomed.* **2007**, *43*, 859–864.
- [13] M. A. Kane, N. Chen, S. Sparks, J. L. Napoli, *Biochem. J.* **2005**, *388*, 363–369.
- [14] L. L. Wu, J. J. Wu, K. Zhou, F. Cheng, Y. Chen, *J. Pharmaceut. Biomed.* **2011**, *56*, 324–329.
- [15] P. A. Lehman, T. J. Franz, *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 287–290.
- [16] U. B. Ranalder, B. B. Lausecker, C. Huselton, *J. Chromatogr.* **1993**, *617*, 129–135.
- [17] Y. Wang, W. L. Chang, G. S. Prins, R. B. van Breemen, *J. Mass Spectrom.* **2001**, *36*, 882–888.
- [18] M. Angotti, R. W. Hartmann, A. J. Kirby, C. Simons, P. J. Nicholls, R. D. E. Sewell, H. J. Smith, *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.* **2005**, *20*, 219–226.
- [19] R. Gatti, M. G. Gioia, V. Cavrini, *J. Pharmaceut. Biomed.* **2000**, *23*, 147–159.
- [20] R. Ali, B. Campos, G. Dyckhoff, W. E. Haefeli, C. Herold-Mende, J. Burhenne, *Anal. Chim. Acta* **2012**, *725*, 57–66.
- [21] J. J. Hagen, K. A. Washco, C. A. Monnig, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **1996**, *677*, 225–231.
- [22] L. H. Wang, J. F. Wang, *J. Pharmaceut. Biomed.* **2001**, *25*, 785–793.
- [23] A. K. Sakhi, T. E. Gundersen, S. M. Ulven, R. Blomhoff, E. Lundanes, *J. Chromatogr. A* **1998**, *828*, 451–460.
- [24] L. H. Wang, *Anal. Chim. Acta* **2000**, *415*, 193–200.
- [25] C. M. A. Brett, A. M. O. Brett, *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications*, Oxford University Press, Oxford, **1993**.
- [26] D. D. Perrin, B. Dempsey, *Buffers for pH and Metal Ion Control*, Chapman and Hall, London, **1974**.
- [27] D. G. A. Diniz, E. M. Lima, N. R. Antoniosi-Filho, *Braz J. Pharm. Sci.* **2002**, *38*, 415–430.
- [28] T. A. Enache, A. M. Chiorcea-Paquim, O. Fatibello, A. M. Oliveira-Brett, *Electrochem. Commun.* **2009**, *11*, 1342–1345.
- [29] A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed., Wiley, New York, **2001**.
- [30] A. B. Barua, H. C. Furr, *Mol. Biotechnol.* **1998**, *10*, 167–182.
- [31] W. A. Maccrehan, E. Schonberger, *J. Chromatogr. Biomed.* **1987**, *417*, 65–78.

Received: March 31, 2016

Accepted: April 28, 2016

Published online: May 30, 2016

DOI: 10.1002/elan.201700037

Cyclic Lipopeptide Antibiotic Daptomycin Electrochemical Oxidation at a Glassy Carbon Electrode

Wesley B. S. Machini^[a] and A. M. Oliveira-Brett^{*[a]}

Abstract: Daptomycin was the first approved drug from a new class of antimicrobials, the cyclic lipopeptides, and presents a broad spectrum of activity against a wide range of gram-positive bacteria. The daptomycin redox behaviour, by cyclic, differential pulse and square wave voltammetry, in a wide pH range, at a glassy carbon electrode, was investigated. The daptomycin oxidation

was a two-step irreversible diffusion-controlled process and the diffusion coefficient $D_{\text{DPT}} = 2.32 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, was calculated. A detection limit $\text{LOD} = 0.32 \text{ } \mu\text{M}$, was obtained. For the first time daptomycin, in fetal bovine serum biological fluid, using DP voltammetry, was determined.

Keywords: Daptomycin • lipopeptide • antibiotic • electrochemical oxidation • glassy carbon electrode.

1 Introduction

Antimicrobial resistance (AMR) can be characterized as the ability of a microorganism (such as bacteria, fungi, viruses and some parasites) to change when it is exposed, or to stop an antimicrobial drug (such as antibiotics, antifungals, antivirals, antimalarials and anthelmintics) from working against it. As a result, standard treatments become ineffective; infections persist in the body and may increase the risk of other infections spreading [1].

The microorganism's new resistance mechanisms have been emerging and spreading globally, which threatens the ability to treat common infectious diseases, resulting in prolonged illness, disability, and death. In this context, the development of new drugs with the ability to bypass these resistance mechanisms represents an important advance in clinical practice.

Among these new antimicrobial drugs, more closely related to the antibiotic candidate groups, cyclic lipopeptides (CLPs) are a promising class of natural products with potent antibacterial activity. CLPs are composed of a lipid tail linked to a short oligopeptide which is cyclized to form a lactone or lactam ring, either between two amino acids in the peptide chain or between an amino acid and an amino- or hydroxyl-group bearing a fatty acid moiety [2].

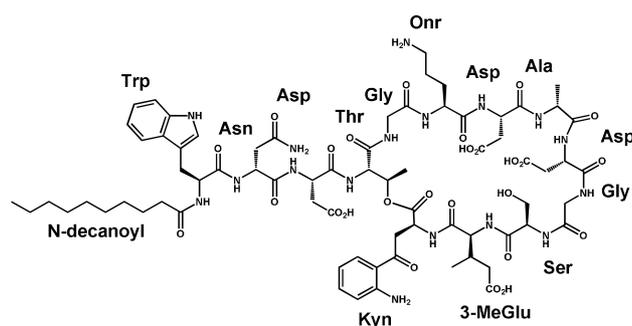
Daptomycin (DPT) (*N*-decanoyl-L-tryptophyl-L-asparaginyl-L-aspartyl-L-threonylglycyl-L-ornithyl-L-aspartyl-D-alanyl-L-aspartylglycyl-D-seryl-threo-3-methyl-L-glutamyl-3-anthraniloyl-L-alanine- ϵ 1-lactone), was the first macrocyclic lipopeptide antibiotic to be approved, after intensive clinical trials by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) in 2003, and is probably among the most important antibiotics developed in the past 50 years [3–5]. It is specifically indicated for the treatment of complicated skin and skin structure infections, right-sided endocarditis and bacteremia caused by susceptible strains of Gram-positive microorganisms [6],

such as *Staphylococcus aureus* (including methicillin-resistant strains), *Streptococcus pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* subspecies *equisimilis* and *Enterococcus faecalis* (vancomycin-susceptible strains only) [7–9].

The DPT structure, Scheme 1, is composed of a peptide moiety containing 13 D- and L- amino acids, only three of these being with D-stereochemistry. The cyclic peptide core is composed of a set of 10 non-proteinogenic amino acid residues, which include three D-amino acids (D-asparagine, D-alanine and D-serine), three less common amino acids (ornithine, (2S,3R)-3-methylglutamic acid, and kynurenine), that form an ester bond with threonine and build up the macrolactone ring, and an *n*-decanoyl fatty acid chain linked at the N-terminus to tryptophan, the only electroactive amino acid residue [4, 10]. In addition, it has four acid residues (three aspartic acid residues and one 3-methyl glutamic acid residue) and a basic residue (ornithine) [11].

Although DPT has been approved in more than 40 countries worldwide, few studies report the development of DPT analytical methods. Most DPT quantification and detection studies are directed towards biological fluid analysis, using mainly chromatographic methods with different detectors, such as high performance liquid chromatography with ultraviolet [12–16], mass [15, 17] and tandem mass spectrometry [18], liquid chromatography with ultraviolet [19], mass [20] and tandem mass spectrometry [21, 22], ultra and ultra-high performance liquid chromatography with ultraviolet [23–25], tandem mass spectrometry [26] and photodiode array [27]. Some other techniques have also been investigated [28, 29].

[a] W. B. S. Machini, A. M. Oliveira-Brett
Department of Chemistry, Faculty of Sciences and Technology,
University of Coimbra, 3004-535, Coimbra, Portugal.
E-mail: brett@ci.uc.pt



Scheme 1. Chemical Structure of daptomycin.

These analytical methods mainly employ techniques that require toxic solvents, or high volumes of solvents, for drug quantification, which are expensive, and unhealthy, for the laboratory staff, community, and environment. To minimize these problems and achieve good sensitivity and selectivity, the possibility of using electrochemical techniques was investigated.

The quantification and detection, of the DPT oxidation mechanisms, using electrochemical techniques is important, since it will result in a better understanding and increase knowledge concerning DPT physiological mechanisms of action.

The aim of this work was to investigate the electrochemical behaviour and the electron transfer mechanism of DPT, using cyclic, differential pulse and square wave voltammetry, at a glassy carbon electrode, and to determine, for the first time, DPT in fetal bovine biological fluid.

2 Experimental

2.1 Materials and Reagents

Daptomycin (Dapcin (DPT)) (D2446, purity $\geq 90\%$), tryptophan (Trp) (T3300, purity $\geq 99\%$), fetal bovine serum (F0804, Research Grade), urea (U5378, for molecular biology), sodium dodecyl sulfate (SDS) (L3771, purity $\geq 98.5\%$) and DL-dithiothreitol (DTT) (D0632, purity 98%) were obtained from Sigma-Aldrich, Spain, and used without further purification.

The 0.3 mM DPT stock solution was prepared in 0.1 M phosphate buffer solution pH 7.0, and frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, and after thawing was never used for more than one day. This procedure was in agreement with the long term storage Sigma-Aldrich Production Information suggestion for DPT storage, and ensured that the drug activity was maintained. The stock solution of 1.0 mM Trp was prepared in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0. Solutions of different concentrations were prepared by dilution in the supporting electrolyte.

The supporting electrolyte solutions, with ionic strength $I=0.1\text{ M}$, of different pH composition: pH 3.5 (HOAc + NaOAc), pH 4.2 (HOAc + NaOAc), pH 5.3 (HOAc + NaOAc), pH 6.0 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$),

pH 7.0 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$), pH 8.2 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$), pH 9.2 ($\text{NaOH} + \text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_7$), pH 10.2 ($\text{NaOH} + \text{Na}_2\text{HPO}_4$), using analytical grade reagents, and purified water from a Millipore Milli-Q system (conductivity $\leq 0.1\text{ }\mu\text{S cm}^{-1}$), were prepared [26].

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 with a Crison micropH 2001 pH-meter with an Ingold combined glass electrode.

All experiments were performed at room temperature, $T=298\text{ K}$ ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$).

2.2 Voltammetric Parameters and Electrochemical Cells

Voltammetric experiments were carried out using a μ Autolab, running with GPES 4.9 software, Metrohm/Autolab, The Netherlands. The measurements were carried out using a three-electrode system in a 2 mL one compartment electrochemical cell (eDAQ, Europe). Measurements were carried out using a glassy carbon electrode (GCE) ($d=1.5\text{ mm}$) as working electrode, a Pt wire as counter electrode, and an Ag/AgCl (3 M KCl) as reference electrode.

The experimental conditions for cyclic voltammetry (CV) were obtained using a potential increment of 2 mV at variable scan rates. For differential pulse (DP) voltammetry pulse amplitude 50 mV, pulse width 100 ms, step potential 2 mV, and scan rate 5 mV s^{-1} , were used. For square wave (SW) voltammetry, pulse amplitude 50 mV, frequency 13 Hz, and potential increment 2 mV, corresponding to an effective scan rate of 25 mV s^{-1} , were used.

Prior to use, the GCE was washed with ethanol and Milli-Q water, and the surface was polished using diamond spray (particle size $3\text{ }\mu\text{m}$) (Kemet, UK). After polishing, it was thoroughly rinsed with Milli-Q water. Following this mechanical pre-treatment, the GCE was placed in the appropriate buffer supporting electrolyte and cyclic voltammograms were recorded between the potential limits of $E_1=0.0\text{ V}$ and $E_2=+1.3\text{ V}$, until a stable signal was obtained (3–5 cycles at a potential scan rate of 50 mV s^{-1}). This procedure was performed before each electrochemical experiment and ensured very reproducible experimental results.

2.3 Acquisition and Presentation of Data

All the voltammograms presented were background-subtracted and baseline-corrected using the moving average with a step window of 5 mV included in GPES version 4.9 software. This mathematical treatment improved the visualization and identification of peaks over the baseline without introducing any artefact, although the peak height is in some cases reduced ($<10\%$) relative to that of the untreated curve. Nevertheless, this mathematical treatment of the original voltammograms was used in the presentation of all experimental 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.

2.4 Sample Preparation for DPT Determination in Biological Fluid

The DPT determination was investigated in fetal bovine serum biological fluid by addition/recovery experiments. The samples were deliberately contaminated with $2.00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ DPT. The measurements were made in 0.1 M phosphate buffer solution pH 7.0, using DP voltammetry, in the potential range from 0.4 to 0.8 V. After recording DP voltammograms in the absence of DPT, an aliquot of the spiked sample was added to the electrochemical cell to give a final concentration of $2.00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ DPT and then was directly analysed. This measurement were performed in triplicate, and the GCE was always cleaned.

3 Results and Discussion

3.1 Cyclic Voltammetry

The electrochemical behaviour of DPT, at GCE, was first studied using CV, in 0.1 M acetate buffer solution pH 4.0, and 0.1 M phosphate buffer solution pH 7.0, using a scan rate $\nu = 25 \text{ mV s}^{-1}$. The CVs showed two oxidation peaks, the first a well-defined, oxidation peak P1, at $E_{\text{pa1}} = +0.85 \text{ V}$ for pH 4.0, Figure 1, and at $E_{\text{pa1}} = +0.74 \text{ V}$ for pH 7.0, and the second a smaller oxidation peak P2, at $E_{\text{pa2}} = +0.85 \text{ V}$ for pH 4.0, and at $E_{\text{pa2}} = +$

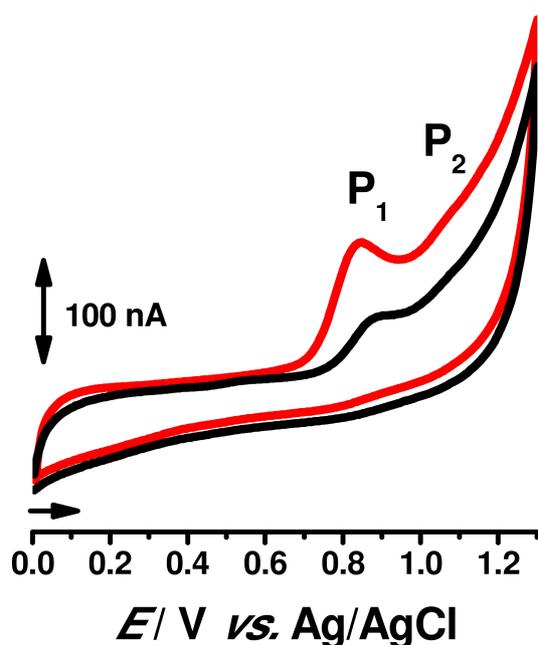


Fig. 1. CVs obtained in 25 μM DPT, at GCE, in 0.1 acetate buffer solution pH 4.0 (-red) first and (-black) second scan,

1.05 V for pH 7.0. Reversing the scan direction, no reduction peak appeared for either pH, indicating that the oxidation process is irreversible [29]. Recording successive scans in the same solution, without cleaning the electrode surface, both peak currents decreased, due to the adsorption of DPT and/or its oxidation products at the GCE surface, Figure 1.

The scan rate effect on the oxidation process of DPT oxidation peak P1 was investigated recording CVs, in 25 μM DPT, in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0, at scan rates between 5–50 mVs^{-1} , always using a clean GCE. The oxidation peak P1 current, $I_{\text{pa}} (\text{A}) = 2.69 \times 10^5 n (\alpha_c n')^{1/2} A [R]_{\infty} D_O^{1/2} \nu^{1/2}$, increased linearly with $\nu^{1/2}$, indicating that the oxidation process was diffusion-limited [29] and the value of the DPT diffusion coefficient in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0, was calculated as $D_{\text{DPT}} = 2.32 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. The GCE electroactive area, $A = 4.17 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$, was determined using 1.0 mM hexacyanoferrate(II) in phosphate buffer solution ($D_O = 7.35 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$).

3.2 Differential Pulse Voltammetry

The effect of pH on the electrochemical oxidation of DPT at GCE was investigated, over a wide pH range. The DP voltammograms, in 25 μM DPT solutions, always using a clean GCE, were recorded, Figure 2.

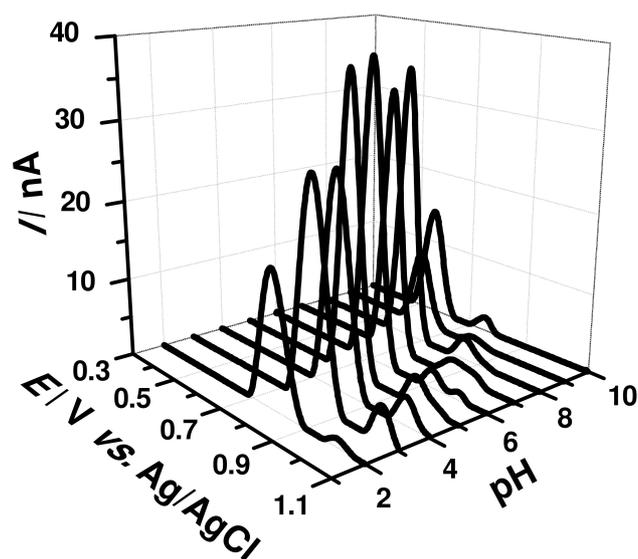


Fig. 2. 3D DP voltammograms, baseline corrected, at GCE, in 25 μM of DPT, at different supporting electrolyte pH, scan rate $\nu = 25 \text{ mV s}^{-1}$.

The DP voltammograms presented two oxidation peaks, P1 and P2, for all values of pH investigated. For $3.2 < \text{pH} < 10.2$, DPT oxidation peaks P1 and P2 are pH-dependent, and for $\text{pH} > 10.2$ both oxidation peaks become pH-independent, in agreement with a one electron and one proton transfer mechanism in the tryptophan

(Trp) amino acid residue [35], in the DPT structure, see Section 3.5.

3.3 Square Wave Voltammetry

In SW voltammetry the current is sampled in both positive and negative-going pulses, the electroactive compound oxidation and reduction peaks, at the electrode surface, are obtained in the same experiment. SW voltammetry permits investigation of the reversibility of the electron transfer reactions by plotting the forward and backward components of the total current [30].

The SW voltammograms, in 25 μM DPT, in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0, at a clean GCE surface, were obtained, Figure 3.

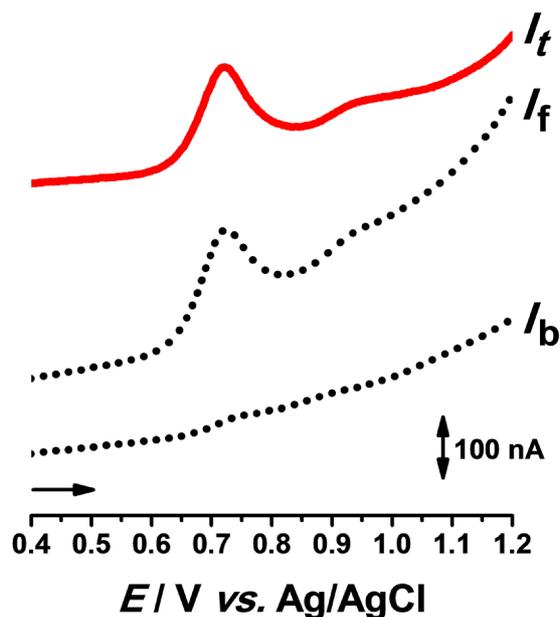


Fig. 3. SW voltammograms, in 25 μM DPT, at GCE, in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0; pulse amplitude 50 mV, $f=13$ Hz, step potential 2 mV, $v_{\text{ef}}=25$ mVs $^{-1}$. I_t – total current, I_f – forward current, I_b – backward current.

Similarly to CV and DP voltammetry, two consecutive electrode reactions were observed. Plotting the forward (I_f) and backward (I_b) components of the total (I_t) current, the irreversibility of the two redox peaks was confirmed.

3.4 Effect of Denaturing Agents on DPT Oxidation

The denaturing process of peptides causes morphological changes to the 3D structure, which unfold on the electrode surface, and the electroactive amino acid residues' oxidation becomes easier.

As denaturing agent, urea affects the secondary and tertiary structure without affecting the primary structure, the surfactant SDS dissolves hydrophobic proteins, and the reducing agent DTT disrupts disulphide bonds, which

are essential for qualitative and quantitative analysis in proteomic mechanism investigation [31]. Urea and SDS are not electroactive, unlike DTT, which is electroactive [32].

The effect of the denaturing agents on the DPT electrochemical oxidation was followed by DP voltammetry comparing the changes in the DPT electrochemical behaviour before and after the interaction with each denaturing agent. For each experiment, 25 μM DPT was separately incubated with 25 μM urea, SDS or DTT, for 3 hours, and DP voltammograms, always at a clean GCE, in 0.1 M phosphate buffer solution pH 7.0, were recorded. In the DPT solution incubated with urea, no oxidation peak was observed. The oxidation of DPT incubated with SDS or DTT, showed the DPT oxidation peak.

3.5 Tryptophan Redox Behaviour

The tryptophan (Trp) amino acid residue in the DPT structure is the only amino acid residue that can be oxidized in aqueous solution [35].

Therefore, in order to clarify the DPT oxidation mechanism, for the same experimental conditions, the Trp redox behaviour was also investigated. DP voltammograms, in 25 μM DPT and Trp, at a clean GCE, in 0.1 M phosphate buffer solution pH 7.0, were recorded, Figure 4.

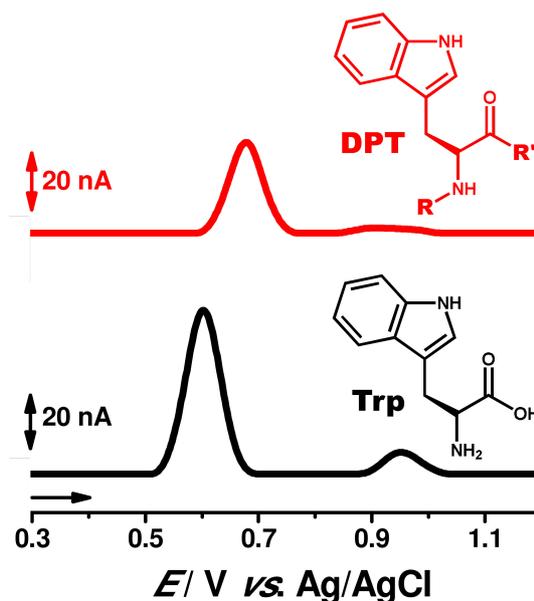


Fig. 4. DP voltammograms baseline corrected, in 25 μM : (–(red)) DPT and (–(black)) Trp, at GCE, in 0.1 M phosphate buffer pH = 7.0, $v=5$ mV s $^{-1}$.

In the DP voltammograms, two oxidation peaks for Trp, at $E_{\text{pa1}} = +0.61$ V and $E_{\text{pa2}} = +1.00$ V, and similarly for DPT, at $E_{\text{pa1}} = +0.68$ V and $E_{\text{pa2}} = +0.91$ V, were observed, Figure 4. The shift of the DPT oxidation peak to higher potentials, compared with Trp, is explained taking

into consideration the size of the molecule, the 3D configuration, as well as the DPT spatial orientation on the electrode surface, making the access of the Trp amino acid residue for oxidation more difficult.

3.6 Daptomycin Standards

The electroanalytical determination of DPT standards, by DP voltammetry, measuring the DPT oxidation peak P1 current, after standard additions of DPT, corresponding to bulk concentrations between 0.5 and 25 μM , was carried out, Figure 5. Each standard measurement was always performed using a clean GCE surface, after mechanical and electrochemical pre-treatment, a process that gave rise to small changes in the GCE surface area, which can in turn cause small variations in the peak currents measured.

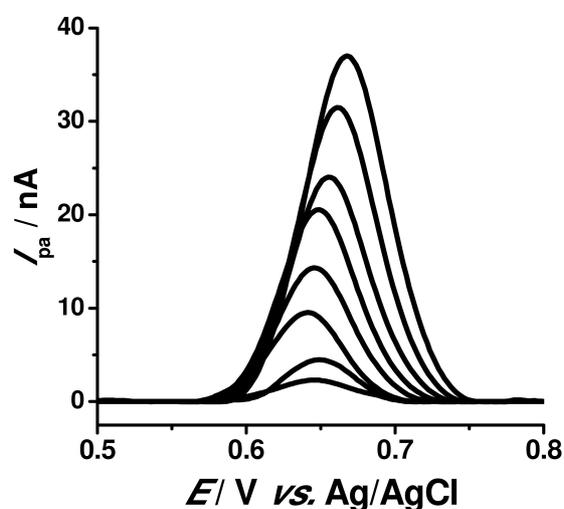


Fig. 5. DP voltammograms baseline corrected, at GCE, in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0, for 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 15.0 and 25.0 μM [DPT].

From the data of three calibration curves, the values of $R^2 = 0.993$, in the linear range (0.5–7.5 μM DPT, $n = 5$), following the equation $I_{\text{pa}} (\text{nA}) = 2.63 (\text{nA } \mu\text{M}^{-1}) [\text{DPT}] (\mu\text{M}) - 1.15 (\text{nA})$, and a relative standard deviation (R.S.D.) less than 7 nA, were calculated. The results are summarized in Table 1.

Table 1. Electroanalytical parameters from DPT standards calibration, by DP voltammetry, at GCE.

Parameters	Results
Linear Range	0.5–7.5 μM
Sensibility	2.63 nA/ μM
Intercept	1.15 nA
Limit of Detection	0.32 μM
Limit of Quantification	1.06 μM
SD	0.28 nA
R^2	0.993

The DPT detection limit (LOD) was determined using the equation $\text{LOD} = 3 \times \text{SD} \times (\text{sensitivity})^{-1}$, where SD is the standard deviation of the peak current, for DP voltammetry, and the sensitivity is the slope of the calibration plot. The quantification limit (LOQ), the lowest concentration that can be quantified with acceptable precision and accuracy, is given by $\text{LOQ} = 10 \times \text{SD} \times (\text{sensitivity})^{-1}$. A LOD = 0.32 μM and LOQ = 1.06 μM , were determined.

3.7 Daptomycin Determination in a Biological Fluid

For the quantification of DPT in fetal bovine serum biological fluid, by DP voltammetry, the addition/recovery method was used. The fetal bovine serum biological fluid was spiked with $2.00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ DPT, and was diluted directly into the electrochemical cell, to a final concentration of $2.00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ DPT. The DP voltammogram, in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0, measuring DPT peak P1 oxidation current, was recorded.

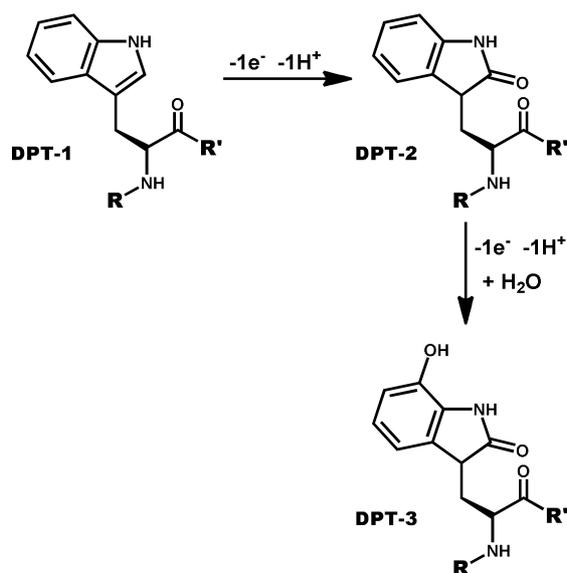
The matrix effect was evaluated, and showed no significant interferences, since a concentration of $1.99 \pm 0.09 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ DPT and an average recovery value of 99.5%, were determined.

3.8 Discussion

The electrochemical behaviour of DPT at GCE, in a wide electrolyte pH range, using CV, DP and SW voltammetry, was investigated. The DPT oxidation occurred in a two-step mechanism. For $3.2 < \text{pH} < 10.2$ both DPT anodic reactions, oxidation peaks P1 and P2, were pH-dependent.

Among the 13 amino acids present in the DPT composition, only Trp amino acid is electroactive, in aqueous solution. The Trp oxidation occurred in two oxidation steps, similarly to DPT, but for less positive potentials. The higher oxidation peak potentials, of Trp amino acid residue in the DPT, are explained by the macrocyclic lipopeptide 3D structure, Scheme 1, making the access of the Trp amino acid residue to the GCE surface more difficult, thence the higher DPT oxidation peak potentials.

The Trp amino acid is an indole derivative substituted at the C3 position, and the DPT electrochemical oxidation, in aqueous solution, occurs at the Trp amino acid residue. Considering the fact that the pyrrole ring of indoles is more reactive than the benzene ring, the first oxidation reaction, oxidation peak P1, corresponds to oxidation at the C2 position on the pyrrole ring [33–35], since all the indole derivatives, such as DPT-1 are substituted at the C3 position. The second oxidation reaction, oxidation peak P2, of the indole derivatives with a substituent at the C3 position, corresponds to one electron being removed from DPT-2, followed by deprotonation, and the direct nucleophilic attack by water, with the hydroxylation of C7 of benzene moiety, DPT-3. The proposed DPT oxidation mechanism is presented in Scheme 2.



Scheme 2. Proposed DPT oxidation mechanism.

The electroanalytical determination of standards carried out by DP voltammetry, measuring the first DPT oxidation peak P1 current, gave a LOD = 0.32 μM and a LOQ = 1.06 μM . This electrochemical technique shows lower detection and quantification limits than other methods [17, 24, 25].

The electroanalytical quantification of DPT, for the first time, in fetal bovine serum biological fluid, by the addition/recovery method, with high efficiency and sensitivity, was performed. The final concentration of $1.99 \pm 0.09 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ DPT, by DP voltammetry, was found in fetal bovine serum biological fluid, in agreement with the DPT concentration added, showing that DPT electroanalysis has great potential, with high efficiency and sensitivity, to be applied in the quantification of DPT in real biological samples.

4 Conclusions

The electrochemical oxidation of daptomycin, the first approved drug from a new class of macrocyclic lipopeptide antibiotics, at GCE, by CV, DP and SW voltammetry, in a wide pH range, was studied. The DPT oxidation is a diffusion-controlled process, occurring in two irreversible pH-dependent steps, and a mechanism was proposed.

The electroanalytical quantification of DPT, in fetal bovine serum biological fluids, by the addition-recovery method, was performed. The novel DP voltammetric method, at GCE, is simple, fast, inexpensive, highly sensitive, and an excellent option for DPT cyclic lipopeptide antibiotic quantification in biological fluids.

Acknowledgements

Financial support from Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), project UID/EMS/00285/2013 (co-financed by the European Community Fund FEDER), FEDER funds through the program COMPETE -Programa Operacional Factores de Competitividade, and Innovec'EAU (SOE1/P1/F0173), and PhD Grant 232296/2014-6 (W.B.S. Machini) from CNPq/Brazil, are gratefully acknowledged.

References

- [1] P. R. Shankar, *Arch. Pharm. Pract.* **2016**, *7*, 110–111.
- [2] T. Schneider, A. Muller, H. Miess, H. Gross, *Int. J. Med. Microbiol.* **2014**, *304*, 37–43.
- [3] G. H. Yu, X. Q. Jia, J. P. Wen, W. Y. Lu, G. Y. Wang, Q. Caiyin, Y. L. Chen, *Appl. Biochem. Biotech.* **2011**, *163*, 729–743.
- [4] R. H. Baltz, V. Miao, S. K. Wrigley, *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 717–741.
- [5] P. H. Nakhate, V. K. Yadav, A. N. Pathak, *J. Sci. Inno. Res.* **2013**, *2*, 970–980.
- [6] F. P. Tally, M. F. DeBruin, *J. Antimicrob. Chemoth.* **2000**, *46*, 523–526.
- [7] A. Johnson, *Future microbiol.* **2006**, *1*, 255–265.
- [8] R. Sauermann, M. Rothenburger, W. Graninger, C. Joukhardar, *Pharmacology* **2008**, *81*, 79–91.
- [9] J. A. Silverman, N. G. Perlmutter, H. M. Shapiro, *Antimicrob. Agents Ch.* **2003**, *47*, 2538–2544.
- [10] D. Jung, A. Rozek, M. Okon, R. E. W. Hancock, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 949–957.
- [11] E. G. Totoli, S. Garg, H. R. N. Salgado, *Ther. Drug Monit.* **2015**, *37*, 699–710.
- [12] J. Martens-Lobenhoffer, J. T. Kielstein, C. Oye, S. M. Bode-Boger, *J. Chromatogr. B* **2008**, *875*, 546–550.
- [13] C. M. Tobin, J. M. Darville, A. M. Lovering, A. P. Macgowan, *J. Antimicrob. Chemoth.* **2008**, *62*, 1462–1463.
- [14] M. Polillo, C. Tascini, M. Lastella, P. Malacarne, L. Ciofi, B. Viaggi, G. Bocci, F. Menichetti, R. Danesi, M. Del Tacca, A. Di Paolo, *Ther. Drug Monit.* **2010**, *32*, 200–205.
- [15] M. Szultka, J. Szeliga, M. Jackowski, B. Buszewski, *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*, 785–796.
- [16] P. Olszowy, M. Szultka, P. Fuchs, R. Kegler, R. Mundkowsky, W. Miekisch, J. Schubert, B. Buszewski, *J. Pharmaceut. Biomed.* **2010**, *53*, 1022–1027.
- [17] L. Baietto, A. D'Avolio, F. G. De Rosa, S. Garazzino, M. Michelazzo, G. Ventimiglia, M. Siccardi, M. Simiele, M. Sciandra, G. Di Perri, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *396*, 791–798.
- [18] M. Gregoire, A. G. Leroy, R. Bouquie, D. Malandain, E. Dailly, D. Boutoille, C. Renaud, P. Jolliet, J. Caillon, G. Deslandes, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *118*, 17–26.
- [19] A. P. Christ, M. S. Machado, P. Rosa, C. F. Codevilla, C. M. B. Rolim, A. I. H. Adams, *Anal. Methods* **2014**, *6*, 1242–1247.
- [20] H. G. Gika, F. Michopoulos, D. Divanis, S. Metalidis, P. Nikolaidis, G. A. Theodoridis, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 2191–2197.
- [21] M. C. Verdier, D. Bentue-Ferrer, O. Tribut, N. Collet, M. Revest, E. Bellissant, *Clin. Chem. Lab. Med.* **2011**, *49*, 69–75.
- [22] M. Szultka, R. Krzeminski, M. Jackowski, B. Buszewski, *J. Chromatogr. B* **2013**, *940*, 66–76.

- [23] E. Gikas, F. N. Bazoti, P. Fanourgiakis, E. Perivolioti, A. Roussidis, A. Skoutelis, A. Tsbopoulos, *Biomed. Chromatogr.* **2010**, *24*, 522–527.
- [24] E. Gikas, F. N. Bazoti, P. Fanourgiakis, E. Perivolioti, A. Roussidis, A. Skoutelis, A. Tsbopoulos, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *51*, 901–906.
- [25] T. Naito, T. Yamada, T. Yagi, J. Kawakami, *Biomed. Chromatogr.* **2014**, *28*, 317–319.
- [26] F. N. Bazoti, E. Gikas, A. Skoutelis, A. Tsbopoulos, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *56*, 78–85.
- [27] L. Baietto, A. D'Avolio, S. Pace, M. Simiele, C. Marra, A. Ariaudo, G. Di Perri, F. G. De Rosa, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *88*, 66–70.
- [28] E. G. Totoli, H. R. Salgado, *Pharmaceutics* **2015**, *7*, 106–121.
- [29] E. G. Totoli, H. R. N. Salgado, *Braz. J. Pharm. Sci.* **2015**, *51*, 811–821.
- [30] C. M. A. Brett, A. M. Oliveira-Brett, *Electrochemistry: principles, methods, and applications*, Oxford University Press, Oxford, **1993**.
- [31] S. C. B. Oliveira, I. B. Santarino, A. M. Oliveira-Brett, *Electroanal.* **2013**, *25*, 1029–1034.
- [32] I. B. Santarino, S. C. B. Oliveira, A. M. Oliveira-Brett, *Electrochem. Commun.* **2012**, *23*, 114–117.
- [33] B. Malfroy, J. A. Reynaud, *J. Electroanal. Chem.* **1980**, *114*, 213–223.
- [34] V. Brabec, V. Mornstein, *Biophys. Chem.* **1980**, *12*, 159–165.
- [35] T. A. Enache, A. M. Oliveira-Brett, *Electroanal.* **2011**, *23*, 1337–1344.

Received: January 18, 2017

Accepted: February 17, 2017

Published online on February 27, 2017

DOI: 10.1002/elan.201700581

Antileishmanial Drug Miltefosine-dsDNA Interaction *in situ* Evaluation with a DNA-Electrochemical Biosensor

W. B. S. Machini^[a] and A. M. Oliveira-Brett^{*[a]}

Abstract: Leishmaniasis is one of the most important parasitic neglected disease. The electrochemical evaluation of the antileishmanial drug miltefosine-dsDNA interaction was investigated in incubated solutions and using dsDNA-electrochemical biosensors, following the changes in the oxidation peaks of guanosine and adenosine residues, and the occurrence of the free guanine residues, electrochemical signal. The electrochemical behaviour of miltefosine was also investigated, at a glassy carbon electrode, using cyclic, differential pulse and square wave voltammetry and no electrochemical redox processes

Keywords: Antileishmanial drug • miltefosine • neglected tropical diseases • glassy carbon electrode • DNA interaction • DNA-electrochemical biosensor

were observed. The interaction mechanism of miltefosine-dsDNA occurs in two ways: independent of the dsDNA sequence, and leading to the condensation/aggregation of DNA strands, producing a rigid miltefosine-dsDNA complex structure, and a preferential interaction between the guanine hydrogen atoms in the C–G base pair and miltefosine, causing the release of guanine residues detected on the electrode surface. Miltefosine did not induce oxidative damage to DNA in the experimental conditions used.

1 Introduction

The progress with science and technology has brought improvements in quality of life and health, in addition to economic and social developments, but various diseases, namely the neglected tropical diseases, continue to affect the poor and marginalized people around the world [1].

According to the World Health Organization (WHO) [2], a disease that affects mainly the poor can be characterized as a disease of poverty, which is divided into two classes. The first class includes HIV/AIDS, malaria and tuberculosis, diseases which have received considerable attention from the community and investment in research and development in order to eradicate them. The other class consists in the neglected diseases, such as onchocerciasis (river blindness), Chagas disease, leprosy, tuberculosis, schistosomiasis (bilharzias), lymphatic filariasis, African trypanosomiasis (sleeping sickness), dengue and leishmaniasis.

The neglected diseases affect mostly the poor, with little visibility and low political voice, in developing countries, which thrive in poor housing and without high sanitation conditions, are most common in tropical climates, and therefore are often referred to as neglected tropical diseases. These diseases are practically neglected also by the research community, but can be prevented, controlled, and probably eliminated using adequate clinical solutions [3].

Leishmaniasis is one of the most important parasitic neglected diseases and refers to various clinical syndromes caused by protozoon kinetoplastid parasites found in *Leishmania* species [4], that are transmitted to mammalian by the bites of female sandflies from the *Phlebotomus*

and *Lutzomyia* genera via anthroponotic or zoonotic cycles, and infect them [5].

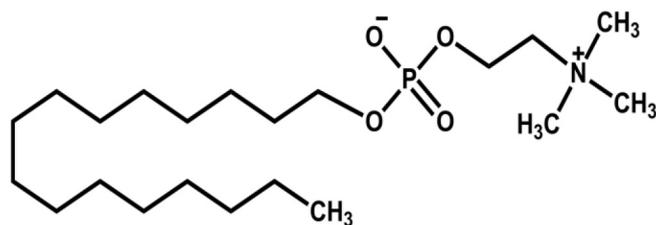
In humans, the leishmanial infections may manifest in four most common forms, depending on the causative species, such as, cutaneous leishmaniasis (CL), mucocutaneous leishmaniasis (MCL), diffused cutaneous leishmaniasis (DCL), or visceral leishmaniasis (VL) [6].

It is estimated that about 350 million people worldwide are at risk of this parasitic disease [7].

Moreover, according to the WHO data [8], every year around 700,000 to one million new cases are recorded in the world, resulting in 20,000 to 30,000 deaths annually. In this sense, the recognition and treatment of leishmaniasis is currently of great public health concern in developing countries. However, the treatment of leishmaniasis remains a challenge due to problems, such as high cost of drugs, high drug-dosage, incidence and prevalence of drug resistance, side-effects, and lack of affordable new antileishmanial drugs [9].

One of the drugs used in the treatment of leishmaniasis is miltefosine (hexadecylphosphocholine, HePC), Scheme 1, an alkyllysophospholipid analogue. It was originally developed for the treatment of breast cancer and other solid tumours [10], without success due to the dose-limiting gastro-intestinal toxicity when used as an oral agent [11]. However, miltefosine presented an excellent antileishmanial activity, both *in vitro* and in experimental animals, making human trials possible, and

[a] W. B. S. Machini, A. M. Oliveira-Brett
Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology,
University of Coimbra, 3004-535, Coimbra, Portugal
E-mail: brett@ci.uc.pt



Scheme 1. Chemical structure of miltefosine.

more specially a clinical assessment of its oral use in human visceral leishmaniasis [12].

The use of miltefosine as antileishmanial drug has been considered very important, because it is the first non-parenteral drug, can be administered orally, and locally in the treatment of leishmaniasis [9].

Nevertheless, the fact that miltefosine was the first drug licensed for the oral treatment of leishmaniasis, and its oral bioavailability, exposed the drug to misuse and dangerous effects, such as toxicity, premature discontinuation of therapy, failure, and development of resistance [12].

Miltefosine antineoplastic mechanisms of action are related to the antileishmanial targets, and include the inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis and the induction of apoptosis, by inducing intracellular stress (reactive oxygen species (ROS)), by blocking essential survival signals or by inducing various pro-apoptotic cell signalling pathways [13].

Considering the fact that miltefosine is a relatively new drug, with severe adverse effects, and the antileishmanial mechanism of action still under discussion, it is very important to investigate the interaction of miltefosine with DNA, and the antineoplastic mechanisms of action involving apoptosis, and consequently ROS, which may interact with dsDNA causing oxidative damage [14,15].

The research of the interaction between toxic drugs and DNA has enabled to elucidate the implications in DNA structural modifications, and the mechanistic and cytotoxic aspects of the drugs physiological action. Different methods, such as AFM [16–18], capillary [19] and gel electrophoresis [20], fluorescence [21–23], FTIR [21,24,25], tandem mass [26,27], NMR [28], Raman [22], UV-Visible [21–24] spectroscopies, surface plasmon resonance [29], viscosimetry [21] and electrochemistry [30] have been applied.

Electrochemical methods, such as pulse techniques, are suitable to investigate electron transfer reactions in biological systems, since they present fast response, high sensitivity, great selectivity and the use of small amounts of samples. Furthermore, the use of pulse techniques has the advantage that they lead to a great improvement in the signal-to-noise ratio compared to steady-state techniques and in many cases greater selectivity [31].

The DNA-electrochemical biosensor detects specific binding processes of drugs with DNA [32], changes in the DNA oxidation peaks before and after the interaction [33], monitors the appearance of purine and pyrimidine bases, and the biomarkers of DNA purine bases oxidative

damage: guanine (Gua) oxidation product, 8-oxoguanine (8-oxoGua) [34], and adenine (Ade) oxidation product, 2,8-dihydroxyadenine (2,8-oxoAde) [35].

The dsDNA-electrochemical biosensors have been successfully utilized to investigate the interaction of drugs with dsDNA [36–41] and compared with other methods showed great sensitivity towards detecting small perturbations of the double-helical structure and the detection of DNA oxidative damage, allowing the unravelling of detailed mechanistic interactions.

The antileishmanial mechanism of action of miltefosine is not clear and more than one site of action is suggested.

In this paper the antileishmanial drug miltefosine-dsDNA interaction, for different time periods: (a) in incubated solutions, by DP voltammetry and UV-Vis spectrophotometry, and (b) *in situ* using the dsDNA-, poly[G]- or poly[A]-electrochemical biosensors, was investigated.

2 Experimental

2.1 Materials and Reagents

Miltefosine (hexadecylphosphocholine, HePC) (M5571, purity $\geq 98\%$), double stranded deoxyribonucleic acid sodium salt from calf thymus (dsDNA) (D1501), polyguanylic acid potassium salt (poly[G]) (P4404) and polyadenylic acid potassium salt (poly[A]) (P9403) and were obtained from Sigma-Aldrich, Spain, and used without further purification.

A stock solution of 1.0 mM miltefosine was prepared in deionised water and kept at 4°C. This procedure was in agreement with the long term storage Sigma-Aldrich Production Information for miltefosine storage and ensured that the drug activity was maintained. Solutions of different concentrations of miltefosine were prepared by dilution of the appropriate quantity in 0.1 M acetate buffer pH 4.5 supporting electrolyte. These solutions were never used for more than one day. Stock solutions of 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of dsDNA, poly[G], and poly[A], were prepared in deionised water and diluted to the desired concentrations prior to use.

The supporting electrolyte used in all experiments was 0.1 M acetate buffer pH 4.5, and was prepared using analytical grade reagents and purified water from a Millipore Milli-Q system (conductivity $\leq 0.1 \mu\text{S cm}^{-1}$) [42]. The pH measurements were carried out with a Crison micropH 2001 pH-meter with an Ingold combined glass electrode. Microvolumes were measured using a Pipetman® single channel electronic pipette (Gilson Co, Inc., France). All experiments were performed at room temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$).

2.2 Voltammetric Parameters and Electrochemical Cells

Voltammetric experiments were carried out using a $\mu\text{Autolab}$ type III, running with GPES 4.9 software, Metrohm/Autolab, The Netherlands. The measurements were carried out using a three-electrode system in a 2 mL

one compartment electrochemical cell (eDAQ, Europe). Measurements were carried out using a glassy carbon electrode (GCE) ($d=1.0$ mm) as working electrode, a Pt wire as counter electrode, and an Ag/AgCl (3 M KCl) as reference electrode.

The experimental conditions for cyclic voltammetry (CV) were obtained using a potential increment of 2 mV at 25 mVs^{-1} scan rate. For differential pulse (DP) voltammetry pulse amplitude 50 mV, pulse width 100 ms, step potential 2 mV, and scan rate 5 mVs^{-1} , were used. For square wave (SW) voltammetry, pulse amplitude 50 mV, frequency 13 Hz, and potential increment 2 mV corresponding to an effective scan rate of 25 mVs^{-1} , were used.

Prior to each measurement and preparation of each electrochemical biosensor, the GCE was washed with ethanol and Milli-Q water, and the surface was polished using diamond spray (particle size 3 μm) (Kemet, UK). After polishing, it was thoroughly rinsed with Milli-Q water. Following this mechanical pre-treatment, the GCE was placed in the appropriate buffer supporting electrolyte and DP voltammograms were recorded between the potential limits of $E_1=0.0$ V and $E_2=+1.4$ V, until a stable signal was obtained. This procedure was performed before each electrochemical experiment and ensured very reproducible experimental results.

2.3 Incubation Procedures

2.3.1 Procedure 1 – Miltefosine-dsDNA Interaction in Incubated Solutions

Solutions of different miltefosine concentrations, 0.1 μM and 100 μM , and $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, were incubated in 0.1 M acetate buffer solution pH 4.5, during different time periods. Control solutions of miltefosine, and $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, were prepared in 0.1 M acetate buffer solution pH 4.5, and stored in similar conditions and during the same time periods. DP voltammograms were recorded in solution after different incubation times always using a clean GCE surface.

2.3.2 Procedure 2 – Miltefosine-dsDNA-Electrochemical Biosensor Interaction

The dsDNA-electrochemical biosensors were prepared by covering successively the GCE surface with three drops each of 5 μL from a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA solution diluted in 0.1 M acetate buffer pH 4.5. After placing each drop on the electrode surface the biosensor was dried under a constant flux of $\text{N}_{2(\text{g})}$. A similar procedure was used in order to obtain the poly[G]- and poly[A]-electrochemical biosensors.

This procedure ensures full coverage of the electrode surface by a multilayer dsDNA film [32], avoiding the formation of undesired thin and incomplete network film of co-adsorbed dsDNA-miltefosine, dsDNA, or miltefosine nonspecific binding to the electrode surface.

The dsDNA-, poly[G]- or poly[A]-electrochemical biosensors were immersed in solutions of 0.1 μM miltefosine, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5, and allowed to

incubate during different periods of time as indicated in the text.

Afterwards, the dsDNA-, poly[G]- or poly[A]-electrochemical biosensors were removed from the solution, washed with deionised water in order to remove the unbound miltefosine molecules and placed in the electrochemical cell, containing only the 0.1 M acetate buffer pH 4.5 supporting electrolyte, where the transduction was performed by DP voltammetry. For control experiments, the dsDNA-electrochemical biosensor was incubated in 0.1 M acetate buffer pH 4.5 supporting electrolyte during the same time periods and in similar conditions as the solutions with miltefosine.

2.4 UV-Vis Spectrophotometry

UV-Vis measurements were performed using a Spectrophotometer Hitachi U-2810 running with UV Solution Program (Digilab Hitachi, Tokyo, Japan). The experimental conditions for absorption spectra were: slit width 1.5 nm, sampling interval 0.5 nm and a scan speed of 100 nm min^{-1} . All UV-vis spectra were measured from 230 nm to 400 nm, in a quartz glass cuvette with an optic path of 10.0 mm. UV-vis spectra for an incubated solution of 500 μM miltefosine and $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, 0.1 M acetate buffer pH 4.5, was recorded. UV-vis spectra of control solutions, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, and 500 μM miltefosine, for the same time conditions, were also recorded.

2.5 Acquisition and Presentation of Data

All the voltammograms presented were background-subtracted and baseline-corrected using the moving average with a step window of 5 mV included in GPES version 4.9 software. This mathematical treatment improved the visualization and identification of peaks over the baseline without introducing any artefact, although the peak height is in some cases reduced ($< 10\%$) relative to that of the untreated curve. Nevertheless, this mathematical treatment of the original voltammograms was used in the presentation of all experimental 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.

All the UV-Vis spectra presented were shown without any further mathematical treatment and all values of λ_{max} and absorbance were obtained from the original spectra.

3 Results and Discussion

3.1 Voltammetric Behaviour of Miltefosine

The electrochemical behaviour of the antileishmanial drug miltefosine was also investigated, at a glassy carbon electrode, using cyclic, differential pulse and square wave voltammetry, in solutions of 100 μM miltefosine, in acetate

buffer pH 4.5. As expected no electrochemical redox processes were observed. This in agreement with the chemical structure of miltefosine, without electroactive centres which can be oxidized in aqueous solutions.

3.2 Voltammetric Behaviour of dsDNA, Poly[G] and Poly[A]

The oxidation behaviour of dsDNA, poly[G] and poly[A], in 0.1 M acetate buffer pH 4.5, was revisited using DP voltammetry, Figure 1, as a control, in order to enable the identification of the oxidation peaks that occurred after the *in situ* miltefosine-dsDNA, miltefosine-poly[G] and miltefosine-poly[A] interactions.

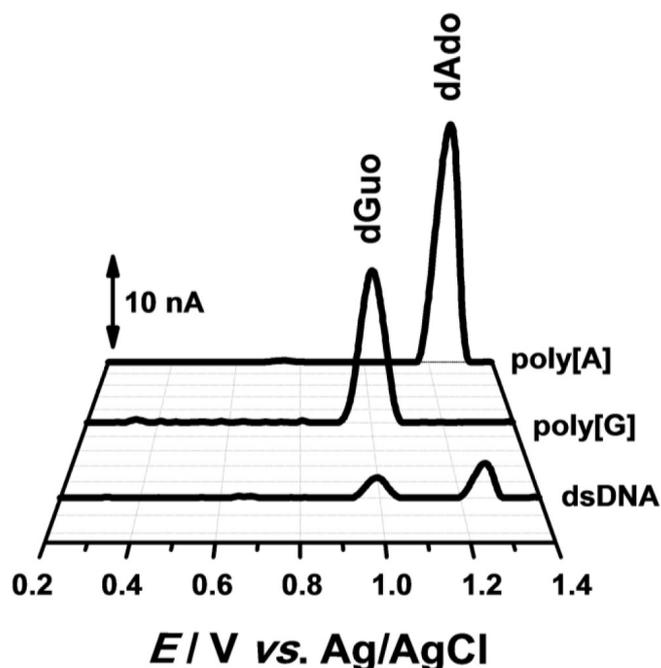


Fig. 1. Control DP voltammograms baseline-corrected, at GCE, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5 supporting electrolyte, for $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ poly[G] and $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ poly[A], $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

The DP voltammograms for $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5, showed two small peaks corresponding to the oxidation of desoxyguanosine (dGuo), at $E_{\text{pa}} = +0.98 \text{ V}$, and desoxyadenosine (dAdo), at $E_{\text{pa}} = +1.25 \text{ V}$, Figure 1. The small current from the dGuo and dAdo peaks is due to greater difficulty of the purine bases electron transfer within the DNA the double strand to the CGE surface [32].

The DP voltammograms of poly[G] and poly[A] obtained in the same conditions showed, as expected, only one oxidation peak each, Figure 1. The poly[G] homopolynucleotide contains only guanine (Gua) residues and the oxidation occurred at the dGuo residue, at $E_{\text{pa}} = +0.98 \text{ V}$, while poly[A] homopolynucleotide contains only adenine

(Ade) residues and the oxidation occurred at the dAdo residues, at $E_{\text{pa}} = +1.25 \text{ V}$.

3.3 Miltefosine-dsDNA Interaction in Incubated Solutions

3.3.1 Electrochemistry

The miltefosine-dsDNA interaction, in incubated solutions using DP voltammetry, to evaluate the possibility of miltefosine to cause conformational changes in the DNA double helix, hydrogen bonding cleavage, and/or dsDNA base oxidative damage, was investigated.

The effect of the miltefosine-dsDNA interaction was electrochemically followed comparing the changes on the dsDNA oxidation peaks, dGuo and dAdo, in the absence and presence of miltefosine, and monitoring the occurrence of free Gua oxidation and free Ade oxidation peaks, and the purine biomarkers: 8-oxoGua, Gua oxidation product, and 2,8-oxoAde, Ade oxidation product.

Solutions of different miltefosine concentrations, $0.1 \mu\text{M}$ and $100 \mu\text{M}$, and $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, were incubated in 0.1 M acetate buffer solution pH 4.5, during different time periods.

After each measurement, the GCE surface was cleaned following the cleaning and conditioning procedure described in Section 2.2, in order to remove all oxidation products adsorbed at the electrode surface.

The miltefosine-dsDNA interaction, in concentrated solutions, containing $100 \mu\text{M}$ miltefosine incubated with $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5, using a GCE, Figure 2, was investigated.

The DP voltammogram obtained immediately after the addition of miltefosine to the dsDNA solution showed immediately a large decrease in both anodic peak currents, corresponding to the oxidation of dGuo and dAdo, when compared with the control dsDNA solution.

This is due to a strong condensation and/or aggregation of DNA double helix, due to a strong interaction between miltefosine and dsDNA.

In order to better understand the effect of miltefosine-dsDNA interaction over time, different incubation time periods, in diluted solutions, containing $0.1 \mu\text{M}$ miltefosine incubated with $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5, using a GCE, by DP voltammetry, Figure 3, were investigated.

The DP voltammogram obtained immediately after the addition of $0.1 \mu\text{M}$ miltefosine to the solution containing $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, Figure 3, showed the two dsDNA oxidation peaks, dGuo, at $E_{\text{pa}} = +0.98 \text{ V}$ and dAdo, at $E_{\text{pa}} = +1.25 \text{ V}$, with a small decrease in the peak currents, when compared with the control dsDNA solution.

After 15 minutes incubation time the dsDNA oxidation peak currents continued to decrease, Figure 3, which clearly demonstrated that a conformational change in the dsDNA structure occurred after the miltefosine-dsDNA interaction [18,43,44].

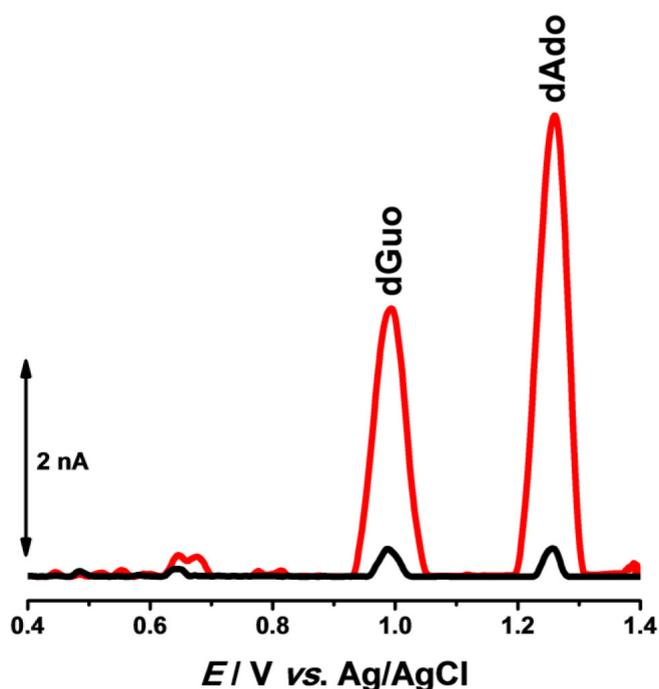


Fig. 2. DP voltammograms baseline-corrected, at GCE, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5, for (—, red) control $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA and (—) immediately after the addition of $100 \mu\text{M}$ miltefosine to $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

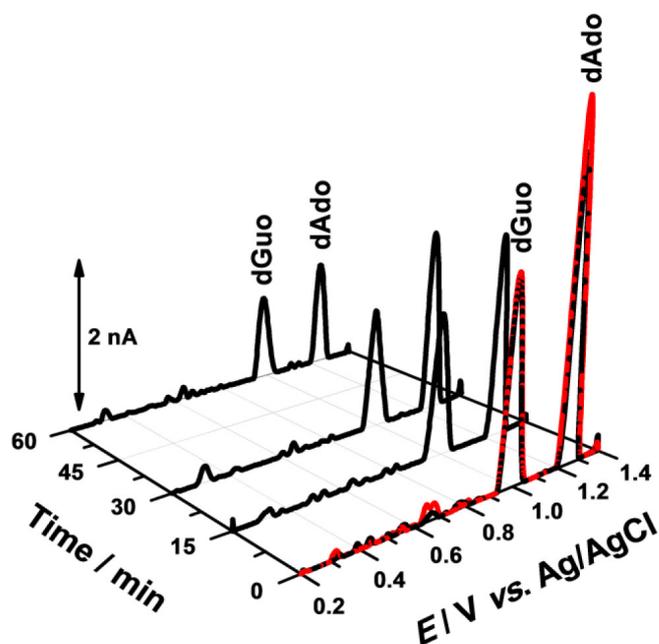


Fig. 3. DP voltammograms baseline-corrected, at GCE, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5: (—, red) control $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, and (—) after incubation of $0.1 \mu\text{M}$ miltefosine with $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, during different time periods: 0, 15, 30 and 60 minutes, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

The DNA purine bases were embedded within the condensed more compact dsDNA structure and less exposed to the GCE surface, the purine bases oxidation

was more difficult, and the dGuo and dAdo oxidation peak currents decreased [18,43–45].

Increasing the incubation time, to 30 and 60 minutes, both dGuo and dAdo oxidation peak currents continue to decrease, which is in agreement with a strong condensation/aggregation of the dsDNA caused by the miltefosine-dsDNA interaction.

The DP voltammogram obtained after 60 minutes dsDNA solution incubation, in the diluted $0.1 \mu\text{M}$ miltefosine solution, Figure 3, showed a big decrease of the dsDNA oxidation peak currents, similar to the incubation in the concentrated $100 \mu\text{M}$ miltefosine solution, Figure 2, which confirms a strong condensation/aggregation of dsDNA caused by the interaction between miltefosine and DNA.

In all DP voltammograms obtained in miltefosine-dsDNA incubated solutions, Figures 2 and 3, no oxidation peak related to the presence of 8-oxoGua or 2,8-oxoAde, at $E_{\text{pa}} = +0.45 \text{ V}$, the DNA oxidative damage biomarkers [34,35], was detected.

3.3.2 UV-Vis Spectrophotometry

The UV-Vis evaluation of miltefosine-dsDNA interaction was also investigated. The differences in the absorption spectra of dsDNA were monitored in the absence and presence of miltefosine in order to determine the influence of miltefosine interaction on the dsDNA conformation and morphology.

Absorption spectra in the UV-Vis region for control solutions of $500 \mu\text{M}$ miltefosine, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, and immediately after the addition of $500 \mu\text{M}$ miltefosine to the $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA solution, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5, Figure 4, were recorded.

The control spectra obtained in the range from 400 to 230 nm, Figure 4, for $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, in 0.1 M acetate

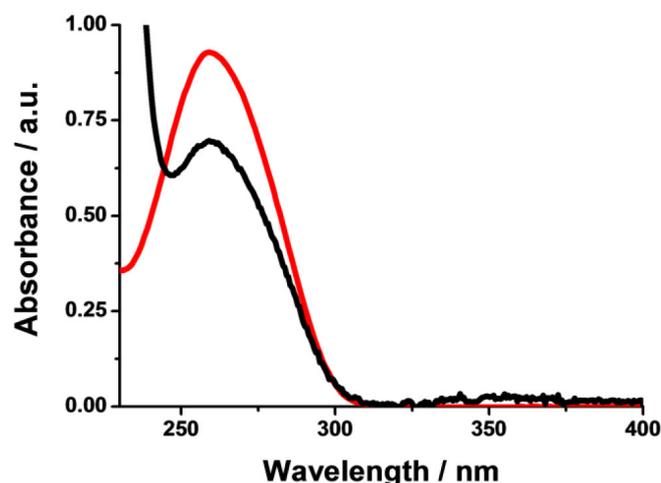


Fig. 4. UV-Vis absorption spectra, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5, for (—, red) control $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA and (—) immediately after the addition of $500 \mu\text{M}$ miltefosine to the $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA solution.

buffer pH 4.5, showed one absorption band, at $\lambda_{\max} = 260$ nm, attributed to the $\pi \rightarrow \pi^*$ transitions from the heterocyclic rings of the nucleotides. The control spectra for 500 μM miltefosine did not show any absorption bands.

The spectra obtained immediately after the addition of 500 μM miltefosine to the 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA solution showed the absorption band, at $\lambda_{\max} = 260$ nm, with a great decrease in the intensity of absorption, which corroborates the fact that miltefosine promotes a strong condensation and/or aggregation of dsDNA.

3.4 *In situ* Interaction of Miltefosine with the dsDNA-Electrochemical Biosensors

During the electrochemical experiments of the miltefosine-dsDNA interaction in incubated solutions, an incomplete network film of co-adsorbed free molecules of dsDNA and miltefosine, and the miltefosine-dsDNA complexes, were deposited on the GCE surface [46].

Thus, a complete coverage of the electrode surface is important to avoid undesired nonspecific adsorption of these molecules and complexes to the electrode surface. The dsDNA electrochemical biosensor was prepared after the immobilization of DNA multilayers to the GCE surface [32], the procedure is described in Section 2.3.

The use of the dsDNA-electrochemical biosensor enabled observing, *in situ* and in real time, the changes that occurred to the dsDNA immobilized on the electrode surface during the miltefosine-dsDNA interaction, detected by the changes in the purine bases oxidation peak currents of the dsDNA-electrochemical biosensor, the appearance of free purine base oxidation peaks, and oxidation products peaks, recorded after different incubation times, and compared with the results, obtained in the same experimental conditions, using a control dsDNA-electrochemical biosensor.

The DP voltammogram for the control dsDNA-electrochemical biosensor showed, as expected, only both dGuo, at $E_{\text{pa}} = +0.99$ V, and dAdo, at $E_{\text{pa}} = +1.26$ V, oxidation peaks, Figure 5 (—, red).

A new dsDNA-electrochemical biosensor was always prepared for each experiment and incubated during different time periods, 15, 30 and 60 minutes, in diluted solutions, containing 0.1 μM miltefosine, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5.

After each interaction time the multilayer dsDNA-electrochemical biosensor was washed with deionised water, in order to remove the unbound miltefosine, dried under $\text{N}_{2(\text{g})}$ atmosphere, and transferred to the supporting electrolyte solution, 0.1 M acetate buffer pH 4.5, where the DP voltammograms were obtained, Figure 5.

The DP voltammogram after 15 min incubation, in diluted 0.1 μM miltefosine solution, Figure 5, showed a decrease of the dGuo and dAdo purine bases residues oxidation peak currents in the polynucleotide chain, due to the miltefosine-dsDNA interaction, and the appearance of one new oxidation peak, at $E_{\text{pa}} = +0.76$ V, when

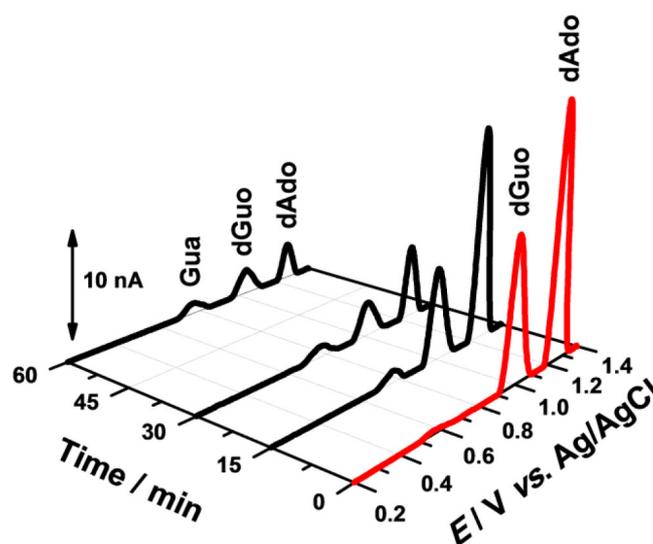


Fig. 5. DP voltammograms baseline-corrected, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5, of dsDNA-electrochemical biosensor (—, red) control and (—) after incubation with 0.1 μM miltefosine during different time periods: 15, 30 and 60 minutes, $\nu = 5$ mV s^{-1} .

compared with the results obtained with the control dsDNA-electrochemical biosensor.

Considering that the electrode surface is completely covered by dsDNA molecules and miltefosine has no electroactive centers which can be oxidized, this new peak is due to the release of free Gua from the DNA helix, creating an abasic site in the dsDNA structure. The occurrence of the free Gua peak is explained considering that miltefosine induced cleavage of the bond between Gua and the sugar moiety, in the dsDNA guanosine residues, leading to the release of free Gua, which is oxidized at a lower potential, at $E_{\text{pa}} = +0.76$ V [46–48].

The dsDNA-electrochemical biosensors, for long incubation times, 30 min and 60 min, in diluted 0.1 μM miltefosine solutions, were also investigated, Figure 5. The free Gua oxidation peak current increased with increasing incubation time. The progressive decrease with time, of the dGuo and dAdo oxidation peak currents observed, is in agreement with the results obtained with the miltefosine-dsDNA interaction in incubated solutions, Figure 3.

The specific interaction between the dGuo residues and miltefosine was evidenced based on the occurrence of the free Gua oxidation peak, at $E_{\text{pa}} = +0.76$ V, due to the oxidation of the deoxyribose C1' carbon [36,44,48] by miltefosine that caused the liberation of Gua from the dsDNA backbone.

The results clearly showed that miltefosine interacted with dsDNA, under the experimental conditions investigated, leading to strong conformational changes in the DNA double-helical structure, and the release of free Gua.

Although the free Gua oxidation peak was observed, the appearance of the Gua (8-oxoGua) or/and Ade (2,8-oxoAde) oxidation product peaks, at $E_{\text{pa}} = +0.45$ V

[34,35], which would correspond to oxidative damage caused to DNA, was not electrochemically detected. This means that miltefosine did not induce oxidative damage to dsDNA in these experimental conditions.

3.5 *In situ* Interaction of Miltefosine with Poly[G]- and Poly[A]-Electrochemical Biosensors

The homopolynucleotides, poly[G] and poly[A], were used to prepare poly[G] and poly[A]-electrochemical biosensors, Section 2.3, in order to clarify with which purine base, Gua or Ade, a more specific preferential miltefosine-dsDNA interaction occurred, Figure 6.

The DP voltammogram of the poly[G]-electrochemical biosensor, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5, showed one peak, at $E_{pa} = +1.00$ V, corresponding to dGuo oxidation, Figure 6A. A new poly[G]-electrochemical biosensor was incubated in 0.1 μ M miltefosine during 15 min, dried under $N_{2(g)}$ atmosphere, and afterwards transferred to 0.1 M acetate buffer pH 4.5 where DP voltammetry was performed. The DP voltammogram registered using the poly[G]-electrochemical biosensor, Figure 6A, showed the oxidation of dGuo at the same potential as the control, $E_{pa} = +1.00$ V, with a decreased in the peak current. Also, a small new oxidation peak appeared, at $E_{pa} = +0.74$ V, indicating, and confirming the results, obtained using the dsDNA-electrochemical biosensors, concerning the release of free Gua bases. After longer incubation times, 30 and 60 minutes, the DP voltammograms showed a progressive decrease with time of the dGuo oxidation peak, and an increase with incubation time of the free Gua oxidation peak.

In all DP voltammograms the poly[G]-electrochemical biosensors incubated in 0.1 μ M miltefosine, Figure 6A, no oxidation peak related to the presence of the DNA oxidative damage biomarker 8-oxoGua, at $E_{pa} = +0.45$ V [34], was observed, indicating that poly[G] oxidative damage did not occur, in these experimental conditions.

The DP voltammogram of the poly[A]-electrochemical biosensor, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5, Figure 6B, showed one peak, at $E_{pa} = +1.25$ V, corresponding to dAdo oxidation. Using new poly[A]-electrochemical biosensors, incubations in 0.1 μ M miltefosine during 15, 30 and 60 minutes, were carried out. Afterwards the poly[A]-electrochemical biosensors were dried under $N_{2(g)}$ atmosphere, and then transferred to a electrochemical cell with 0.1 M acetate buffer pH 4.5, where the DP voltammograms were recorded.

Only a progressive decrease of the dAdo oxidation peak current occurred, Figure 6B, due to conformational changes of the poly[A] structure, with less exposure of the Ade bases for oxidation at the GCE surface. No peak corresponding to the DNA oxidative damage biomarker 2,8-oxoAde, at $E_{pa} = +0.45$ V [35], was observed, indicating that no poly[A] oxidative damage occurred.

The experiments using poly[G]- and poly[A]-electrochemical biosensors confirmed the results obtained with the ds DNA-electrochemical biosensors, and revealed new

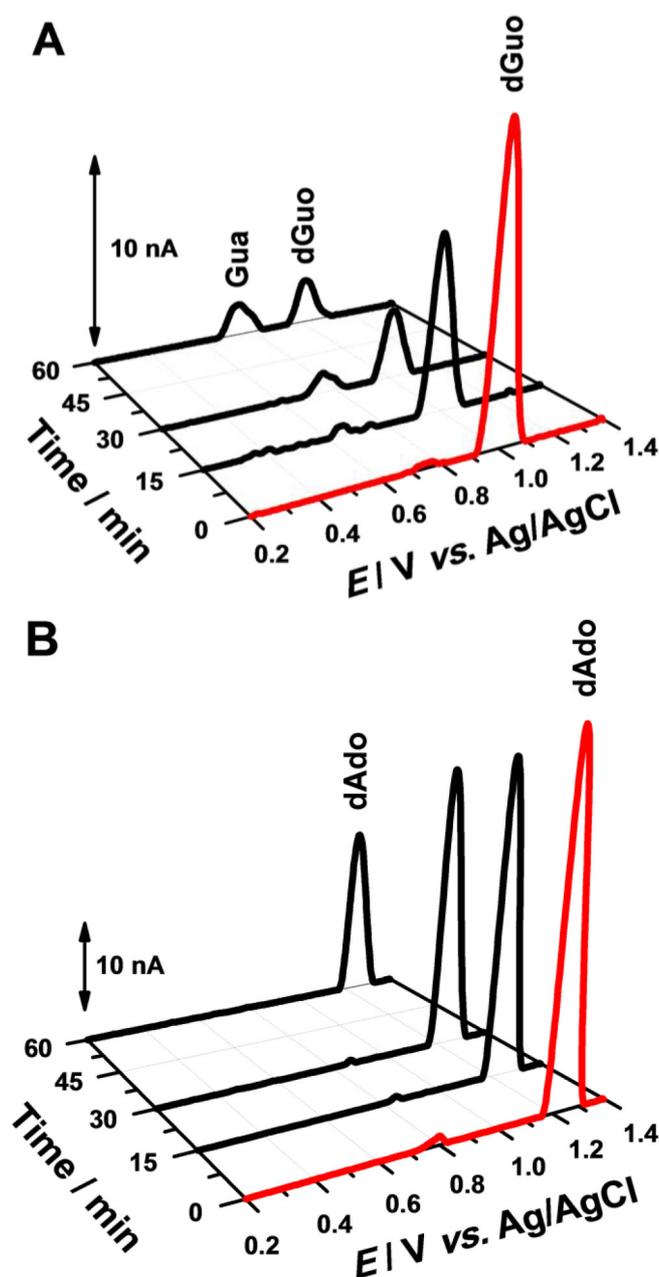


Fig. 6. DP voltammograms baseline-corrected, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5: (A) poly[G]- and (B) poly[A]-electrochemical biosensors. (—, red) control and (—) after incubation with 0.1 μ M miltefosine during different time periods: 15, 30 and 60 minutes, $\nu = 5$ mV s⁻¹.

important information in order to understand the molecular mechanism involved in the miltefosine-dsDNA interaction.

The miltefosine-dsDNA interaction mechanism occurs in two ways: independent of the dsDNA sequence, and leading to the condensation/aggregation of DNA strands, producing a rigid miltefosine-dsDNA complex structure [18,48], detected in incubated solutions, and a preferential interaction between the guanine hydrogen atoms in the C–G base pair and miltefosine, causing the release of

guanine residues that are oxidised at the GCE surface [48], detected using dsDNA-electrochemical biosensors.

4 Conclusions

The miltefosine-dsDNA interaction was investigated in incubated solutions and using dsDNA-electrochemical biosensors, and caused modifications in the DNA morphological structure, which were also confirmed using polyhomonucleotides of guanosine and adenosine, the poly[G]- and poly[A]-electrochemical biosensors.

The interaction mechanism miltefosine-dsDNA causes condensation/aggregation of DNA strands, and the occurrence of a guanine abasic site in the dsDNA structure. Nevertheless, in the experimental conditions used, miltefosine did not induce oxidative damage to DNA.

The discovery of new drugs for the leishmaniasis treatment, a most important parasitic neglected disease, with limited therapeutic options and emerging resistance to the available drugs, remains very important.

The use of DNA-electrochemical biosensors bring new perspectives for a better understanding of their mechanisms of action, as well as the development and the improvement in searching for new antileishmanial agents.

5 Glossary

WHO	World Health Organization
AFM	Atomic Force Microscopy
FTIR	Fourier Transform Infrared
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
UV-Visible	Ultraviolet-Visible
CV	Cyclic voltammetry
DP	Differential pulse
SW	Square wave
GCE	Glassy carbon electrode
HePC	Hexadecylphosphocholine
dsDNA	Double-strand deoxyribonucleic acid
Poly[G]	Polyguanylic acid
Poly[A]	Polyadenylic acid
dGuo	Desoxyguanosine
dAdo	Desoxyadenosine
Gua	Guanine
Ade	Adenine
8-oxoGua	8-oxoguanine
8-oxoAde	2,8-dihydroxyadenine

Acknowledgements

Financial support from Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), project UID/EMS/00285/2013 (co-financed by the European Community Fund FEDER), FEDER funds through the program COMPET – Programa Operacional Factores de Competitividade, SUDOE project Innovec'EAU (SOE1/P1/F0173), and PhD Grant 232296/2014-6 (W.B.S. Machini) from CNPq/Brazil, are gratefully acknowledged.

References

- [1] D. R. Gwatkin, M. Guillot, P. Heuveline, *Lancet* **1999**, 354, 586–589.
- [2] World Health Organization, Geneva, Switzerland, **2010**.
- [3] P. Hunt, R. Stewart, J. B. Mesquita, L. Oldring, *Vol. 6*, World Health Organization, Switzerland, **2007**.
- [4] A. Oryan, D. Mehrabani, S. M. Owji, M. H. Motazedian, Q. Asgari, *Comp. Clin. Pathol.* **2007**, 16, 275–279.
- [5] H. W. Murray, J. D. Berman, C. R. Davies, N. G. Saraiva, *Lancet* **2005**, 366, 1561–1577.
- [6] S. Singh, R. Sivakumar, *J. Infect. Chemother.* **2004**, 10, 307–315.
- [7] A. Oryan, D. Mehrabani, S. M. Owji, M. H. Motazedian, G. Hatam, Q. Asgari, *J. Appl. Anim. Res.* **2008**, 34, 87–92.
- [8] World Health Organization, Switzerland, **2015**.
- [9] M. Akbari, A. Oryan, G. Hatam, *Acta Trop.* **2017**, 172, 86–90.
- [10] P. Hilgard, T. Klenner, J. Stekar, C. Unger, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1993**, 32, 90–95.
- [11] J. Verweij, A. Planting, M. van der Burg, G. Stoter, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1992**, 118, 606–608.
- [12] S. Sundar, P. L. Olliaro, *Ther. Clin. Risk Manage.* **2007**, 3, 733–740.
- [13] T. P. Dorlo, M. Balasegaram, J. H. Beijnen, P. J. De Vries, *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, 67, 2576–2597.
- [14] N. R. Jena, *J. Biosci.* **2012**, 37, 503–517.
- [15] S. C. Oliveira, A. M. Oliveira-Brett, *Langmuir* **2012**, 28, 4896–4901.
- [16] K. Masuda, T. Nakata, K. Tamagake, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2000**, 63–64.
- [17] V. Cassina, D. Seruggia, G. L. Beretta, D. Salerno, D. Brogioli, S. Manzini, F. Zunino, F. Mantegazza, *Eur. Biophys. J.* **2011**, 40, 59–68.
- [18] S. C. Oliveira, A. M. Chiorcea-Paquim, S. M. Ribeiro, A. T. Melo, M. Vivan, A. M. Oliveira-Brett, *Bioelectrochemistry* **2009**, 76, 201–207.
- [19] F. Araya, G. Huchet, I. McGroarty, G. G. Skellern, R. D. Waigh, *Methods* **2007**, 42, 141–149.
- [20] N. Shi, V. M. Ugaz, in *Using microchip gel electrophoresis to probe DNA–Drug binding interactions*, Vol. 1094 (Eds.: J. C. Stockert, J. Espada, A. Blázquez-Castro), Humana Press, New York, **2014**, pp. 13–24.
- [21] P. S. Dorraji, F. Jalali, *J. Braz. Chem. Soc.* **2013**, 24, 939–945.
- [22] N. Li, Y. Ma, C. Yang, L. Guo, X. Yang, *Biophys. Chem.* **2005**, 116, 199–205.
- [23] W. Zhong, J. S. Yu, Y. Liang, *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* **2003**, 59, 1281–1288.
- [24] S. Agarwal, D. K. Jangir, R. Mehrotra, *J. Photochem. Photobiol. B* **2013**, 120, 177–182.
- [25] S. Agarwal, D. K. Jangir, P. Singh, R. Mehrotra, *J. Photochem. Photobiol. B* **2014**, 130, 281–286.
- [26] C. Silvestri, J. S. Brodbelt, *Mass Spectrom. Rev.* **2013**, 32, 247–266.
- [27] Y. Hari, A. Nyakas, S. R. Stucki, S. Schurch, *Chimia* **2014**, 68, 164–167.
- [28] W. Zhong, J. S. Yu, Y. Liang, K. Fan, L. Lai, *Spectrochim. Acta. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2004**, 60, 2985–2992.
- [29] L. P. Lin, L. S. Huang, C. W. Lin, C. K. Lee, J. L. Chen, S. M. Hsu, S. Lin, *Curr. Drug Targets* **2005**, 5, 61–72.
- [30] S. Rauf, J. J. Gooding, K. Akhtar, M. A. Ghauri, M. Rahman, M. A. Anwar, A. M. Khalid, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, 37, 205–217.
- [31] C. M. A. Brett, A. M. Oliveira-Brett, in *Encyclopedia of Electrochemistry*, Vol. 3 (Eds.: A. J. Bard, M. Stratmann,

- P. R. Unwin), Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany, **2003**, pp. 105–124.
- [32] V. C. Diculescu, A. M. Chiorcea-Paquim, A. M. Oliveira-Brett, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, *79*, 23–36.
- [33] E. Katz, B. Willner, I. Willner, *Persp. Bioanal.* **2005**, *1*, 195–246.
- [34] A. M. O. Brett, J. A. P. Piedade, S. H. P. Serrano, *Electroanalysis* **2000**, *12*, 969–973.
- [35] V. C. Diculescu, J. A. Piedade, A. M. Oliveira-Brett, *Bioelectrochemistry* **2007**, *70*, 141–146.
- [36] I. B. Santarino, S. C. B. Oliveira, A. M. Oliveira-Brett, *Electroanalysis* **2014**, *26*, 1304–1311.
- [37] A. D. R. Pontinha, H. E. Satana, V. C. Diculescu, A. M. Oliveira-Brett, *Electroanalysis* **2011**, *23*, 2651–2657.
- [38] V. C. Diculescu, A. M. Oliveira-Brett, *Bioelectrochemistry* **2016**, *107*, 50–57.
- [39] L. I. Tome, N. V. Marques, V. C. Diculescu, A. M. Oliveira-Brett, *Anal. Chim. Acta* **2015**, *898*, 28–33.
- [40] R. M. Buoro, I. C. Lopes, V. C. Diculescu, S. H. P. Serrano, L. Lemos, A. M. Oliveira-Brett, *Bioelectrochemistry* **2014**, *99*, 40–45.
- [41] H. E. Satana, A. D. Pontinha, V. C. Diculescu, A. M. Oliveira-Brett, *Bioelectrochemistry* **2012**, *87*, 3–8.
- [42] D. D. Perrin, B. Dempsey, *Buffers for pH and metal ion control*, Chapman and Hall, London, **1974**.
- [43] S. C. Oliveira, A. M. Oliveira-Brett, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2010**, *13*, 628–640.
- [44] I. C. Lopes, A. M. Oliveira-Brett, *Electroanalysis* **2017**, *7*, 1674–1682.
- [45] A. M. Oliveira-Brett, V. C. Diculescu, *Bioelectrochemistry* **2004**, *64*, 143–150.
- [46] V. C. Diculescu, A. M. Oliveira-Brett, in *Biosensors and Cancer* (Ed.: V. R. Preedy), Science Publisher, CRC Press, New Hampshire, USA, **2012**.
- [47] A. M. Oliveira-Brett, S. H. P. Serrano, T. A. Macedo, D. Raimundo, M. H. Marques, M. A. La-Scalea, *Electroanalysis* **1996**, *8*, 992–995.
- [48] R. M. Buoro, I. C. Lopes, V. C. Diculescu, S. H. Serrano, L. Lemos, A. M. Oliveira-Brett, *Bioelectrochemistry* **2014**, *99*, 40–45.

Received: September 20, 2017

Accepted: October 19, 2017

Published online on November 2, 2017

DOI: 10.1002/elan.201900162

Antidiabetic Drug Metformin Oxidation and *In Situ* Interaction With dsDNA Using a dsDNA-electrochemical Biosensor

W. B. S. Machini,^[a] I. P. G. Fernandes,^[a] and A. M. Oliveira-Brett^{*[a]}

Abstract: The antidiabetic drug metformin (MET) is one of a group of emerging pharmaceutical drug contaminants in the wastewater treatment plants. The electrochemical behaviour of MET–Cu(II) complex by differential pulse and square wave voltammetry, in a wide pH range, at a glassy carbon electrode modified with a carbon black dihexadecylphosphate film (CB–DHP/GCE), was investigated. The MET–Cu(II) complex oxidation showed one pH-dependent process, which leads to the formation of an oxidation product, being oxidized at a lower potential. The electroanalytical MET–Cu(II) complex detection limit, LOD = 0.63 μM , and quantification limit, LOQ = 2.09 μM , were obtained, and the MET–Cu(II) complex determination in wastewater samples collected from a

senior residence effluent, using the CB–DHP/GCE, was achieved. Considering MET toxicity, the electrochemical evaluation of MET–dsDNA interaction, in incubated solutions and using dsDNA-electrochemical biosensors, following the changes in the oxidation peaks of guanosine and adenosine residues electrochemical currents, was also investigated. The MET–dsDNA interaction mechanism, for shorter times, occurs by the binding of MET molecules in the minor grooves of the dsDNA, and for long times, the stabilization of the MET–dsDNA complex, causing a local distortion and/or unwinding of dsDNA morphology, is described. However, MET did not promote DNA oxidative damage.

Keywords: Antidiabetic drug · metformin · carbon black · DNA interaction · DNA-electrochemical biosensor

1 Introduction

Diabetes is a serious chronic metabolic disease that occurs when the pancreas does not produce enough insulin to regulate the level of blood sugar (glucose) formed from the food consumed by a person, or when the body cannot effectively use the insulin it produces [1]. Diabetes is a major public health problem, being one of the four priority non-communicable diseases (NCDs) directed at the action of the world's leaders [2], especially as it can cause serious complications over time such as heart attacks, stroke, blindness, kidney failure and amputation of the lower limbs.

According to the World Health Organization's first global report (2014) on diabetes [3], the number of adults living with the disease has almost quadrupled since 1980 to more than 400 million adults, and more than 1.5 million deaths have been reported by diabetes or high sugar levels.

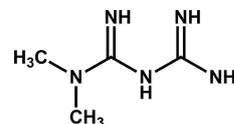
Type I diabetes, also known as insulin-dependent diabetes, juvenile or early childhood, is characterized by poor insulin production in the body, which causes people with diabetes to administer insulin daily to regulate the amount of glucose in the blood. The cause of type I diabetes is not known and is currently not preventable [4].

Type II diabetes, also called non-insulin-dependent diabetes, is the most common, accounting for more than 95 % of diabetes worldwide, and usually occurs in adults when the body becomes insulin resistant, does not

produce enough insulin or makes use ineffective. This type of diabetes results from a complex gene-environment interaction, for which several risk factors, such as age, gender, ethnicity, family history, obesity and hypertension, are responsible [1].

Metformin (*N,N*-dimethylbiguanide, MET), Scheme 1, is an antihyperglycemic drug administered orally to control the type II diabetes. Although widely used in several countries for the control of type II diabetes, it is also used to reduce cholesterol and triglycerides, so it is in the first line of choice for treatment especially in people with overweight, fat and normal renal function [5].

Since MET approval in the United Kingdom and Canada in 1958, and in the United States of America in 1995 [6], several pharmacological mechanisms have been



Scheme 1. Chemical structure of the antidiabetic drug metformin.

[a] W. B. S. Machini, I. P. G. Fernandes, A. M. Oliveira-Brett
Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology,
University of Coimbra, 3004-535, Coimbra, Portugal
E-mail: brett@ci.uc.pt

investigated and described, among them it is suggested that MET acts to decrease absorption of glucose by the intestine, improve peripheral glucose uptake, decrease fasting plasma insulin levels, and increase insulin sensitivity in order to reduce blood glucose concentration without causing hypoglycaemia [7]. In addition, the activation of tyrosine kinases and AMP-activated protein kinase (AMPK) causes MET to inhibit gluconeogenesis, increase cellular glucose transport and decrease the production of hepatic glucose, cholesterol and triglyceride synthesis [8].

The worldwide dissemination of MET has resulted in several studies on other possible indications, which have shown that MET can also be used as an antineoplastic [9], antiaging [10], cardiovascular protective [11], neuroprotective agent [12], or as an optional medication for polycystic ovarian syndrome [13].

Although MET has excellent antidiabetic activity and several potentialities in the treatment of other diseases, MET is one of a group of emerging contaminants, which are compounds that are strong candidates for future regulation due to their potential toxicity. The MET harmful effects, a long list of contraindications, such as the contamination and accumulation in wastewater and the possibility of causing endocrine disorders [14], show the importance of the MET oxidation and quantification in the environment.

In fact, MET is deposited in the environment at relatively high concentrations [14], because MET is excreted in the trash by patients in its active form, being converted in the wastewater treatment plants into by-products.

The quantification of MET concentration is of interest both preclinical, and clinical, in monitoring diabetic patients therapeutic drugs, in order to prevent toxicity, and to guarantee patient adherence to drug prescription [15]. Different strategies have been developed to determine MET, among them stand out conductometry [16], gas chromatography coupled to different detectors [17,18], high performance liquid chromatography coupled to different detectors [19,20], electrophoresis [21], electrochemistry [22–24], UV-Vis [25], infrared [26], nuclear magnetic resonance spectroscopy [27], and solid phase extraction [28]. The electroanalytical methods can present many advantages, such as lower reagent consumption, shorter analysis time, lower instrumentation cost, no separation and extraction process, and the use of low toxicity reagents.

The MET–dsDNA interaction mechanisms research is also important due to the possibility to better understand, as well as detecting, perturbations of the DNA double-helical structure and oxidative DNA damage. The DNA-electrochemical biosensor [29–36], consists of an electrochemical transducer with DNA immobilized on its surface capable of detecting specific drug–DNA binding process [37,38], through electrochemical transduction.

The aim of this paper was to investigate the MET electrochemical behaviour and the electron transfer mechanism using cyclic, differential pulse and square

wave voltammetry, and the electroanalytical determination of MET, in wastewater samples collected from a senior residence effluent. Also, considering MET adverse effects, the *in situ* electrochemical evaluation of the MET–dsDNA interaction mechanism was undertaken. A systematic research of the interaction between MET and dsDNA for different periods of time, by differential pulse voltammetry, using two approaches: (a) MET–dsDNA interaction in incubated solutions, and (b) MET–dsDNA-electrochemical biosensor, and MET–poly[G]- and MET–poly[A]-electrochemical biosensors interaction, were performed. The UV-Vis spectrophotometry was also used to investigate the MET–dsDNA interaction in solution.

2 Experimental

2.1 Material and Reagents

Metformin (metformin hydrochloride, MET) (PHR1084), dihexadecylphosphate (DHP) (D2631), copper(II) chloride dihydrate (307483), double stranded deoxyribonucleic acid sodium salt from calf thymus (dsDNA) (D1501), polyguanylic acid potassium salt (poly[G]) (P4404) and polyadenylic acid potassium salt (poly[A]) (P9403) and were obtained from Sigma-Aldrich, Spain, and used without further purification.

A stock solution of 1.0 mM metformin was prepared in deionised water and kept at 4 °C. Solutions of different concentrations of metformin were prepared by dilution of the appropriate quantity in 0.1 M acetate buffer pH 4.5 supporting electrolyte. These solutions were never used for more than one day. This procedure was in agreement with the long-term storage Sigma-Aldrich Production Information suggestion for metformin storage and ensured that the drug activity was maintained.

A stock solution of 1.0 mM Cu(II) was prepared in deionised water and diluted to the desired concentrations in appropriated supporting electrolyte. Stock solutions of 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of dsDNA, poly[G] and poly[A] were prepared in deionised water and diluted to the desired concentrations prior to use.

Supporting electrolyte solutions, with ionic strength $I=0.1$ M, of different pH composition: HOAc/NaOAc acetate buffer pH 3.0 to 5.0, $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ phosphate buffer pH 6.0 to 8.0 and $\text{NaOH}/\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_7$ borate buffer pH 9.0 to 12.0, using analytical grade reagents and purified water from a Millipore Milli-Q system (conductivity $\leq 0.1 \mu\text{S cm}^{-1}$) (EMD Millipore, Massachusetts, USA) (Certificate ISO 9001 Quality systems standards) were used [39].

The pH measurements were carried out with a Crison micropH 2001 pH-meter with an Ingold combined glass electrode. Microvolumes were measured using a Pipetman® single channel electronic pipette (Gilson Co, Inc., France). All experiments were performed at room temperature (25 ± 1 °C).

2.2 Voltammetric Parameters and Electrochemical Cells

Voltammetric experiments were carried out using a μ Autolab type III, running with GPES 4.9 software, Metrohm/Autolab, The Netherlands. The measurements were performed using a three-electrode system in a 2 mL one compartment electrochemical cell (eDAQ, Europe). Measurements were carried out using a glassy carbon electrode (GCE) ($d=1.0$ mm) as working electrode, a Pt wire as counter electrode, and an Ag/AgCl (3 M KCl) as reference electrode.

The experimental conditions for cyclic voltammetry (CV) were obtained using a potential increment of 2 mV at 25 mVs^{-1} scan rate. For differential pulse (DP) voltammetry pulse amplitude 50 mV, pulse width 100 ms, step potential 2 mV and scan rate 5 mVs^{-1} , were used. For square wave (SW) voltammetry, pulse amplitude 50 mV, frequency 13 Hz, and potential increment 2 mV corresponding to an effective scan rate of 25 mVs^{-1} , were used.

Before each measurement, preparation of each GCE modified with CB–DHP and preparation of each DNA-electrochemical biosensor, the GCE was washed with ethanol and Milli-Q water, and the surface was polished using diamond spray (particle size 3 μm) (Kemet, UK). After polishing, it was thoroughly rinsed with Milli-Q water. Following this mechanical pre-treatment, the GCE was placed in the appropriate buffer supporting electrolyte and DP voltammograms were recorded between the potential limits of $E_1=0.0 \text{ V}$ and $E_2=+1.4 \text{ V}$, until a stable signal was obtained. This procedure was performed before each electrochemical experiment and ensured very reproducible experimental results.

2.3 Preparation of the CB–DHP/GCE

A GCE surface was chemically modified with a film of nanostructured carbon black and dihexadecylphosphate (CB–DHP/CGE). Carbon black (CB) is a nanostructured material that has attracted attention due to its electrochemical properties, such as chemical stability, high electrical conductivity and surface area, and mainly to improve the electron transfer kinetics and the electroanalytical signal when used as an electrochemical sensor [40].

The CB–DHP/GCE was prepared according to procedures previously reported [41]. The dispersion containing CB and DHP was prepared adding 1.0 mg of CB and 1.0 mg of DHP in 1.0 mL of ultrapure water. This mixture was placed in an ultrasonic bath for 60 min to form a homogeneous dispersion (CB–DHP). Thus, an aliquot of 1.0 μL CB–DHP dispersion was dropped on the GCE surface, and the solvent was evaporated under room temperature for 20 min. Finally, the GCE surface modified with CB and DHP was obtained (CB–DHP/GC).

2.4 UV-Vis Spectrophotometric Parameters

UV-Vis measurements were performed using a Spectrophotometer Hitachi U-2810 running with UV Solution Program (Digilab Hitachi, Tokyo, Japan). The experimental conditions for absorption spectra were: slit width 1.5 nm, sampling interval 0.5 nm and a scan speed of 400 nm min^{-1} . All UV-Vis spectra were measured from 230 nm to 400 nm, in a quartz glass cuvette with an optic path of 10.0 mm.

2.5 Metformin Determination in Wastewater

The wastewater samples were collected from a senior residence effluent, with senior people taking MET medication. The wastewater sample was collected in a decontaminated flask, filtered on a glass microfiber filter, followed by a new filtration on a 0.45 μm PVDF filter. Then, the wastewater sample was put in an amber flask and kept at -12°C until the electroanalytical determination. For the quantification of MET in the wastewater samples 5.0 μM Cu(II) were added to the solution and diluted in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0, were the DP voltammograms were performed. The concentration of MET in the wastewater samples was determined by interpolation of the peak current in the previously obtained standard calibration curve. The MET electroanalytical determination was repeated three times ($n=3$) always using a new CB–DHP/GCE.

2.6 MET–dsDNA Incubation Procedures

2.6.1 Procedure 1 – MET–dsDNA Interaction in Incubated Solutions

Solutions containing different concentrations of MET and $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA were incubated, in 0.1 M acetate buffer solution pH 4.5, during different time periods. Control solutions of MET and of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA were also prepared, in 0.1 M acetate buffer solution pH 4.5, and stored in similar conditions and during the same time periods. DP voltammograms in solution, after different incubation times always using a clean GCE surface, were recorded.

2.6.2 Procedure 2 – MET–dsDNA-electrochemical Biosensor Interaction

The dsDNA-electrochemical biosensor was prepared by covering successively the GCE surface with three drops, each of 5 μL from a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA solution, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5. After placing each drop on the electrode surface the biosensor was dried under a constant flux of $\text{N}_2(\text{g})$. A similar procedure was used in order to obtain the poly[G]- and poly[A]-electrochemical biosensors.

Performing this procedure, a full coverage of the GCE surface by a multilayer dsDNA film [36] was obtained,

avoiding the formation of undesired thin and incomplete network film of co-adsorbed dsDNA–MET, dsDNA or MET, nonspecific binding to the electrode surface.

The dsDNA-, poly[G]- or poly[A]-electrochemical biosensors prepared were immersed in solutions of 50 μM MET, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5, and allowed to incubate during the different time periods.

Afterwards, the dsDNA-, poly[G]- or poly[A]-electrochemical biosensors were removed from the solution, washed with deionised water in order to remove the unbounded MET molecules and placed in the electrochemical cell, containing only the 0.1 M acetate buffer pH 4.5 supporting electrolyte, where the transduction, by DP voltammetry, was performed. For control experiments, the dsDNA-electrochemical biosensor was incubated in 0.1 M acetate buffer pH 4.5 supporting electrolyte during the same time periods and in similar conditions as the solutions with MET.

2.6.3 Procedure 3 – MET–dsDNA-spectrophotometric Interaction

The UV-Vis spectra for incubated solution of 50 μM MET and 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, 4.5, after 0 and 24 hours, and control solutions of 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA and 50 μM MET, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5, were recorded.

2.7 Acquisition and Presentation Data

All the voltammograms presented were background-subtracted and baseline-corrected using the moving average with a step window of 5 mV included in GPES version 4.9 software. This mathematical treatment improved the visualization and identification of peaks over the baseline without introducing any artefact, although the peak height is in some cases reduced (<10%) relative to that of the untreated curve. Nevertheless, this mathematical treatment of the original voltammograms was used in the presentation of all experimental 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.

All the UV-Vis spectra presented were shown without any further mathematical treatment and all values of λ_{max} and absorbance were obtained from the original spectra.

3 Results and Discussion

The voltammetric behaviour of MET, and the electroanalytical determination of MET in wastewater samples collected from a senior residence effluent, using a MET–Cu(II) complex, was investigated. The MET *in situ* interaction with dsDNA, in solution using DP voltammetry and UV-Vis, and using the dsDNA-, poly[G]- and poly[A]-electrochemical biosensors, was investigated.

3.1 Voltammetric Behaviour of MET

The oxidation behaviour of the antidiabetic drug MET was investigated at GCE by cyclic, differential pulse and square wave voltammetry, in 0.1 M phosphate buffer solution pH 7.0 containing 50 μM MET and, in all voltammograms, no electrochemical redox processes related to MET oxidation were observed.

Although one electrochemical reduction process of MET could be observed using the GCE in aqueous solution [42], the MET oxidation was only detected using modified electrodes [43–45], and catalysts in solution, such as copper (II) ions [46].

Considering the catalytic action of Cu(II) ions towards the oxidation of MET, and the increase of electroanalytical signal and the improvement of electron transfer kinetics, the oxidation behaviour of MET in the presence of 5.0 μM Cu(II) ions, by differential pulse and square wave voltammetry, was investigated.

3.1.1 Differential Pulse Voltammetry

In order to develop a MET electroanalytical procedure, the results using a GCE and a GCE chemically modified surface with a film of nanostructured carbon black and dihexadecylphosphate (CB–DHP/CGE), Section 2.3, were compared.

The electrochemical oxidation of 10.0 μM MET in the presence of 5.0 μM Cu(II) ions, at CB–DHP/GCE and at the GCE, in the same conditions, using DP voltammetry, in 0.1 M phosphate buffer solution pH 7.0, are shown, Figure 1A. In both DP voltammograms, only one oxidation peak P1a, at $E_{\text{P1a}} = +0.91$ V, was observed. However, as expected, the DP voltammogram obtained with CB–DHP/GCE showed a peak current increase of ~52% when compared with the GCE, due to the adsorbed carbon black morphology great increase of electrode surface area, Figure 1A. The subsequent experiments were performed using only the CB–DHP/GCE.

Successive DP voltammograms in the same solution, without cleaning the CB–DHP/GCE surface, were recorded, Figure 1B. The second scan showed an increase of the oxidation peak P1a current, at $E_{\text{P1a}} = +0.91$ V, and the appearance of a new oxidation peak P2a, at $E_{\text{P2a}} = +0.26$ V, which can be explained as the oxidation of electroactive species generated from the oxidation of MET–Cu(II) complex. In the third consecutive DP voltammogram, an increase for both oxidation peak currents was observed, Figure 1B.

The effect of pH on the electrochemical behaviour of MET–Cu(II) complex, using the CB–DHP/CGE, by DP voltammetry, in different buffer electrolytes, with 0.1 M ionic strength, over a wide pH range between 3 and 12, was also investigated, Figure 2.

The first DP voltammograms of MET–Cu(II) complex at CB–DHP/GCE showed that in electrolytes $3 < \text{pH} < 10$ the oxidation peak potential P1a was shifted to less positive values with increasing the pH. The highest peak

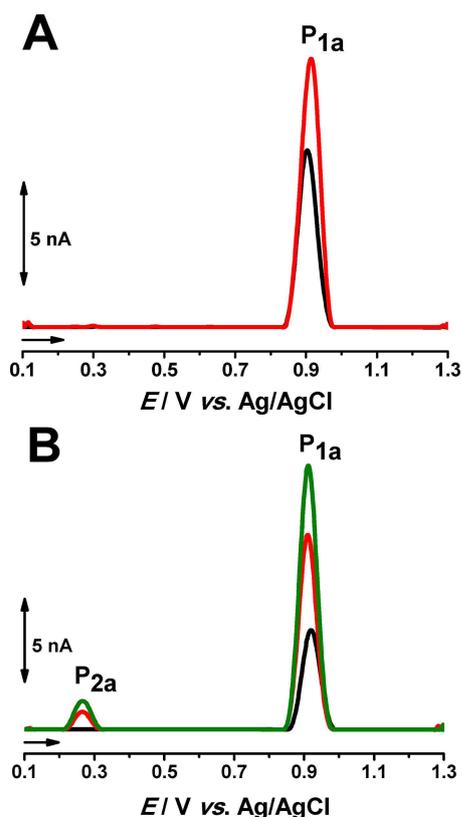


Fig. 1. DP voltammograms baseline corrected, for 10.0 μM MET containing 5.0 μM Cu(II) ions, in 0.1 M phosphate buffer solution pH 7.0: (A) (–) GCE and (–) CB–DHP/GCE, (B) CB–DHP/GCE: (–) first, (–) second, and (–) third scans. Scan rate $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

current was obtained in pH ~ 10 , 0.1 M borate buffer, Figure 2A.

In $3 < \text{pH} < 10$ the MET–Cu(II) complex oxidation, at CB–DHP/GCE, is irreversible and pH dependent. The peak potential follows the relationship $E_p \text{ (V)} = 1.42 - 0.07 \text{ pH}$. The slope of the dotted line, close to 59 mV per pH unit, shows that an equal number of protons and electrons are involved in the MET–Cu(II) complex oxidation, Figure 2B. The width at half height of MET–Cu(II) complex oxidation peak P1a is $W_{1/2} \sim 75 \text{ mV}$, the electrochemical reaction involving the transfer of two electrons and two protons [47]. For pH > 10 the MET–Cu(II) complex oxidation at CB–DHP/GCE is pH independent.

3.1.2 Square Wave Voltammetry

Considering the advantages of the SW voltammetry allowing the verification of the reversibility of the electron transfer reaction during only one scan, experiments with the MET–Cu(II) complex to confirm the MET oxidation mechanisms were performed.

The first SW voltammogram in MET–Cu(II) complex, in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0, showed one irreversible

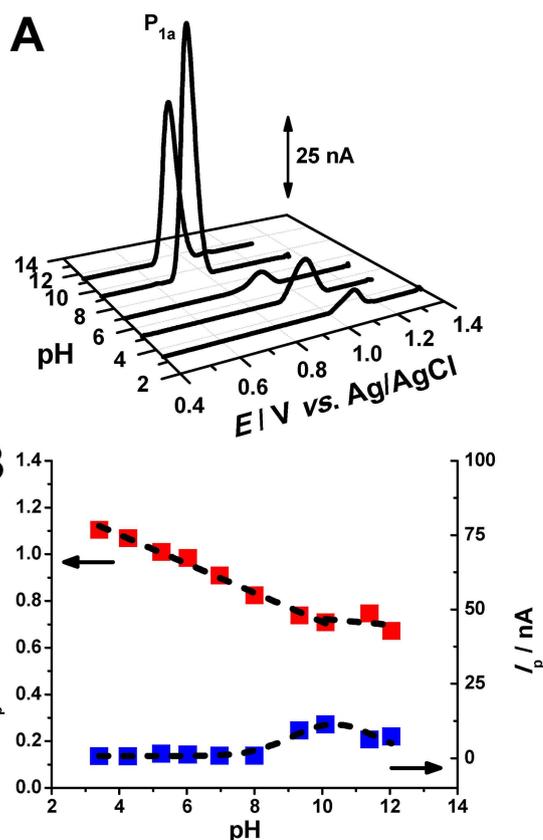


Fig. 2. (A) 3D DP voltammograms baseline corrected, for 10.0 μM MET containing 5.0 μM Cu(II) ions, at CB–DHP/GCE, in different pHs supporting electrolyte. (B) Plot of first MET–Cu(II) complex oxidation peak potential, P1a, (■) E_p , and peak current (■) I_p vs. pH. Scan rate $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

oxidation peak P1a, at $E_{p1a} = +0.91 \text{ V}$, confirmed by plotting the forward and backward components of the total current. The third SW voltammogram, obtained without cleaning the CB–DHP/GCE surface, showed the occurrence of a reversible peak P2a, at $E_{p2a} = +0.16 \text{ V}$, corresponding to the MET–Cu(II) complex oxidation products reversible oxidation.

3.1.3 MET Oxidation Mechanisms

According to the results obtained by DP and SW voltammetry, it can be concluded that, at CB–DHP/GCE, the pH-dependent MET–Cu(II) complex irreversible peak P1a oxidation mechanism involves the transfer of two electrons and two protons, corresponding to the electrochemical oxidation of the imino group in MET–Cu(II) complex to a guanidino-group, while the new reversible peak P2a oxidation mechanism, observed in the second and third DP voltammograms, is related to the electrochemical oxidation of an intermediate *N*-hydroxy imino-group, formed after a rapid hydrolysis of guanidino-group, to a carbonyl imino-group [24, 48].

3.1.4 Standard Calibration

In order to obtain an electroanalytical standard calibration curve for the determination of MET–Cu(II) complex, DP voltammetric measurements were performed varying the MET–Cu(II) complex concentrations, from 2.0 to 10 μM MET, in the proportion of 2 MET:1 Cu(II) ions, in 0.1 M phosphate buffer solution pH 7.0.

Each measurement was always performed using a new CB–DHP/GCE surface, a process that gave rise to small changes in the CB–DHP/GCE surface area, which can in turn cause small variations in the peak currents measured, but ensures that no adsorbed product on the surface interferes with the electroanalytical signal.

The electroanalytical determination of MET–Cu(II) complex standards was carried out by DP voltammetry, measuring the MET–Cu(II) complex peak P1a oxidation current, and a LOD = 0.63 μM and a LOQ = 2.09 μM , was obtained. The data extracted from three calibration curves presented the value of $R^2 = 0.996$, and a wider linear range following the equation $I_{\text{pa}} \text{ (nA)} = 0.64 \text{ (nA } \mu\text{M}^{-1}) [\text{MET}] \text{ (}\mu\text{M)} - 0.06 \text{ (nA)}$. The relative standard deviation (RSD) was 7.58 %.

The MET–Cu(II) complex detection limit (LOD) was determined according to the equation $\text{LOD} = 3 \times \text{SD} \times (\text{sensitivity})^{-1}$, where SD is the standard deviation of the peak current, for DP voltammetry, and the sensitivity is the slope of the calibration plot. The quantification limit (LOQ), the lowest concentration that can be quantified with acceptable precision and accuracy, is given by $\text{LOQ} = 10 \times \text{SD} \times (\text{sensitivity})^{-1}$.

Table 1 compares the CB–DHP/GCE electrochemical sensor with other electrochemical sensors and different methodologies for detecting MET previously reported in the literature.

The detection limit obtained for the proposed sensor is lower than using other electrochemical sensors, as well as other methodologies, suggesting this to be an excellent strategy to detect and quantify the antidiabetic drug.

Table 1. Comparison of the proposed sensor with other sensors and methods for MET detection.

Sensor	Method	LOD (M)	Reference
–	Capillary electrophoresis	15.5×10^{-6}	[21]
–	UV-Vis	1.8×10^{-6}	[50]
–	UV-Vis	6.3×10^{-7}	[53]
MF–PVC	Potentiometry	6.9×10^{-6}	[49]
BiVO ₄ /CPE	CV	4.0×10^{-4}	[52]
CuMW/CNT/PE	SSV	6.5×10^{-7}	[44]
CB–DHP/GCE	DPV	6.3×10^{-7}	This work

UV-Vis: UV-Visible spectrophotometry; MF–PVC: Metformin poly(vinyl chloride) membranes; BiVO₄/CPE: BiVO₄ modified carbon paste electrode, CV: cyclic voltammetry; CuMW/CNT/PE: Cu(II)₄(1,3-bis(4-pyridyl)propane)₄(2-methylacrylic acid)₈(H₂O)₂ · 2H₂O and multiwalled carbon nanotubes modified paste electrode, SSV: Single sweep voltammetry.

3.1.5 Metformin Determination in Wastewater

The electroanalytical determination of MET in wastewater samples collected from a senior residence effluent, with senior people taking MET medication, by DP voltammetry, at CB–DHP/GCE, using the procedure for electroanalysis of MET–Cu(II) complex in wastewater described in Section 2.5, was followed.

First, the wastewater sample was analysed by DP voltammetry, at CB–DHP/GCE, in absence of Cu(II) ions, in order to identify any electrochemical reactions in the potential range studied. The results revealed no oxidation peaks in the wastewater sample due to possible existence of interfering compounds.

Finally, the result obtained in the quantification of MET–Cu(II) complex in the wastewater of a senior residence, by DP voltammetry, using the CB–DHP/GCE was $8.49 \pm 0.51 \mu\text{M}$. According to the RSD obtained of 5.95 %, the CB–DHP/GCE can be successfully applied for the determination of MET in wastewater samples. These results also demonstrate that the proposed method will be promising for quantification of MET in other matrices.

3.2 Metformin *In Situ* Interaction with dsDNA

The electrochemical behaviour of dsDNA, poly[G] and poly[A], at GCE, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5, was revisited for control using DP voltammetry, Figures 3 (–) and ■■■Dear Author, please mention Figure 4 before■■■5 (–), in order to identify the occurrence of oxidation peaks after the *in situ* MET–dsDNA, MET–poly[G] and MET–poly[A] interaction.

The DP voltammograms, at GCE, obtained in 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, and using the dsDNA-electrochemical biosensor, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5, showed two small peaks corresponding to the oxidation of desoxyguanosine (dGuo), at $E_{\text{pa}} = +0.99 \text{ V}$, and desoxyadenosine (dAdo), at $E_{\text{pa}} = +1.26 \text{ V}$, Figure 3 (–). A greater difficulty in electron transfer from within the double strand of the DNA to the surface of the CGE was evidenced by the small currents of the dGuo and dAdo peaks [37].

The DP voltammograms obtained for control poly[G]- and poly[A]-electrochemical biosensors, in the same conditions showed, as expected, only one oxidation peak each, Figure 5 (–). The poly[G] homopolynucleotide contains only Gua residues and the oxidation occurred at the dGuo residues, at $E_{\text{pa}} = +0.98 \text{ V}$, while poly[A] homopolynucleotide contains only Ade residues and the oxidation occurred at the dAdo residues, at $E_{\text{pa}} = +1.25 \text{ V}$.

3.2.1 Electrochemistry of MET–dsDNA Interaction in Incubated Solutions

In order to evaluate the possibility of MET to cause conformational changes in the DNA double helix, hydrogen bonding cleavage and/or dsDNA base oxidative

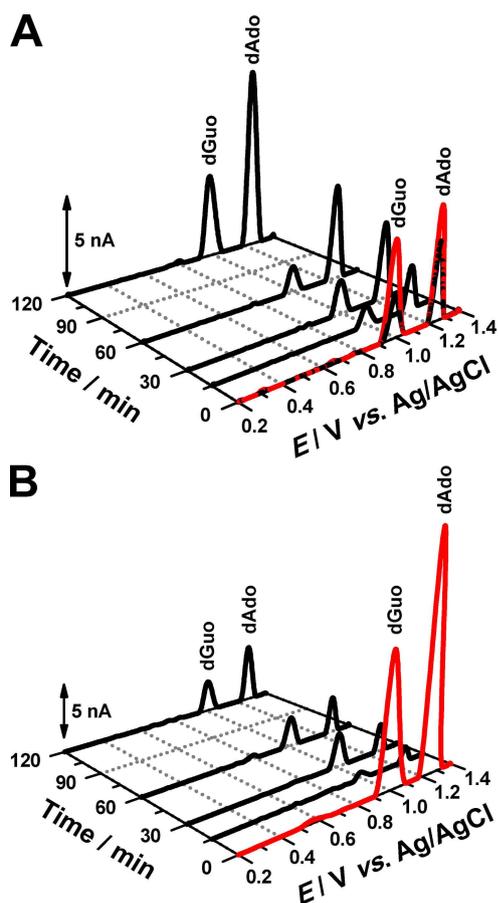


Fig. 3. DP voltammograms baseline-corrected, at GCE, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5: (A) (–) control $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA solution, and (–) after incubation of $25 \mu\text{M}$ MET with $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA in solution, and (B) dsDNA-electrochemical biosensor: (–) control and (–) after incubation with $25 \mu\text{M}$ MET. Incubation time periods: 15, 30, 60 and 120 minutes. Scan rate $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

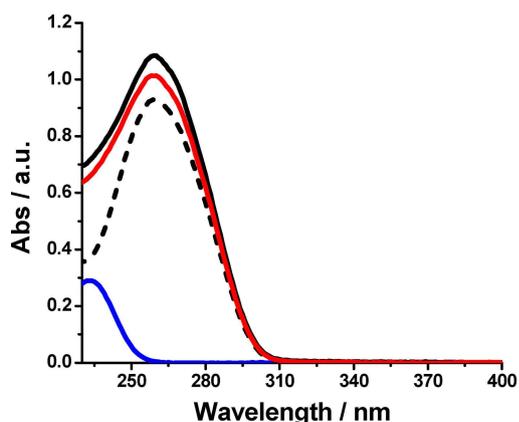


Fig. 4. UV-Vis absorption spectra, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5: (–) control $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, (–) control $50 \mu\text{M}$ MET, (–) 0 hours, immediately after the addition of $50 \mu\text{M}$ MET to the $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA solution, and (–) after 24 hours incubation of this solution.

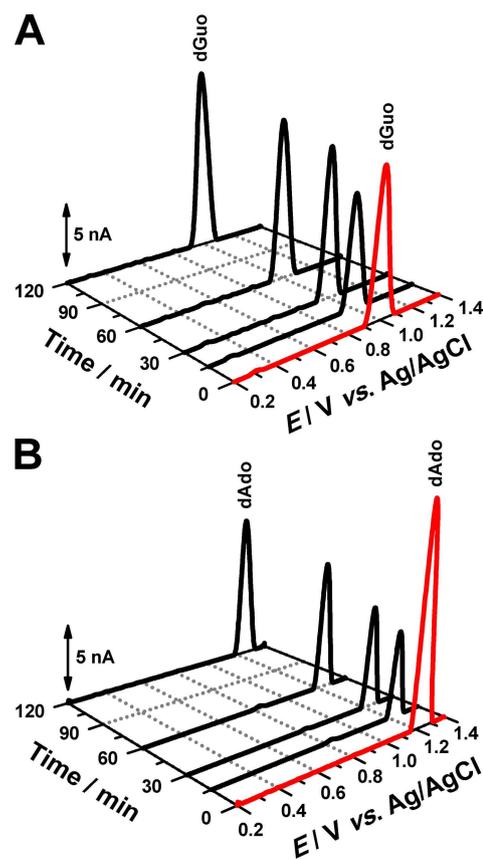


Fig. 5. DP voltammograms baseline-corrected, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5: (A) poly[G]- and (B) poly[A]-electrochemical biosensors, (–) control and (–) after incubation with $25 \mu\text{M}$ MET during different time periods: 15, 30, 60 and 120 minutes. Scan rate $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

damage, the MET–dsDNA interaction, in incubated solutions, was investigated.

The consequence of the MET–dsDNA interaction was electrochemically followed comparing the changes on the dsDNA oxidation peaks, dGuo and dAdo, in the absence and presence of MET, and monitoring the occurrence of free Gua and free Ade oxidation peaks and Gua and/or Ade oxidation products, 8-oxoGua [54] and 2,8-oxoAde [55], respectively.

The electrochemical MET–dsDNA interaction in incubated solutions, containing $25 \mu\text{M}$ MET and $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, in 0.1 M acetate buffer solution pH 4.5, using a GCE, was performed, Figure 3A (–). The DP voltammogram obtained after the addition of MET to the dsDNA solution showed immediately a decrease in current for both anodic peaks, of dGuo, at $E_{\text{pa}} = +0.98 \text{ V}$, and dAdo, at $E_{\text{pa}} = +1.25 \text{ V}$, when compared with the control dsDNA solution, Figure 3A (–). The effect of MET–dsDNA interaction in solution over time to better understand the interaction mechanism was investigated.

DP voltammograms in incubated solutions containing $25 \mu\text{M}$ MET and $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5, after different incubation periods of 15, 30,

60 and 120 minutes, were obtained, Figure 3A (-). After each measurement, the GCE surface was cleaned following the cleaning and conditioning procedure, according to Section 2.2, to remove all oxidation products adsorbed at the electrode surface.

After 15 minutes incubation time, both the dsDNA oxidation peak currents continued to decrease, Figure 3A (-). This behaviour corresponds to a conformational change in the dsDNA structure morphology caused the MET-dsDNA interaction [54-56]. The decrease in the dsDNA oxidation peak currents is explained in consequence of the binding of MET to the dsDNA. Previous studies have reported the binding of MET in the minor grooves of the double strand DNA [57].

Therefore, the MET-dsDNA interaction causes the formation of a condensed more compact dsDNA structure, in which the purine bases are embedded in side, less exposed and available to be oxidized on the GCE surface, making more difficult their oxidation, and causing the dGuo and dAdo oxidation peak currents decrease [57-60].

Increasing the incubation times to 30, 60 and 120 minutes a progressive increase of both dGuo and dAdo oxidation peak currents took place.

This shows that, for longer incubation times, the MET-dsDNA complex morphological structure was stabilised, causing a local distortion and/or unwinding of dsDNA conformation caused by the MET-dsDNA interaction, which facilitates the oxidation of dGuo and dAdo residues, since they are more exposed to the GCE surface.

Higher incubation times were investigated and no significant changes in the currents of the dsDNA oxidation peaks and/or appearance of new peaks after 120 minutes were observed.

Nevertheless, during the electrochemical investigation of the MET-dsDNA interaction in incubated solutions, an incomplete network film of co-adsorbed free molecules of dsDNA and MET, and the MET-dsDNA complex, on the GCE surface, may be formed.

In all DP voltammograms of MET-dsDNA incubated solutions, Figure 3A (-), no oxidation peak related to the presence of 8-oxoGua or 2,8-oxoAde, the DNA oxidative damage biomarkers, at $E_{pa} = +0.45$ V [54,55], was detected.

3.2.2 UV-Vis Spectrophotometry of MET-dsDNA Interaction in Incubated Solutions

The possible conformational changes in the dsDNA structure promoted by the antidiabetic drug MET-dsDNA interaction were also evaluated by UV-Vis spectrophotometry in incubated solutions, Section 2.6.3, Figure 4.

The differences in the absorption spectra of dsDNA were monitored in the absence and presence of MET in order to determine the influence of MET interaction on the dsDNA conformation and morphology.

Absorption spectra in the UV-Vis region for control solutions of 50 μ M MET and 50 μ g mL⁻¹ dsDNA, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5, followed by spectra immediately after the addition of 50 μ M MET to the solution containing 50 μ g mL⁻¹ dsDNA, and after 24 hours of incubation of this solution, were recorded, Figure 4. Also, UV-Vis spectra for the same incubation times were recorded for the control solutions of MET and dsDNA.

The control spectra obtained in the range from 400 to 230 nm, for 50 μ g mL⁻¹ dsDNA, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5, Figure 4 (-), showed one absorption band, $\lambda_{max} = 260$ nm, corresponding to the $\pi \rightarrow \pi^*$ transitions from the heterocyclic rings of the nucleotides. The control spectra for 50 μ M MET in the same conditions, Figure 4 (-), showed one absorption band, $\lambda_{max} = 230$ nm, corresponding to the $n \rightarrow \pi^*$ transitions from the MET chromophore group.

The UV-Vis absorption spectra obtained immediately after the addition of 50 μ M MET to the solution of 50 μ g mL⁻¹ dsDNA showed an absorption band, $\lambda_{max} = 260$ nm, with a decrease in the absorption intensity, which corroborates the fact that initially the MET molecules bind to the dsDNA due to the strong MET-dsDNA interaction.

Finally, the UV-Vis absorption spectra obtained after the incubation of 50 μ M MET with 50 μ g mL⁻¹ dsDNA for 24 hours presented the same absorption band, $\lambda_{max} = 260$ nm, with an increase of absorption intensity, which is in agreement with a small distortion and/or unwinding due to a greater conformational modification of the MET-dsDNA complex according to the interaction time.

3.2.3 In Situ Interaction of MET with dsDNA-electrochemical Biosensor

The multilayer dsDNA-electrochemical biosensor prepared completely covers the GCE surface, the undesired non-specific adsorption of free molecules of dsDNA and MET, and the MET-dsDNA complex, on the GCE surface is avoided, resulting in a signal due exclusively from the dsDNA-electrochemical biosensor after the MET-dsDNA interaction.

The multilayer dsDNA-electrochemical biosensor was used to investigate, *in situ* and in real time, the changes that occurred to the dsDNA immobilized on the GCE surface during the MET-dsDNA interaction, following the changes in the purine bases oxidation peak currents of the dsDNA-electrochemical biosensor, recorded after different incubation times, and compared with the results, obtained in the same experimental conditions, using a control dsDNA-electrochemical biosensor.

The DP voltammogram for the control dsDNA-electrochemical biosensor showed, as expected, both dGuo, at $E_{pa} = +0.99$ V, and dAdo, at $E_{pa} = +1.26$ V, oxidation peaks, Figure 3B (-).

Control experiments incubating the dsDNA-electrochemical biosensor, in 0.1 M acetate buffer solution pH 4.5, during the same time periods and in similar

conditions, as mentioned in the *Section 2.6.2*, were performed, and no changes in the oxidation peaks currents of dGuo and dAdo were observed. Guanine and adenine oxidation signals were never observed in all DP voltammograms. The cleaning procedure of the GCE, described in *Section 2.2*, and the preparation procedure of the dsDNA-electrochemical biosensor, described in *Section 2.6.2*, provided very reproducible results.

A new dsDNA-electrochemical biosensor was always prepared for each experiment and incubated in 25 μM MET, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5, *Section 2.6.2*, during the different time periods, 15, 30, 60 and 120 minutes. After each interaction time, the dsDNA-electrochemical biosensor was washed with deionised water to remove the unbound MET, dried under $\text{N}_{2(\text{g})}$ atmosphere, and transferred to the electrochemical cell with 0.1 M acetate buffer pH 4.5, where the DP voltammograms were obtained, Figure 3B (-).

More concentrated solutions of MET were evaluated, but to understand and visualize better the effect of the MET–dsDNA interaction over time, and compare taking into account the dsDNA signal, the concentration of 25 μM MET was chosen and presented very good results.

The DP voltammogram for a new dsDNA-electrochemical biosensor incubated in the MET solution for 15 minutes, Figure 3B (-), showed a large decrease in dGuo and dAdo purine bases residues, in the polynucleotide chain, oxidation peak currents, due to the MET–dsDNA *in situ* interaction. The result using the dsDNA-electrochemical biosensor was similar to that obtained with the MET–dsDNA interaction in incubated solutions for 0 and 15 minutes, Figure 3A (-).

The large current decrease of the dsDNA oxidation peaks is due to a strong binding of MET in the minor grooves of the DNA double helix. The purine bases oxidation becomes more difficult as the bases are embedded within a more rigid structure, prevented from interacting with the electrode surface, which leads to the decrease of the electrochemical currents at that early stage.

New dsDNA-electrochemical biosensors were incubated for longer periods of time, 30, 60 and 120 minutes, Figure 3B (-). The dsDNA-electrochemical biosensor incubated for 30 minutes in MET showed a significant increase for both the dsDNA oxidation peak currents. However, the dGuo oxidation peak current, for 60 and 120 minutes, remained similar to the current obtained for the dsDNA-electrochemical biosensor incubated for 30 minutes. Whereas, the dAdo oxidation peak current, for 30, 60 and 120 minutes, presented a progressive increase.

The increase in the dGuo and dAdo oxidation peak currents, with the incubation times, is in agreement with the results obtained for the same incubation times for the MET–dsDNA interaction in incubated solutions, Figure 3A (-), attributed to stabilisation of the MET–dsDNA complex morphological structure, causing a local distortion and/or unwinding for longer incubation

times. Likewise MET did not induce oxidative damage to dsDNA, under the experimental conditions used, since no peak corresponding to the DNA biomarkers 8-oxoGua and 2,8-oxoAde oxidation was electrochemically detected.

3.2.4 *In Situ Interaction of MET with poly[G]- and poly[A]-electrochemical Biosensors*

In order to clarify with which purine base, Gua or Ade, a more specific and preferential MET–dsDNA interaction occurred, the homopolynucleotides, poly[G] and poly[A], were used to prepare poly[G]- and poly[A]-electrochemical biosensors, *Section 2.3.2*, Figure 5.

The DP voltammogram of the control poly[G]-electrochemical biosensor, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5, showed one peak, at $E_{\text{pa}} = +0.99$ V, corresponding to dGuo oxidation, Figure 5A (-). A new poly[G]-electrochemical biosensor was incubated in 25 μM MET during 15 minutes, dried under $\text{N}_{2(\text{g})}$ atmosphere, and then transferred to 0.1 M acetate buffer pH 4.5, where DP voltammetry was performed. The DP voltammogram obtained with this poly[G]-electrochemical biosensor, Figure 5A (-), showed a decrease in the dGuo oxidation peak current, similar to that observed for the dGuo oxidation peak of the dsDNA-electrochemical biosensor. After longer incubation times, 30, 60 and 120 minutes, the DP voltammograms showed a progressive increase with time of the dGuo oxidation peak current.

In all DP voltammograms of poly[G]-electrochemical biosensors incubated in 25 μM MET, Figure 5A (-), no oxidation peak related to the release of Gua and/or presence of the DNA oxidative damage biomarker 8-oxoGua, at $E_{\text{pa}} = +0.45$ V [54], was observed, indicating that poly[G] oxidative damage did not occur in these experimental conditions.

The DP voltammogram of the poly[A]-electrochemical biosensor, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5, Figure 5B (-), before the incubation with MET, showed one peak, at $E_{\text{pa}} = +1.25$ V, corresponding to dAdo oxidation. Using new poly[A]-electrochemical biosensors, incubations in 25 μM MET during 15, 30, 60 and 120 minutes were carried out, after these biosensors were dried under $\text{N}_{2(\text{g})}$ atmosphere, and then transferred to the electrochemical cells with 0.1 M acetate buffer pH 4.5 where DP voltammograms were recorded.

The DP voltammogram obtained for the poly[A]-electrochemical biosensor incubated with MET for 15 minutes, Figure 5B (-), showed a significant decrease followed by a progressive increase, of dAdo oxidation peak of current, for longer periods of time, due to a possible preferential interaction between MET and the adenine hydrogen atoms in the A–T base pair. No peaks corresponding to release of Ade and/or the DNA oxidative damage biomarker 2,8-oxoAde, at $E_{\text{pa}} = +0.45$ V [55], were observed, indicating that no poly[A] oxidative damage occurred.

The experiments using poly[G]- and poly[A]-electrochemical biosensors also show new important comple-

mentary information to clarify and better understand the molecular mechanism involved in the MET–dsDNA interaction.

At pH 4.5, poly[G] presents a mixture of single-, double-stranded and G-quadruplex configurations, while poly[A] presents a mixture of single- and double-stranded configurations, due to partially protonated Ade residues that are able to form $AH^+ - AH^+$ double bonds [61].

The experiments using poly[G]- and poly[A]-electrochemical biosensors confirmed, for shorter incubation times, Figure 5 (–) 15 minutes, the MET binding to the minor grooves of the poly[G] and poly[A] single- and double-helices, which hidden the Gua and Ade residues and cause a sharp decrease of the dGuo and dAdo oxidation peak currents, when compared with the control, Figure 5 (–). Then, after longer incubation times, 30, 60 and 120 minutes, Figure 5 (–), the rigid MET–poly[G] and MET–poly[A] complex structures were stabilised, causing a local distortion and/or unwinding of the poly[G]- and poly[A] secondary structures, which is reflected in the slight increase of the dGuo and dAdo oxidation peak currents, due to greater exposure of the purine bases to the electrode surface.

Finally, the MET–dsDNA interaction mechanism can be described in two consecutive steps: the first, for shorter times, by the binding of MET molecules in the minor grooves of the dsDNA, followed by the stabilization of the MET–dsDNA complex, which causes a local distortion and/or unwinding of the dsDNA morphological structure. This rigid MET–dsDNA complex showed a possible preferential interaction between MET and adenine hydrogen atoms in the A–T base pair, in the MET molecules binding with dsDNA. Nevertheless, no oxidation peak of 8-oxoGua and/or 2,8-oxoAde was detected, meaning that MET did not cause oxidative dsDNA damage.

4 Conclusion

Considering that MET is widely prescribed around the world, and one of the most abundant therapeutic drugs with by-products detected in wastewater treatment plants, deposited into the aquatic environment by mass, more research on its potential biological and environmental impact, should be undertaken.

The electrochemical oxidation of MET–Cu(II) complex, at CB–DHP/GCE, by DP and SW voltammetry, in a wide pH range, was studied. The MET–Cu(II) complex oxidation showed one irreversible pH-dependent process, which leads to the formation of a reversible oxidation product, oxidized at lower potential, and a mechanism was described. The electroanalytical quantification of MET in wastewater samples, by DP voltammetry, at CB–DPH/GCE, was also performed.

The MET–dsDNA interaction was investigated in incubated solutions and using dsDNA-, poly[G]- and poly[A]-electrochemical biosensors and showed the occurrence of dsDNA conformational changes. The

MET–dsDNA interaction mechanism occurs by the binding of MET in the minor grooves of the DNA strands, followed by the local distortion and/or unwinding of the MET–dsDNA complex conformation but not causing dsDNA oxidative damage.

Acknowledgements

Financial support from Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), project UID/EMS/00285/2013 (cofinanced by the European Community Fund FEDER), FEDER funds through the program COMPET – Programa Operacional Factores de Competitividade, SU-DOE project Innovec'EAU (SOE1/P1/F0173), and PhD Grant 232296/2014-6 (W.B.S. Machini) from CNPq/Brazil, are gratefully acknowledged.

References

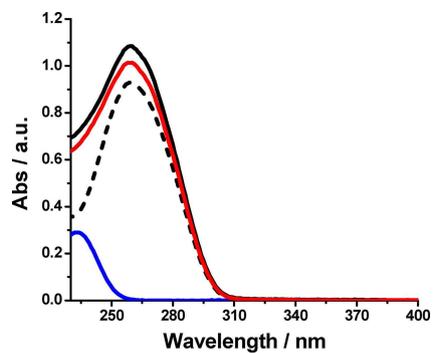
- [1] American Diabetes Association, *Diabetes care* **2009**, *32*, 62–67.
- [2] A. E. Kunst, K. Stronks, C. Agyemang, in *Migration and health in the European Union* (Eds.: B. Rechel, P. Mladovsky, W. Devillé, B. Rijks, R. Petrova-Benedict, M. McKee), Open University Press, Glasgow, **2011**, pp. 101–120.
- [3] World Health Organization, **2016**.
- [4] M. A. Atkinson, G. S. Eisenbarth, *Lancet* **2001**, *358*, 221–229.
- [5] C. R. Thomas, S. L. Turner, W. H. Jefferson, C. J. Bailey, *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *56*, 1145–1150.
- [6] S. Alusik, Z. Paluch, *Minerva Med.* **2015**, *106*, 233–238.
- [7] Y. W. Wang, S. J. He, X. Feng, J. Cheng, Y. T. Luo, L. Tian, Q. Huang, *Drug Des. Dev. Ther.* **2017**, *11*, 2421–2429.
- [8] S. Matthaei, H. Greten, *Diabetes Metab.* **1991**, *17*, 150–158.
- [9] S. Gandini, M. Puntoni, B. M. Heckman-Stoddard, B. K. Dunn, L. Ford, A. DeCensi, E. Szabo, *Cancer Prev. Res. (Phila)* **2014**, *7*, 867–885.
- [10] C. A. Bannister, S. E. Holden, S. Jenkins-Jones, C. L. Morgan, J. P. Halcox, G. Scherthaner, J. Mukherjee, C. J. Currie, *Diabetes Obes. Metab.* **2014**, *16*, 1165–1173.
- [11] J. Hong, Y. Zhang, S. Lai, A. Lv, Q. Su, Y. Dong, Z. Zhou, W. Tang, J. Zhao, L. Cui, D. Zou, D. Wang, H. Li, C. Liu, G. Wu, J. Shen, D. Zhu, W. Wang, W. Shen, G. Ning, *Diabetes Care* **2013**, *36*, 1304–1311.
- [12] C. Cheng, C. H. Lin, Y. W. Tsai, C. J. Tsai, P. H. Chou, T. H. Lan, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2014**, *69*, 1299–1305.
- [13] R. Patel, G. Shah, *Curr. Med. Res. Opin.* **2017**, *33*, 1545–1557.
- [14] N. J. Niemuth, R. D. Klaper, *Chemosphere* **2015**, *135*, 38–45.
- [15] UKPDS Group, *Lancet* **1998**, *352*, 854–865.
- [16] J. M. Calatayud, P. C. Falco, M. C. P. Marti, *Anal. Lett.* **1985**, *18*, 1381–1390.
- [17] E. Uçaktürk, *Anal. Methods-Uk* **2013**, *5*, 4723–4730.
- [18] C. Goedecke, I. Fettig, C. Piechotta, R. Philippa, S. U. Geissenc, *Anal. Methods-Uk* **2017**, *9*, 1580–1584.
- [19] H. P. Chhetri, P. Thapa, A. Van Schepdael, *Saudi Pharm. J.* **2014**, *22*, 483–487.
- [20] M. A. Marques, S. S. Ade, O. W. Pinto, P. T. Barroso, D. P. Pinto, M. Ferreira-Filho, E. Werneck-Barroso, *J. Chromatogr. B* **2007**, *852*, 308–316.
- [21] Hamdan II, A. K. Jaber, A. M. Abushoffa, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *53*, 1254–1257.

- [22] J. Narang, N. Malhotra, C. Singhal, R. Bhatia, V. Kathuria, M. Jain, *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2017**, *40*, 537–548.
- [23] N. Sattarahmady, H. Heli, F. Faramarzi, *Talanta* **2010**, *82*, 1126–1135.
- [24] S. Dehdashtiana, M. B. Gholivandb, M. Shamsipur, Z. Karimica, *Sens. Actuators B Chem.* **2015**, *221*, 807–815.
- [25] H. M. Lotfy, D. Mohamed, S. Mowaka, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2015**, *149*, 441–451.
- [26] I. H. Habib, M. S. Kamel, *Talanta* **2003**, *60*, 185–190.
- [27] H. Gadape, K. Parikh, *E-J. Chem.* **2011**, *8*, 767–781.
- [28] S. Y. Feng, E. P. Lai, E. Dabek-Zlotorzynska, S. Sadeghi, *J. Chromatogr. A* **2004**, *1027*, 155–160.
- [29] I. B. Santarino, S. C. B. Oliveira, A. M. Oliveira-Brett, *Electroanalysis* **2014**, *26*, 1304–1311.
- [30] A. D. R. Pontinha, H. E. Satana, V. C. Diculescu, A. M. Oliveira-Brett, *Electroanalysis* **2011**, *23*, 2651–2657.
- [31] V. C. Diculescu, A. M. Oliveira-Brett, *Bioelectrochemistry* **2016**, *107*, 50–57.
- [32] L. I. Tome, N. V. Marques, V. C. Diculescu, A. M. Oliveira-Brett, *Anal. Chim. Acta* **2015**, *898*, 28–33.
- [33] R. M. Buoro, I. C. Lopes, V. C. Diculescu, S. H. P. Serrano, L. Lemos, A. M. Oliveira-Brett, *Bioelectrochemistry* **2014**, *99*, 40–45.
- [34] H. E. Satana, A. D. Pontinha, V. C. Diculescu, A. M. Oliveira-Brett, *Bioelectrochemistry* **2012**, *87*, 3–8.
- [35] W. B. S. Machini, A. M. Oliveira-Brett, *Electroanalysis* **2018**, *30*, 48–56.
- [36] A. Hájková, J. Barek, V. Vyskočil, *Electroanalysis* **2015**, *27*, 101–110.
- [37] V. C. Diculescu, A. M. Chiorcea-Paquim, A. M. Oliveira-Brett, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, *79*, 23–36.
- [38] M. Fojta, A. Daňhel, L. Havran, V. Vyskočil, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, *79*, 160–167.
- [39] D. D. Perrin, B. Dempsey in *Buffers for pH and metal ion control*, Chapman and Hall, London, **1974**, pp. 123–166.
- [40] T. A. Silva, F. C. Moraes, B. C. Janegitz, O. Fatibello-Filho, *J. Nanomater.* **2017**, 1–14.
- [41] P. B. Deroco, R. C. Rocha-Filho, O. Fatibello-Filho, *Talanta* **2018**, *179*, 115–123.
- [42] L. Yongming, L. Guizhi, *Chin. J. Anal. Chem.* **2001**, *29*, 1027–1029.
- [43] M. Hadi, H. Poorgholi, H. Mostaanzadeh, *S. Afr. J. Chem.* **2016**, *69*, 132–139.
- [44] X. J. Tian, J. F. Song, X. J. Luan, Y. Y. Wang, Q. Z. Shi, *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386*, 2081–2086.
- [45] S. Dehdashtian, M. B. Gholivand, S. Mojtaba, K. Ziba, *Sens. Actuators B Chem.* **2015**, *221*, 807–815.
- [46] X. J. Tian, J. F. Song, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *44*, 1192–1196.
- [47] C. M. A. Brett, A. M. Oliveira-Brett in *Electrochemistry: principles, methods, and applications*, Oxford University Press, Oxford, **1993**.
- [48] M. B. Gholivand, L. Mohammadi-Behzad, *Anal. Biochem.* **2013**, *438*, 53–60.
- [49] S. S. M. Hassan, W. H. Mahmoud, M. A. F. Elmosallamy, A. H. M. Othman, *Anal. Chim. Acta* **1999**, *378*, 299–311.
- [50] R. I. El-Bagary, E. F. Elkady, B. M. Ayoub, *Int. J. Biomed. Sci.* **2011**, *7*, 62–69.
- [51] E. Khaled, M. S. Kamel, H. N. A. Hassan, H. Y. Aboul-Enain, *J. Electroanal. Chem.* **2011**, *661*, 239–244.
- [52] L. M. Blanco-Jerez, U. M. García-Pérez, P. Zambrano-Robledo, J. Hernández-Moreira, *Int. J. Electrochem. Sci.* **2014**, *9*, 4643–4652.
- [53] M. S. Arayne, N. Sultana, M. H. Zuberi, F. A. Siddiqui, *Indian J. Pharm. Sci.* **2009**, *79*, 1368–1371.
- [54] A. M. Oliveira-Brett, J. A. P. Piedade, S. H. P. Serrano, *Electroanalysis* **2000**, *12*, 969–973.
- [55] V. C. Diculescu, J. A. Piedade, A. M. Oliveira-Brett, *Bioelectrochemistry* **2007**, *70*, 141–146.
- [56] S. C. Oliveira, A. M. Oliveira-Brett, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2010**, *13*, 628–640.
- [57] N. Shahabadi, L. Heidari, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2012**, *97*, 406–410.
- [58] S. C. Oliveira, A. M. Chiorcea-Paquim, S. M. Ribeiro, A. T. Melo, M. Vivan, A. M. Oliveira-Brett, *Bioelectrochemistry* **2009**, *76*, 201–207.
- [59] I. C. Lopes, A. M. Oliveira-Brett, *Electroanalysis* **2017**, *29*, 1674–1682.
- [60] A. M. Oliveira-Brett, V. C. Diculescu, *Bioelectrochemistry* **2004**, *64*, 143–150.
- [61] A. M. Chiorcea-Paquim, P. V. Santos, A. M. Oliveira-Brett, *Electrochim. Acta* **2013**, *110*, 599–607.

Received: March 8, 2019

Accepted: June 17, 2019

Published online on ■■■, ■■■



*W. B. S. Machini, I. P. G. Fernandes, A. M. Oliveira-Brett**

1 – 12

Antidiabetic Drug Metformin Oxidation and *In Situ* Interaction With dsDNA Using a dsDNA-electrochemical Biosensor

Accepted Manuscript

Nivolumab anticancer monoclonal antibody native and denatured direct electrochemistry at a glassy carbon electrode

Wesley B.S. Machini, Nuno V. Marques, Ana Maria Oliveira-Brett



PII: S1572-6657(19)30519-3
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.113251>
Article Number: 113251
Reference: JEAC 113251
To appear in: *Journal of Electroanalytical Chemistry*
Received date: 15 February 2019
Revised date: 17 June 2019
Accepted date: 19 June 2019

Please cite this article as: W.B.S. Machini, N.V. Marques and A.M. Oliveira-Brett, Nivolumab anticancer monoclonal antibody native and denatured direct electrochemistry at a glassy carbon electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.113251>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

**Nivolumab Anticancer Monoclonal Antibody Native
and Denatured Direct Electrochemistry at a
Glassy Carbon Electrode**

Wesley B. S. Machini ¹, Nuno V. Marques ², and Ana Maria Oliveira-Brett ^{1,*}

¹ Chemistry Department, Faculty of Sciences and Technology, University of Coimbra,
3004-535, Coimbra, Portugal

² Serviços Farmacêuticos, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, EPE,
3000-075, Coimbra, Portugal

* To whom correspondence should be addressed:

Ana Maria Oliveira-Brett
Department of Chemistry,
University of Coimbra,
3004-535 Coimbra,
Portugal
Tel/FAX: +351-239-854487
e-mail: brett@ci.uc.pt

Abstract

Nivolumab (NIVO) is a recombinant humanized monoclonal antibody used in the immunotherapeutic treatment of cancer. The electrochemical oxidation of native NIVO, in solution and adsorbed on a glassy carbon electrode, using differential pulse voltammetry, showed two pH-dependent oxidation peaks, the first one corresponding to the cysteine amino acid residues, and the second one corresponding to the tyrosine and tryptophan amino acid residues. The interfacial behaviour and adsorption of native and denatured NIVO thick multilayer film adsorbed on glassy carbon electrode surface was probed by cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. The denaturation of a NIVO thick multilayer film adsorbed on a glassy carbon electrode surface, with chemical agents: denaturing agents urea and sodium dodecyl sulphate, and reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol, was investigated electrochemically. The unfolded denatured adsorbed NIVO morphological structure, enhanced the exposure of more electroactive amino acid residues to the electrode surface, and a new additional peak, due to the tryptophan, methionine, and histidine amino acid residues oxidation, was found.

Keywords: Nivolumab, anticancer, monoclonal antibody, electrochemical oxidation, denaturing agents, glassy carbon electrode.

1. Introduction

Cancer is a name given for a large group of diseases characterized by the disordered growth of abnormal cells that can invade the tissues and organs, and/or spread (metastasize) to other regions of the body. Almost any part of the body can be affected by cancer, which has many anatomic and molecular subtypes that each requires specific treatment strategies. According to the World Health Organization (WHO), cancer is the second leading cause of death globally and was responsible for more than 9 million deaths in 2016 [1].

There are many types of cancer treatment and each treatment depends on the type of cancer and how advanced it is. Cancer treatment may be single or in combination, such as surgery with chemotherapy and/or radiation therapy. Also, immunotherapy, targeted therapy, or hormone therapy are options to treat several types of cancer.

The most successful strategy in the present treatment of cancer, that attracts great attention due to their more specific, more effective therapeutic and less toxic properties, is immunotherapy based on the use monoclonal antibodies (mAbs). The monoclonal antibodies are made from a single B-lymphocyte clone and have monovalent affinity once they bind to the same epitope of the antigen [2].

One of these monoclonal antibodies is the genetically engineered, fully human immunoglobulin G4 (IgG4) kappa monoclonal antibody, nivolumab (NIVO, trade name OPDIVO®), **Scheme 1**. NIVO targets in the cancer cell the programmed death-1 (PD-1) receptor, binds to PD-1 with high affinity, and blocks the interaction between PD-1 and its ligands, PD-L1 and PD-L2 [3]. NIVO is an intravenous drug firstly approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) in 2014 for the treatment of metastatic melanoma, followed by the approval for the treatment of non-small-cell lung cancer, renal cell carcinoma, and more recently, Hodgkin lymphoma [4-6].

NIVO is produced in Chinese hamster ovary cells by bioreactor fermentation of a recombinant cell line. Its chemical structure consists of two identical heavy chains with 440 amino acids each, and two identical kappa light chains with 214 amino acids each, which are linked through inter-chain disulphide bonds, and NIVO molecular mass is 146 kDa [4].

The primary structure of the monoclonal antibody NIVO [9], with the total of 1737 amino acids, have 20 different amino acid residues, of which only 140 amino acids are electroactive: tyrosine (Tyr, 54), tryptophan (Trp, 24), cysteine (Cys, 32), histidine (His, 20) and methionine (Met, 10), **Scheme 2**. The five electrochemical electroactive amino acids mechanisms [10-14], at different types of electrochemical transducers, mainly in carbon electrodes, has been investigated.

Tyrosine oxidation at a glassy carbon electrode, in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0, occurs in one irreversible step at the hydroxyl group, $E = +0.65$ V [10, 11]. Tryptophan oxidation occurs in two irreversible steps, $E_1 = +0.65$ V and $E_2 = +1.05$ V, being the first one at the pyrrole ring and the second one at the benzene moiety [11, 12]. Cysteine oxidation occurs in three steps, $E_1 = +0.52$ V, $E_2 = +0.88$ V, and $E_3 = +1.27$ V, the first step involves the oxidation of the sulfhydryl group and formation of a radical, which undergoes a nucleophilic attack, resulting in an intermediate, that is oxidized in the second step to cysteic acid; the oxidation of the sulfhydryl group can also form a disulfide bridge between two cysteine moieties forming cystine, which is oxidized to cysteic acid, at a third step [13, 14]. Methionine oxidation occurs in two steps, at $E_1 = +1.12$ V, forming methionine sulfoxide, and at $E_2 = +1.35$ V, forming methionine sulfone, involving the adsorption and the protonation/deprotonation of the thiol group [13, 14]. Histidine oxidation occurs in a single step, $E = +1.15$ V, at a slight higher positive potential than the other electroactive amino acids in the same experimental conditions [11].

Although the monoclonal antibodies are a successful strategy, cancer cells are constantly mutating, which often leads to resistance or complete lack of responsiveness to the targeted therapy [15]. Thus, more studies are needed, either for the development of new monoclonal antibodies, for qualitative and quantitative analysis in proteomics of individual protein domains and mutants of proteins, and for a better understanding of their mechanisms of action.

The direct electrochemistry of native and denatured proteins on solid surfaces using voltammetric methods is very important since it can elucidate the electron transfer mechanism in a biological system and enable the development of electrochemical biosensors in different fields, such as biotechnology and environmental monitoring [16].

Considering the constant discovery and development of new monoclonal antibodies, as well as the potential of electrochemical techniques for a better understanding of the mechanisms of action and oxidation, the electrochemical study of NIVO is very important and timely, since it is an immunotherapeutic relatively new drug that has been increasingly used in the treatment of different types of cancer.

The objective of this work was to investigate for the first time the direct electrochemical oxidation behaviour of native and denatured NIVO at a glassy carbon electrode (GCE). With that aim, using differential pulse (DP) voltammetry three approaches were investigated: (i) native NIVO in solution, (ii) a native NIVO thick multilayer film adsorbed on GCE, and (iii) a denatured NIVO thick multilayer film adsorbed on GCE. The denaturing agents, urea and sodium dodecyl sulphate, and the reducing agents, tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol, were used. In order to characterize the interfacial behaviour and adsorption of the native and denatured NIVO thick multilayer film on a GCE surface, cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy experiments were carried out.

2. Experimental

2.1 Materials and Reagents

The nivolumab (NIVO) sample was OPDIVO[®] 40 mg/4 mL concentrate for solution for infusion from Bristol-Myers Squibb Farmacêutica Portuguesa, SA. Potassium hexacyanoferrate(II) ($K_4[Fe(CN)_6]$) (P4066, purity 99.98%), potassium hexacyanoferrate(III) ($K_3[Fe(CN)_6]$) (P8131, purity ~ 99%) and the denaturing agents, urea (U5378, for molecular biology), sodium dodecyl sulfate (SDS) (L3771, purity $\geq 98.5\%$), DL-dithiothreitol (DTT) (D0632, purity 98%), and tris(5-carboxyethyl)phosphine (TCEP) (C4706, purity $\geq 98\%$), were obtained from Sigma-Aldrich, Spain, and used without further purification.

Nivolumab is formulated for intravenous (IV) administration as a sterile, preservative-free, non-pyrogenic product in sodium citrate dehydrate, sodium chloride, mannitol, pentetic acid, polysorbate 80, sodium hydroxide (for pH adjustment), hydrochloric acid (for pH adjustment) and water for injections. After reconstitution in pH 6.5, a stock solution of 10 mg mL⁻¹ NIVO was obtained and stored at 4° C. The 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ stock solutions were daily prepared in 0.1 M acetate buffer pH 6.0. Stock solutions of 6 M urea, 0.1 M SDS, and 0.1 M DTT, were prepared in deionised water, and of 0.1 M TCEP in 0.1 M acetate buffer pH 5.4.

The supporting electrolyte solutions, with ionic strength $I = 0.1$ M, of different pH composition: pH 2.0 (KCl + HCl), pH 3.0, 3.5, 4.5, 5.4 and 6.0 (HOAc + NaOAc), pH 6.9 and 7.9 ($Na_2HPO_4 + NaH_2PO_4$), and pH 9.0 ($Na_2B_4O_7 + NaOH$), using analytical grade reagents, and purified water from a Millipore Milli-Q system (conductivity $\leq 0.1 \mu S cm^{-1}$), were prepared [17].

The pH measurements were carried out with a Crison micropH 2001 pH-meter with an Ingold combined glass electrode. Microvolumes were measured using P20, P200 and P1000 microliter pipettes (Gilson S. A., Villiers-le-Bel, France).

All experiments were performed at room temperature, $T = 298 \text{ K}$ ($25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$).

2.2 Voltammetric Parameters and Electrochemical Cells

Voltammetric experiments were carried out using a μ Autolab, running with GPES 4.9 software, Metrohm/Autolab, The Netherlands. The measurements were carried out using a three-electrode system in a 2 mL one compartment electrochemical cell (eDAQ Europe). Measurements were carried out using a working glassy carbon electrode (GCE) ($d = 1.0 \text{ mm}$), a Pt wire counter electrode, and an Ag/AgCl (3 M KCl) reference electrode.

The GCE was the working electrode chosen to perform the experiments since the proteins tend to adsorb strongly at carbon electrodes without need for covalent binding of the protein to the surface. Also due to the GCE extensive potential window in the positive direction, which allows a sensitive detection of all electroactive amino acid residues, not possible when using gold or platinum electrodes that form oxides at $\sim +0.8 \text{ V}$.

The experimental conditions for cyclic voltammetry (CV) were: different scan rates with a potential increment 2 mV. For differential pulse (DP) voltammetry, pulse amplitude 50 mV, pulse width 70 ms, interval time 0.4 s, step potential 2 mV, and scan rate 5 mV s^{-1} , were used.

The electrochemical impedance spectroscopy (EIS) measurements were carried out using an IVIUM potentiostat in combination with IviumSoft program version 2.219 (Ivium Technologies, Eindhoven, The Netherlands). A sinusoidal perturbation of root-mean-square (r.m.s.) amplitude 10 mV was applied over the frequency range 60 kHz to 0.1 Hz with seven frequency values per decade. The impedance spectra were analysed by fitting to a Randles-

type equivalent electrical circuit using ZView software (Scribner Associates, USA). The EIS measurements, obtained from CV experiments, in 0.1 M acetate buffer pH 6.0, and for different concentrations of $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$, at the hexacyanoferrate(III)/(II) midpoint potential, $E_{ap} = +0.25$ V, applied to the GCE, were obtained.

Prior to use, the GCE was always washed with ethanol and Milli-Q water, and the surface was mechanically polished using diamond spray (particle size 3 μm , Kemet, UK). After polishing, the electrode was thoroughly rinsed with Milli-Q water. The GCE, following this mechanical pre-treatment, was placed in the appropriate buffer supporting electrolyte, and 3 DP voltammograms, at a scan rate of 5 mV s^{-1} , between the potential limits of $E_1 = 0.0$ V and $E_2 = +1.4$ V, leading to a stable signal, were recorded. This procedure was performed before each electrochemical experiment and ensured very reproducible experimental results.

2.3 Electrochemical Procedures

The direct electrochemical oxidation behaviour of the native and denatured anticancer monoclonal antibody NIVO was investigated using three experimental procedures:

Procedure 1 – Electrochemical oxidation of native NIVO in Solution

Solutions of different NIVO concentrations, in 0.1 M buffer supporting electrolyte with $2.0 < \text{pH} < 9.0$, were prepared. The GCE was placed in the electrochemical cell, containing the NIVO solution, where the DP voltammetry was performed. All voltammograms were always recorded immediately after the immersion of the electrode into the electrochemical cell containing the sample solution.

Procedure 2 – Electrochemical oxidation of native NIVO thick multilayer film adsorbed on GCE

A thick multilayer film of native NIVO was adsorbed on the GCE surface, and using DP voltammetry, the native NIVO thick multilayer film adsorbed on GCE oxidation was investigated. The native NIVO thick multilayer film adsorbed on GCE was prepared depositing 3 times one drop of 5.0 μL of 5.0 mg mL^{-1} NIVO solution on the GCE surface, and after each drop was dried under a constant flux of $\text{N}_{2(\text{g})}$. The GCE with the native NIVO thick multilayer film of adsorbed was placed in the electrochemical cell, containing only the buffer supporting electrolyte, and allowed to hydrate for 5 minutes, and afterwards the DP voltammograms were recorded.

Procedure 3 – Electrochemical oxidation of denatured NIVO thick multilayer film adsorbed on a GCE

The oxidation of denatured NIVO thick multilayer film adsorbed on a GCE, by DP voltammetry, using the denatured NIVO thick multilayer adsorbed on GCE, was investigated. The NIVO thick multilayer film adsorbed on GCE was prepared, *Section 2.3.2. Procedure 2*, and incubated, in 0.1 M acetate buffer pH 6.0, during different time periods: 30, 60, 120 and 180 min, in the different denaturing agents: 6 M urea, 33.33 mM SDS, 10 mM DTT or 10 mM TCEP.

The denaturing agents and their concentration were chosen based on the protocols for electrophoretic procedures commonly applied to destabilize and unfold protein structures [18]. The most widely used denaturing agent is urea. Urea disrupts the tertiary structure of the peptide chain, breaking the hydrogen bonds and the salt bridges between positive and negative side chains, because of its high affinity for peptide bonds. However, urea only

disrupts the secondary and tertiary structure without affecting the primary structure. The SDS affects the protein structure, transforming the protein into a linear polypeptidic chain dissolving hydrophobic proteins, because it is a denaturing agent that disrupts noncovalent interactions by electrostatic repulsion. Whereas, DTT and TCEP will cleave the inter-chain disulphide bonds of cysteine and methionine amino acid residues in the protein.

After each incubation, the denatured NIVO thick multilayer film adsorbed on GCE was removed from the solution, washed with deionised water, in order to remove the excess of urea, SDS, DTT or TCEP, and placed in the electrochemical cell, containing only the supporting electrolyte 0.1 M acetate buffer pH 6.0, where DP voltammetry was performed.

To ensure that the recorded peaks are exclusively due to the denaturing or reductants effect on the NIVO structure, control DP voltammograms of the bare GCE incubated in each denaturing agent, in the same conditions and for the same periods of time, in 0.1 M acetate buffer supporting electrolyte pH 6.0, were registered.

Also, a control native NIVO thick multilayer film adsorbed on GCE, *Procedure 2*, was incubated, in 0.1 acetate buffer pH 6.0, for the same periods of time, and the DP voltammograms were recorded.

2.4. Acquisition and presentation of data

All the DP voltammograms presented, using the moving average, with a step window of 5 mV included in GPES version 4.9 software, were background-subtracted and baseline-corrected. This mathematical treatment improved the visualization and identification of peaks over the baseline without introducing any artefact, although the peak height is in some cases reduced (<10%) relative to that of the untreated curve. This mathematical treatment of the original voltammograms was used in the presentation of all experimental 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.

The NIVO hydrophilicity plots [19], sequence DB09035 provided by the DrugBank database [9], were obtained using the online tool ProtScale [20], from ExPASy-Bioinformatic Resource Portal [21], with a window size of 9 amino acids. The NIVO monoclonal antibody structure was obtained using the Protein Workshop 4.2.0 [22] software, from Protein Data Bank RCSB PDB [7, 8, 23].

3. Results

3.1. Electrochemical oxidation of native NIVO in solution

The electrochemical oxidation of native NIVO, at GCE, using DP voltammetry, in NIVO solutions of different concentrations, was investigated first.

The DP voltammogram obtained for 1.0 mg mL^{-1} NIVO, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5, showed two oxidation peaks, **Figure 1**. The first peak corresponds to the cysteine amino acid residues first oxidation peak, $P1_{\text{Cys}}$, at $E_{P1} = +0.55 \text{ V}$ [13], and the second peak, $P2_{\text{Tyr+Trp}}$, at $E_{P2} = +0.77 \text{ V}$, corresponds to the oxidation of tyrosine [24-27], and the first oxidation peak of the tryptophan [12, 26, 27] amino acid residues.

The pH influence on the electrochemical oxidation of native NIVO was investigated over a wide pH range, at GCE, in different buffer electrolytes, 0.1 M ionic strength, using DP voltammetry, and no oxidation peaks for $\text{pH} > 9.0$, were observed. The DP voltammograms showed a shift of cysteine, tyrosine, and tryptophan amino acid residues peak potentials to more negative potentials with increasing pH. The native NIVO low peak currents, observed in the DP voltammograms, clearly show the greater difficulty of the electron transfer processes in the folded tertiary and quaternary NIVO morphological structure.

3.2. Electrochemical oxidation of native NIVO thick multilayer film adsorbed on a GCE

The electrochemical oxidation of native NIVO thick multilayer film adsorbed on a GCE, by DP voltammetry, in buffer supporting electrolytes $3.0 < \text{pH} < 9.0$, 0.1 M ionic strength, using the thick layer NIVO film adsorbed on GCE, *Procedure 2*, was also investigated, **Figure 2A**.

Similarly to DP voltammograms obtained at GCE with native NIVO in solution, **Figure 1**, the DP voltammograms for native NIVO thick multilayer film adsorbed on a GCE, **Figure 2A**, showed the same two oxidation peaks. Increasing the pH, the potentials shifted to more negative values and the highest peak currents were obtained in 0.1 M acetate buffer pH 6.0, **Figure 2A**. The peak currents increase is explained, considering that the orientation of the molecule, on the GCE hydrophobic surface, causes an increase in the adsorption of cysteine, at $E_{P1} = +0.45$ V, tyrosine and tryptophan amino acid residues, at $E_{P2} = +0.68$ V, making these amino acids residues more accessible to be oxidized on the electrode surface, and, thus increasing the oxidation peak currents at pH 6.0.

For $3.0 < \text{pH} < 9.0$, for both peaks $P1_{\text{Cys}}$ and $P2_{\text{Tyr+Trp}}$, a linear dependence with pH (~ 59 mV/pH), was found, **Figure 2B**, showing the existence of an acid-base equilibrium, which means the electrochemical process involves an equal number of protons and electrons in the oxidation mechanism of the electroactive amino acid residues. Also, considering the width of the peak at half-height, $W_{1/2} \sim 90/n$, where n is the number of electrons, both oxidation reactions involve one electron and one proton, which is in agreement with the Cys [13], Tyr [25] and Trp [12] amino acid residues oxidation mechanism.

Taking into account both oxidation peak potentials, $P1_{\text{Cys}}$ and $P2_{\text{Tyr+Trp}}$, and that the highest oxidation peak currents were obtained at pH 6.0, all subsequent experiments were performed using 0.1 M acetate buffer pH 6.0.

3.3. Electrochemical oxidation of denatured NIVO thick multilayer film adsorbed on a GCE

Although the NIVO molecule contains all five electroactive amino acids, cysteine, tyrosine, tryptophan, histidine and methionine [7-9], in the tertiary and quaternary NIVO structures it is not possible for all of them to reach the electrode surface, thence the results obtained showed the difficulty of the amino acid residues electron transfer processes from NIVO more buried regions.

In the NIVO 3D structure, the amino acids are organised according to polarity/hydrophobicity, **Figure 3**, which makes very difficult the contact between the more interior electroactive amino acid residues with the GCE hydrophobic surface.

Protein destabilization occur in solutions containing denaturing agents, such as urea, SDS, TCEP or DTT, used in electrophoretic procedures applied to destabilize and unfold protein structures [18]. The denaturing process causes morphological changes in the 3D structure which unfolds, covering the electrode surface and enabling a better electrochemical oxidation detection of the electroactive amino acids residues easier [22, 26, 27, 30].

In order to investigate the oxidation mechanism of the denatured NIVO thick multilayer film immobilized on GCE, a new NIVO thick multilayer film adsorbed on GCE was always used for each experiment. The immobilization of NIVO thick multilayer film on the GCE ensured a full coverage of the surface, as revealed in the EIS experiments, which avoids the non-specific adsorption and binding of the denaturant molecules.

The changes, always using a new NIVO thick multilayer film adsorbed on GCE, before and after incubation in the denaturing agents, 6 M urea, 50 mM SDS, 10 mM TCEP or 10 mM DTT, in 0.1 M acetate buffer pH 6.0, during different time periods: 30, 60, 120 and 180 min, were evaluated. Each denatured NIVO thick multilayer film adsorbed on GCE was

then washed with deionized water, to remove the excess of denaturant, and only afterwards the DP voltammograms were recorded, **Figure 4**.

Among the four denaturing agents, urea and SDS are not electroactive. Only TCEP and DTT are electroactive at GCE [28], and the DP voltammograms showed one oxidation peak, for TCEP, at $E_{\text{TCEP}} = +0.97$ V, and for DTT, at $E_{\text{DTT}} = +1.09$ V, in 0.1 M acetate buffer pH 6.0.

In order to clearly identify the new oxidation peaks occurring after denaturation, for control DP voltammograms, the bare GCE was incubated in 6 M urea, 50 mM SDS, 10 mM TCEP or 10 mM DTT, in 0.1 M acetate buffer pH 6.0, for the same periods of time and under the same experimental conditions.

The denatured NIVO thick multilayer film adsorbed on GCE, after incubation in urea, showed the Cys oxidation peak, $P1_{\text{Cys}}$, at $E_{P1} = +0.45$ V, disappearance, and an increase, with time of the Tyr and Trp amino acid residues oxidation peak current, $P2_{\text{Tyr+Trp}}$, at $E_{P2} = +0.70$ V, without the appearance of new NIVO oxidation peaks, **Figure 4A**. The denaturing agent urea binds to the polarized areas with charge in the protein, such as peptide groups, and weakens the intermolecular bonds and native interactions, affecting the overall protein secondary and tertiary structure without affecting the primary structure [31], causing an enhancement of the Tyr amino acid residues oxidation peak current, due to their better access to the GCE surface.

The DP voltammogram of the denatured NIVO thick multilayer film adsorbed on GCE, after incubation in SDS, when compared with the control, showed also the Cys oxidation peak disappearance. A great increase of the Tyr and Trp amino acid residues oxidation peak current, $P2_{\text{Tyr+Trp}}$, at $E_{P2} = +0.70$ V, and after 30 min a new oxidation peak, corresponding to the second oxidation peak of the Trp, Met, and His amino acid residues, $P3_{\text{Trp+Met+His}}$, at $E_{P3} = +1.13$ V, was also detected, **Figure 4B**. The Tyr and Trp amino acid

residues oxidation peak current, $P2_{\text{Tyr+Trp}}$, continued to increase, for 60 and 120 minutes incubation, while the new oxidation peak current, $P3_{\text{Trp+Met+His}}$, remained constant. The denaturing process caused by SDS occurs binding to the protein chain with its hydrocarbon tail, exposing normally buried regions, and coating the protein chain with surfactant molecules [32].

The TCEP and DTT are protein reducing agents that disrupt disulphide bonds, preventing these intramolecular and intermolecular bonds from forming between the cysteine and methionine amino acid residues of proteins [28].

The DP voltammograms of the denatured NIVO thick multilayer film adsorbed on GCE, obtained after the incubation in TCEP, **Figure 4C**, showed again the disappearance of the Cys oxidation peak, $P1_{\text{Cys}}$, a large and progressive increase in the oxidation peak current of the oxidation of Tyr and Trp amino acid residues, $P2_{\text{Tyr+Trp}}$, at $E_{P2} = +0.68$ V, and also the appearance of a new peak, with a small increase in current, $P3_{\text{Trp+Met+His}}$, at $E_{P3} = +1.12$ V, corresponding to the second oxidation peak of the Trp, Met, and His amino acid residues. The peak potential corresponding to Trp, Met and His oxidation, $P3_{\text{Trp+Met+His}}$, at $E_{P3} = +1.12$ V, is more positive than the control TCEP oxidation peak potential, at $E_{\text{TCEP}} = +0.97$ V, which ensures that the new peak, $P3_{\text{Trp+Met+His}}$, is the result from the thick multilayer NIVO film denaturation by the reducing agent TCEP.

Finally, the DP voltammogram of the denatured NIVO thick multilayer adsorbed on GCE, after the incubation in DTT showed, **Figure 4D**, an increase in the oxidation peak current of Cys amino acid residues, $P1_{\text{Cys}}$, at $E_{P1} = +0.49$ V, an increase in the peak current of the Tyr and Trp amino acid residues oxidation, $P2_{\text{Tyr+Trp}}$, at $E_{P2} = +0.68$ V, and also the appearance of a new peak, which progressively increased with incubation time, $P3_{\text{Trp+Met+His}}$, at $E_{P3} = +1.11$ V, attributed to the Trp, Met, and His amino acid residues oxidation, and may also have some contribution from DTT oxidation, at $E_{\text{DTT}} = +1.09$ V.

According to these results, the DTT reducing agent clearly promoted stronger unfolding of the NIVO morphological structure, which made the buried amino acid residues more exposed to the GCE surface so that they could be oxidized more easily. A larger interaction, since all peak currents increased, corresponding to unfolding the NIVO 3D structure, could also be observed with incubation time, which indicates that occurred a greater denaturation of NIVO by the reducing agent DTT.

3.4. CV of the native and denatured NIVO thick multilayer film adsorbed on a GCE

The NIVO thick multilayer films were immobilized on the GCE surface, *Procedure 2*, and were used to investigate, by DP voltammetry, the electrochemical oxidation of the native and denatured NIVO immobilized on the GCE surface, **Figures 2 and 4**.

The native and denatured NIVO thick multilayer films adsorbed on the GCE were also electrochemically characterized by CV, using $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ as the redox probe, **Figure 5**. This NIVO thick films immobilized on the GCE surface, cause changes in the $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ redox probe CV peak current and potential, which are related to the electron-transfer rate constant.

The CV of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, recorded with a bare GCE surface, in 0.1 M acetate buffer pH 6.0, presented one quasi-reversible redox process, with a peak-to-peak separation $\Delta E_p \sim 238$ mV, **Figure 5**.

The CV of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, obtained in the same conditions, with the native NIVO thick multilayer film adsorbed on GCE, showed that the $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ oxidation and reduction become irreversible, and the peaks were shifted to more positive and more negative potentials, when compared with the CV recorded with the bare GCE, resulting in a peak-to-peak separation of $\Delta E_p \sim 610$ mV, **Figure 5**.

The CV of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ using the denatured NIVO thick multilayer film adsorbed on GCE, after the denaturation in DTT, in 0.1 M acetate buffer pH 6.0, was also obtained. The

$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ redox process for the denatured NIVO thick multilayer film adsorbed on GCE was irreversible, with a peak-to-peak separation of $\Delta E_p \sim 532$ mV, **Figure 5**.

In order to measure the electrochemically active surface area of the bare GCE, a solution of 1.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, for different scan rates of 5-100 mV s^{-1} , in 0.1 M acetate buffer pH 6.0, was used. The linear relationship between peak current and $v^{1/2}$ for the electrochemical reaction suggested a diffusion-limited process [29] according to the Randles-Sevcik equation, $I_{pa} (\text{A}) = 2.69 \times 10^5 n (\alpha_c n')^{1/2} A [\text{R}] \infty D_O^{1/2} v^{1/2}$ and the GCE electroactive area was determined to be $A = 1.20 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$.

For the native NIVO thick multilayer film adsorbed on GCE the effect of the CVs scan rate, between 5-100 mV s^{-1} , on the oxidation process of 1.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, in 0.1 M acetate buffer pH 6.0, was investigated. Both anodic and cathodic oxidation peak currents increased linearly with $v^{1/2}$, indicating that the oxidation process was diffusion-limited [29]. The surface concentration of electroactive species was estimated from the background-corrected electric charge (Q) obtained in the anodic peak process in a CV at a slow scan rate (5 mV s^{-1}) according with the theoretical relationship [29]:

$$\Gamma = Q / n F A$$

where Γ is the concentration of electroactive species (mol cm^{-2}), n is the number of electrons transferred (assuming $n = 1$), F is the Faraday constant (96 485 C/mol e^-) and A is the GCE electroactive area ($1.20 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$). The concentration of electroactive species was found to be $9.52 \times 10^{-7} \text{ mol cm}^{-2}$, in agreement with a thick multilayer film.

3.5. EIS of the native and denatured NIVO thick multilayer film adsorbed on a GCE

The EIS is a powerful tool to monitor changes in interfacial properties on the electrode surface [33], to investigate the mass transfer processes and kinetics of the surface adsorption, and to provide complementary information to CV, thus it has been used for the interfacial

characterization of various bare [34] and modified electrodes containing biological molecules [35].

In order to characterize the bare GCE, and the native and denatured NIVO thick multilayer films adsorbed on the GCE, the EIS complex plane impedance plots, at $E_{ap} = +0.25$ V, which is equal to the formal potential of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ redox species obtained at mid peak potential, in 0.1 M acetate buffer pH 6.0, for different concentrations of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, and the EIS equivalent electrical circuits parameters, were obtained, **Figure 6** and **Table 1**.

The complex plane impedance plot, observed for the bare GCE, **Figure 6A**, showed a semi-circle corresponding to the occurrence of the charge transfer reaction, with a charge transfer resistance (R_{ct}), represented by the diameter of the semi-circle, smaller than that obtained for the GCE surface with adsorbed native NIVO thick multilayer film, **Figure 6B**. The higher R_{ct} values obtained using the native NIVO thick multilayer film adsorbed on GCE were expected, since the immobilized native NIVO molecules on the GCE surface blocked the electron transfer between the redox probe and the GCE surface.

The complex plane impedance, obtained for the denatured NIVO thick multilayer film adsorbed on GCE, after the denaturation in DTT, **Figure 6C**, showed a charge transfer resistance higher than obtained for the bare GCE, since there are NIVO molecules adsorbed on the electrode surface making it difficult the electron transfer to occur. A smaller charge transfer resistance than that obtained for the native NIVO thick multilayer film adsorbed on GCE, since the electron transfer of the denatured NIVO thick multilayer film adsorbed on the electrode surfaces is easier, due to the unfolding of the NIVO morphological structure after denaturation.

Finally, for the bare GCE, and native and denatured NIVO thick multilayer films adsorbed on GCE, the R_{ct} values decreased with increasing $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ concentration, as anticipated, **Table 1**.

A typical Randles equivalent electrical circuit was used to model the experimental complex plane impedance spectra. In the circuit, R_{Ω} corresponds to the cell resistance, CPE_1 to the constant phase element, R_{ct} to the charge transfer resistance across the electrode surface interface, and CPE_2 to a new constant phase element. The CPE was modelled as a non-ideal capacitor [36], given by $\text{CPE} = - (Ci\omega)^{-\alpha}$, where C is the capacitance, which describes the double layer charge separation at electrode-solution interface, ω is the frequency in rad s^{-1} , and α exponent is due to the heterogeneity of the surface ($0.5 < \alpha < 1$).

The EIS results were fitted to appropriate equivalent electrical circuits, at the bare GCE, and at the native and denatured NIVO thick multilayer films adsorbed on the GCE. The values obtained for the equivalent electrical circuit parameters are summarized in **Table 1**.

4. Discussion

The protein-electrode interactions are of fundamental importance in bioelectrochemistry, and these interactions are directly influenced by the electrode surface properties. The orientation of the protein is an important factor as the electroactive amino acids are generally buried inside the protein 3D morphology and is difficult for the electron transfer to occur. In this way, considering that the GCE surface is hydrophobic, the interactions with hydrophobic protein domains are favoured.

A better understanding of the electrochemical behaviour of the anticancer monoclonal antibody NIVO is very important and it is necessary to take into account NIVO 3D morphological and chemical structure, **Scheme 1**.

The five electroactive amino acids are distributed in the NIVO heavy chains, 36 Tyr, 18 Trp, 22 Cys, 16 His and 10 Met, and in the NIVO light chains, 18 Tyr, 6 Trp, 10 Cys, and 4 His, but Met amino acids residues are not present in the composition of the NIVO light chain.

One way to identify the hydrophobicity and/or polarity of a protein or protein sequence is using the Kyte-Doolittle hydrophathy scale [9, 19]. The Kyte-Doolittle plot, obtained for both heavy, **Figure 3A**, and light **Figure 3B**, NIVO chains, presented a general NIVO hydrophilic character, with intercalated hydrophobic sequences. As we can see in these plots, most five electroactive amino acids present in the NIVO molecule are incorporated into the hydrophilic regions located at/in close proximity to the protein surface, and which will not interact easily with the hydrophobic GCE surface, making the oxidation of the amino acids present in NIVO more difficult.

Other monoclonal antibodies have similar profiles when comparing the Kyte-Doolittle hydrophathy scales [26, 27], which also reveal that the electroactive amino acid residues are also mainly present in the heavy chains and in the hydrophilic regions. Thus, the difficulty in the electron transfer process observed for NIVO is similar to other monoclonal antibodies.

The electrochemical oxidation of native and adsorbed NIVO in solution at the GCE surface showed two pH-dependent anodic peaks, corresponding Cys, Tyr and Trp amino acid charge transfer reactions, and these amino acid residues are mainly located in the hydrophilic regions, **Figure 3**.

However, although most NIVO electroactive amino acids are in the hydrophilic regions, some small amount will interact with the electrode surface, and the oxidation peaks, related to Cys, Tyr and Trp amino acids residues, were observed. These results clearly show the greater difficulty of the electron transfer processes, of the more interior protein

electroactive amino acid residues, in the NIVO antibody tertiary and quaternary structures, organised according to the polarity/hydrophobicity, to occur on the GCE surface.

One way to better investigate the direct electrochemistry of proteins is to immobilize the biological material on the surface of the electrode. The electron transfer rate increases exponentially since the protein adsorption causes the amino acid residues to be closely immobilized on the electrode surface.

The electrochemical oxidation of native NIVO thick multilayer film adsorbed on GCE, showed, as well as observed for the oxidation of native NIVO in solution, two pH-dependent amino acid residues anodic peaks attributed to Cys, P1, and Tyr and Trp, P2, with increased peak currents when compared with the native NIVO in solution, **Figure 2**.

To unfold the 3D protein NIVO morphological structure, and enable the exposure of more electroactive amino acid residues to the electrode surface, a methodology employing denaturing, urea, SDS, and reducing agents, TCEP and DTT, using a native NIVO thick multilayer film adsorbed on GCE surface, **Figure 4**, was followed.

The denatured NIVO thick multilayer film adsorbed on GCE surface underwent substantial changes, and new charge transfer reactions were observed. Effectively, electroactive amino acid residues peak currents increased, and the appearance of new oxidation peaks, in the DP voltammograms, for the denatured NIVO thick multilayer film adsorbed on GCE, when compared with the native thick multilayer NIVO film adsorbed on GCE, were found. This clearly confirms the unfolding of the NIVO 3D morphological structure caused by the denaturing and reducing agents.

The denaturation of the monoclonal antibody NIVO adsorbed on GCE with DTT was shown to be the most effective, since the currents of the oxidation peaks $P1_{\text{Cys}}$ and $P2_{\text{Tyr+Trp}}$ gradually increased with the incubation time, as well as the appearance of the new peak, $P3_{\text{Trp+Met+His}}$, that also increased with the incubation time.

This can be explained by the high reactivity of the DTT which efficiently reduces all protein disulphide bonds in the monoclonal antibody molecule and promotes the total unfolding of the NIVO 3D morphological structure. In this case, DTT caused the disruption of the disulphide bonds, which prevent the formation of intramolecular and intermolecular bonds between the cysteine and methionine amino acid residues present in the NIVO molecule, and the binding of the heavy chain to the NIVO light chains, which are connected through inter-chain disulphide bonds.

The large structural modifications of the native NIVO structure promoted by the denaturing and reducing agents, which made all the electroactive amino acid residues more exposed to the electrode surface, enabling to be more easily oxidized, was also observed for other monoclonal antibodies [26, 27]. This indicates that the use of denaturing and reducing agents, commonly used to destabilize and unfold protein structures [18], are an excellent strategy to unfold the 3D protein structure and, consequently, enable a better investigation of protein electroactive amino acid residues behaviour using electrochemical methods.

5. Conclusions

Nivolumab (NIVO) is a recombinant humanized monoclonal antibody used in the treatment of cancer. The electrochemical oxidation of native and denatured NIVO multilayer thick film adsorbed on GCE was investigated for the first time using DP voltammetry. The interfacial behaviour and adsorption of NIVO on GCE electrode surface was also probed by electrochemical impedance spectroscopy.

The native NIVO oxidation in solution and the native NIVO multilayer thick film adsorbed on GCE showed two pH-dependent peaks, the first one corresponding to the Cys amino acid residues oxidation, and the second one corresponding to the Tyr and Trp amino acid residues oxidation. The unfolding of NIVO 3D structure after the denaturation of the

native NIVO multilayer thick film adsorbed on GCE, with denaturing and reducing agents, improved the electrochemical response and sensitivity, and enhanced the exposure of more electroactive amino acid residues to the electrode surface, thus additional Trp, Met, and His amino acid residues oxidation peaks were identified.

The direct electrochemistry of monoclonal antibodies brings new perspectives for the application of electrochemical methods in the research in proteomics and biomedicine, for a better understanding of the antibodies properties and mechanisms of action, and their different functions, as well as the development and the improvement in searching for new monoclonal antibodies.

Acknowledgements

Financial support from Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), project UID/EMS/00285/2013 (cofinanced by the European Community Fund FEDER), FEDER funds through the program COMPETE – Programa Operacional Factores de Competitividade, SUDOE project Innovec'EAU (SOE1/P1/F0173), and PhD Grant 232296/2014-6 (W. B. S. Machini) from CNPq/Brazil, are gratefully acknowledged.

REFERENCES

- [1] World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals, in: World Health Organization (Ed.) Geneva, 2018.
- [2] J.K. Liu, The history of monoclonal antibody development - Progress, remaining challenges and future innovations, *Annals of medicine and surgery.* 3 (2014) 113-6. doi:10.1016/j.amsu.2014.09.001
- [3] M.K. Callahan, M.A. Postow, J.D. Wolchok, Targeting T Cell Co-receptors for Cancer Therapy, *Immunity.* 44 (2016) 1069-78. doi:10.1016/j.immuni.2016.04.023
- [4] M. Hazarika, M.K. Chuk, M.R. Theoret, S. Mushti, K. He, S.L. Weis, A.H. Putman, W.S. Helms, X. Cao, H. Li, H. Zhao, L. Zhao, J. Welch, L. Graham, M. Libeg, R. Sridhara, P. Keegan, R. Pazdur, U.S. FDA Approval Summary: Nivolumab for Treatment of Unresectable or Metastatic Melanoma Following Progression on Ipilimumab, *Clin Cancer Res.* 23 (2017) 3484-3488. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0712
- [5] R. Sundar, B.C. Cho, J.R. Brahmer, R.A. Soo, Nivolumab in NSCLC: latest evidence and clinical potential, *Therapeutic advances in medical oncology.* 7 (2015) 85-96. doi:10.1177/1758834014567470
- [6] D. Berman, A. Korman, R. Peck, D. Feltquate, N. Lonberg, R. Canetta, The development of immunomodulatory monoclonal antibodies as a new therapeutic modality for cancer: The Bristol-Myers Squibb experience, *Pharmacol Therapeut.* 148 (2015) 132-153. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.017
- [7] J.Y. Lee, H.T. Lee, W. Shin, J. Chae, J. Choi, S.H. Kim, H. Lim, T. Won Heo, K.Y. Park, Y.J. Lee, S.E. Ryu, J.Y. Son, J.U. Lee, Y.S. Heo, Structural basis of checkpoint blockade by monoclonal antibodies in cancer immunotherapy, *Nat Commun.* 7 (2016) 13354-13354.
- [8] RCSB Protein Data Bank. www.rcsb.org/pdb/.

- [9] DrugBank database. www.drugbank.ca/drugs/DB09035.
- [10] T.A. Enache, A.M. Oliveira-Brett, Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways, *J Electroanal Chem.* 655 (2011) 9-16. doi:10.1016/j.jelechem.2011.02.022
- [11] B. Malfoy, J.A. Reynaud, Electrochemical investigations of amino acids at solid electrodes: Part II. Amino acids containing no sulfur atoms: Tryptophan, tyrosine, histidine and derivatives, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry.* 114 (1980) 213-223. doi:10.1016/S0022-0728(80)80448-7
- [12] T.A. Enache, A.M. Oliveira-Brett, Pathways of Electrochemical Oxidation of Indolic Compounds, *Electroanal.* 23 (2011) 1337-1344. doi:10.1002/elan.201000671
- [13] T.A. Enache, A.M. Oliveira-Brett, Boron doped diamond and glassy carbon electrodes comparative study of the oxidation behaviour of cysteine and methionine, *Bioelectrochemistry.* 81 (2011) 46-52. doi:10.1016/j.bioelechem.2011.02.001
- [14] J.A. Reynaud, B. Malfoy, P. Canesson, Electrochemical investigations of amino acids at solid electrodes: Part I. Sulfur components: Cystine, cysteine, methionine, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry.* 114 (1980) 195-211. doi:10.1016/S0022-0728(80)80447-5
- [15] J.T. Pento, Monoclonal Antibodies for the Treatment of Cancer, *Anticancer Res.* 37 (2017) 5935-5939. doi:10.21873/anticancer.12040
- [16] F.A. Armstrong, G.S. Wilson, Recent developments in faradaic bioelectrochemistry, *Electrochim Acta.* 45 (2000) 2623-2645. doi:10.1016/S0013-4686(00)00342-X
- [17] D.D. Perrin, B. Dempsey, Buffers for pH and metal ion control, Chapman and Hall, London, 1974.
- [18] R. Westermeier, T. Naven, H.R. Höpker, *Proteomics in Practice: A Guide to Successful Experimental Design*, Wiley-Blackwell, Berlin, 2008.

- [19] J. Kyte, R.F. Doolittle, A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *J Mol Biol.* 157 (1982) 105-32. doi:10.1016/0022-2836(82)90515-0
- [20] M.R. Wilkins, E. Gasteiger, A. Bairoch, J.C. Sanchez, K.L. Williams, R.D. Appel, D.F. Hochstrasser, Protein identification and analysis tools in the ExPASy server, *Methods in molecular biology.* 112 (1999) 531-52.
- [21] ExPASy-Bioinformatic Resource Portal. <http://web.expasy.org/protscale/>.
- [22] J.L. Moreland, A. Gramada, O.V. Buzko, Q. Zhang, P.E. Bourne, The Molecular Biology Toolkit (MBT): a modular platform for developing molecular visualization applications, *BMC bioinformatics.* 6 (2005) 21. doi:10.1186/1471-2105-6-21
- [23] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne, The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 235-42.
- [24] I.P. Fernandes, A.M. Oliveira-Brett, Calcium-induced calmodulin conformational change. Electrochemical evaluation, *Bioelectrochemistry.* 113 (2017) 69-78. doi:10.1016/j.bioelechem.2016.10.002
- [25] T.A. Enache, A.M. Oliveira-Brett, Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways, *J Electroanal Chem.* 655 (2011) 9-16. doi:10.1016/j.jelechem.2011.02.022
- [26] F.Z. Issaad, L.I.N. Tomé, N.V. Marques, C. Mouats, V.C. Diculescu, A.M. Oliveira-Brett, Bevacizumab anticancer monoclonal antibody: native and denatured redox behaviour, *Electrochim Acta.* 206 (2016) 246-253. doi:10.1016/j.electacta.2016.04.097
- [27] S.C.B. Oliveira, I.B. Santarino, A.M. Oliveira-Brett, Direct Electrochemistry of Native and Denatured Anticancer Antibody Rituximab at a Glassy Carbon Electrode, *Electroanal.* 25 (2013) 6. doi:10.1002/elan.201200552

- [28] I.B. Santarino, S.C.B. Oliveira, A.M. Oliveira-Brett, Protein reducing agents dithiothreitol and tris(2-carboxyethyl)phosphine anodic oxidation, *Electrochem Commun.* 23 (2012) 114-117. doi:10.1016/j.elecom.2012.06.027
- [29] A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed., Wiley, New York, 2001.
- [30] W.B.S. Machini, A.M. Oliveira-Brett, Cyclic lipopeptide antibiotic daptomycin electrochemical oxidation at a glassy carbon electrode, *Electroanal.* 29 (2017) 1490-1496. doi:10.1002/elan.201700037
- [31] B.J. Bennion, V. Daggett, The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100 (2003) 5142-7. doi:10.1073/pnas.0930122100
- [32] A.K. Bhuyan, On the mechanism of SDS-induced protein denaturation, *Biopolymers.* 93 (2010) 186-99. doi:10.1002/bip.21318
- [33] M.E. Orazem, B. Tribollet, *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, John Wiley and Sons, New York, 2008.
- [34] S.C.B. Oliveira, A.M. Oliveira-Brett, Voltammetric and electrochemical impedance spectroscopy characterization of a cathodic and anodic pre-treated boron doped diamond electrode, *Electrochim Acta.* 55 (2010) 4599-4605. doi:10.1016/j.electacta.2010.03.016
- [35] I.O. K'Owino, O.A. Sadik, Impedance Spectroscopy: A Powerful Tool for Rapid Biomolecular Screening and Cell Culture Monitoring, *Electroanal.* 17 (2005) 2101-2113. doi:10.1002/elan.200503371
- [36] F. Lisdat, D. Schafer, The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing, *Analytical and bioanalytical chemistry.* 391 (2008) 1555-1567. doi:10.1007/s00216-008-1970-7

Table 1. Randles parameters obtained for $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, from the EIS complex plane, with bare GCE, native and denatured NIVO thick multilayer films adsorbed on GCE.

Electrode surface	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ (mM)	R_{Ω} ($\Omega \text{ cm}^2$)	CPE_1 ($\mu\text{F cm}^{-2} \text{ S}^{a-1}$)	α_1	R_{ct} ($\text{k}\Omega \text{ cm}^2$)	CPE_2 ($\mu\text{F cm}^{-2} \text{ S}^{a-1}$)	α_2
GCE	1.0	642 ± 13	0.24 ± 0.01	0.92 ± 0.01	75 ± 10	43 ± 10	0.43 ± 0.06
	3.0	1072 ± 11	0.22 ± 0.01	0.92 ± 0.01	43 ± 10	106 ± 10	0.48 ± 0.03
	5.0	1067 ± 12	0.21 ± 0.01	0.92 ± 0.01	25 ± 10	173 ± 14	0.46 ± 0.03
Native NIVO thick multilayer film adsorbed on GCE	1.0	527 ± 22	0.19 ± 0.01	0.93 ± 0.01	604 ± 50	29 ± 10	0.36 ± 0.40
	3.0	571 ± 56	0.17 ± 0.02	0.95 ± 0.02	98 ± 10	40 ± 10	0.20 ± 0.75
	5.0	1054 ± 10	0.21 ± 0.01	0.93 ± 0.01	25 ± 10	172 ± 10	0.46 ± 0.02
Denatured NIVO thick multilayer film adsorbed on GCE	1.0	634 ± 10	0.33 ± 0.01	0.90 ± 0.01	269 ± 10	34 ± 10	0.45 ± 0.05
	3.0	548 ± 32	0.32 ± 0.01	0.90 ± 0.01	97 ± 10	100 ± 10	0.43 ± 0.23
	5.0	759 ± 10	0.31 ± 0.01	0.90 ± 0.01	67 ± 10	171 ± 10	0.43 ± 0.03

SCHEME AND FIGURE CAPTIONS

Scheme 1. Crystal structure of the monoclonal antibody NIVO-Fab fragment, light chain in blue and heavy chain in red (structure PDB ID: 5GGQ [7, 8]).

Scheme 2. Electroactive amino acid chemical structures.

Figure 1. DP voltammogram baseline corrected, at GCE, for 1.0 mg mL⁻¹ native NIVO, in solution 0.1 M acetate buffer pH 4.5. Scan rate $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

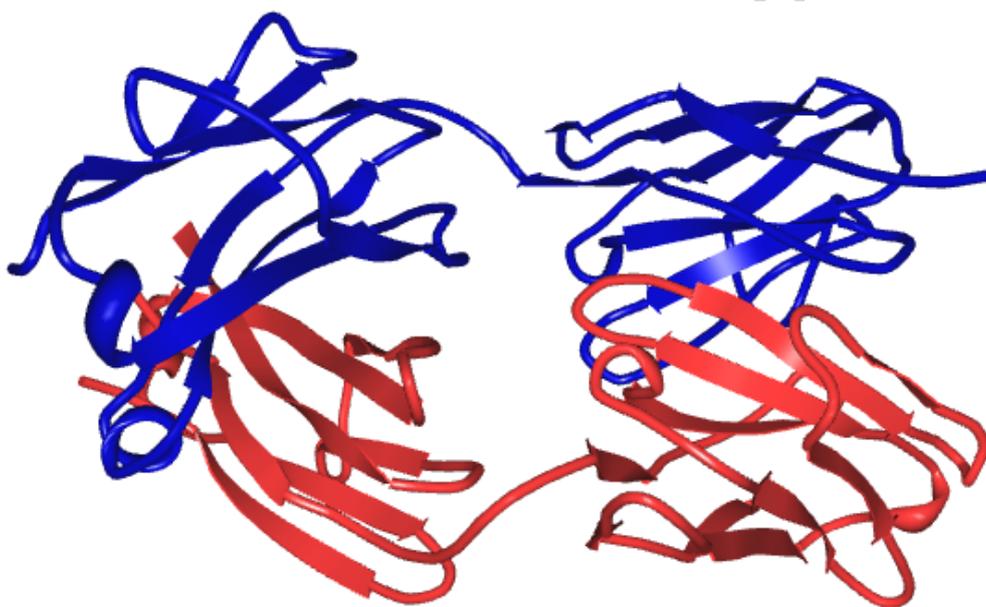
Figure 2. (A) 3D DP voltammograms baseline corrected for native NIVO thick multilayer film adsorbed on a GCE, at different supporting electrolyte pHs. (B) Plot of native NIVO thick multilayer film adsorbed on a GCE oxidation peak potential (\blacktriangle) E_{p1} and (\blacksquare) E_{p2} , and peak current (\blacktriangle) I_{p1} and (\blacksquare) I_{p2} vs. pH. Scan rate $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Figure 3. Hydropathicity plot of the NIVO amino acid sequences: variable: (A) heavy and (B) light chain. Electroactive amino acids: (yellow) Cys, (red) Tyr, (green) Trp, (cyan) His, and (blue) Met.

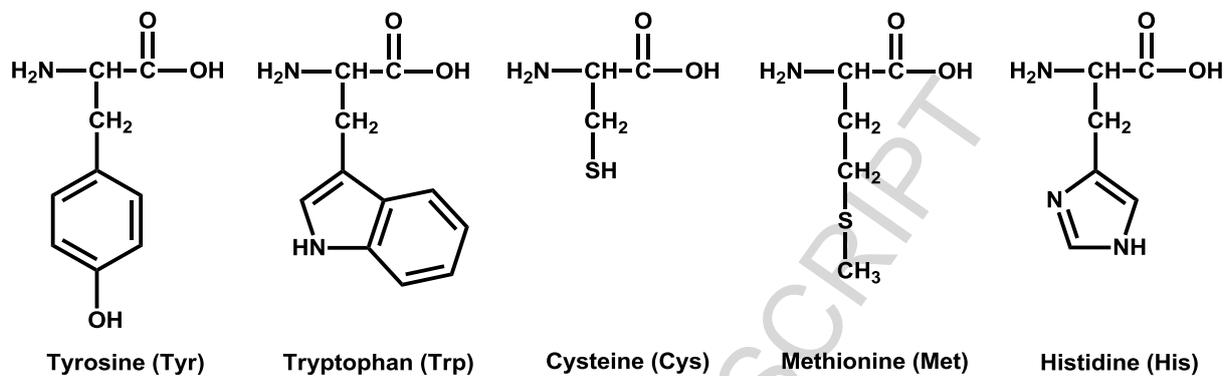
Figure 4. DP voltammograms baseline corrected, for the NIVO thick multilayer film adsorbed on GCE, in 0.1 M acetate buffer pH 6.0: (—) native and (—) denatured in: (A) 6 M urea, (B) 50 mM SDS, (C) 50 mM TCEP, and (D) 10 mM DTT. Scan rate 5 mV s^{-1} .

Figure 5. CVs, in 0.1 M acetate buffer pH 6.0: (—) bare GCE, and in 1.0 mM $K_4[Fe(CN)_6]$: (—) GCE, and (—) native and (—) denatured NIVO thick multilayer films adsorbed on GCE. Scan rate $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Figure 6. Complex plane impedance spectra, in 0.1 M acetate buffer pH 6.0, for (■) 1.0, (●) 3.0 and (▲) 5.0 mM $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$, at applied midpoint potential, $E_{ap} = +0.25 \text{ V}$: (A) bare GCE, (B) native and (C) denatured NIVO thick multilayer films adsorbed on GCE; (A1), (B1) and (C1) EIS equivalent electrical circuits.



Scheme 1. Crystal structure of the monoclonal antibody NIVO-Fab fragment, light chain in blue and heavy chain in red (structure PDB ID: 5GGQ [7, 8]).



Scheme 2. Electroactive amino acid chemical structures.

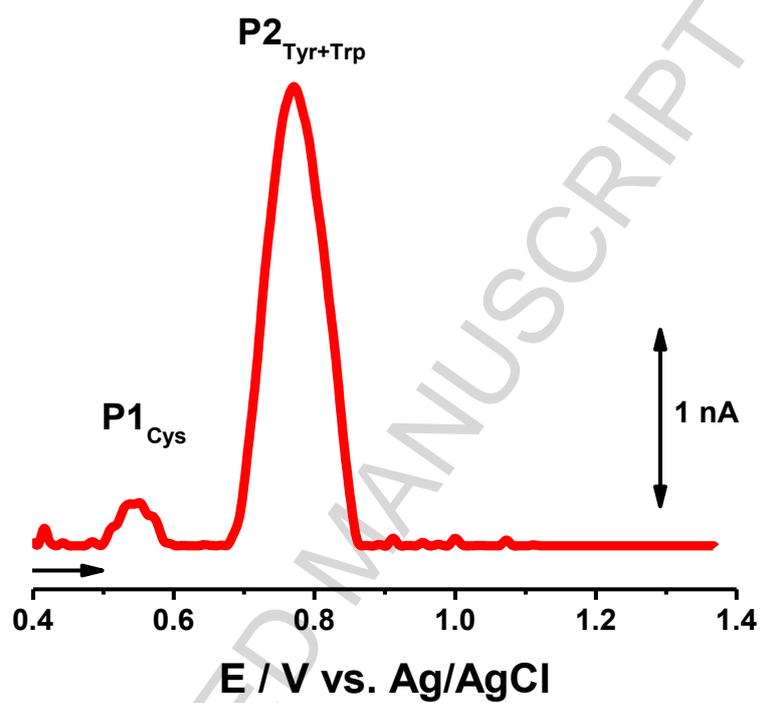


Figure 1. DP voltammogram baseline corrected, at GCE, for 1.0 mg mL^{-1} native NIVO, in solution 0.1 M acetate buffer pH 4.5. Scan rate $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

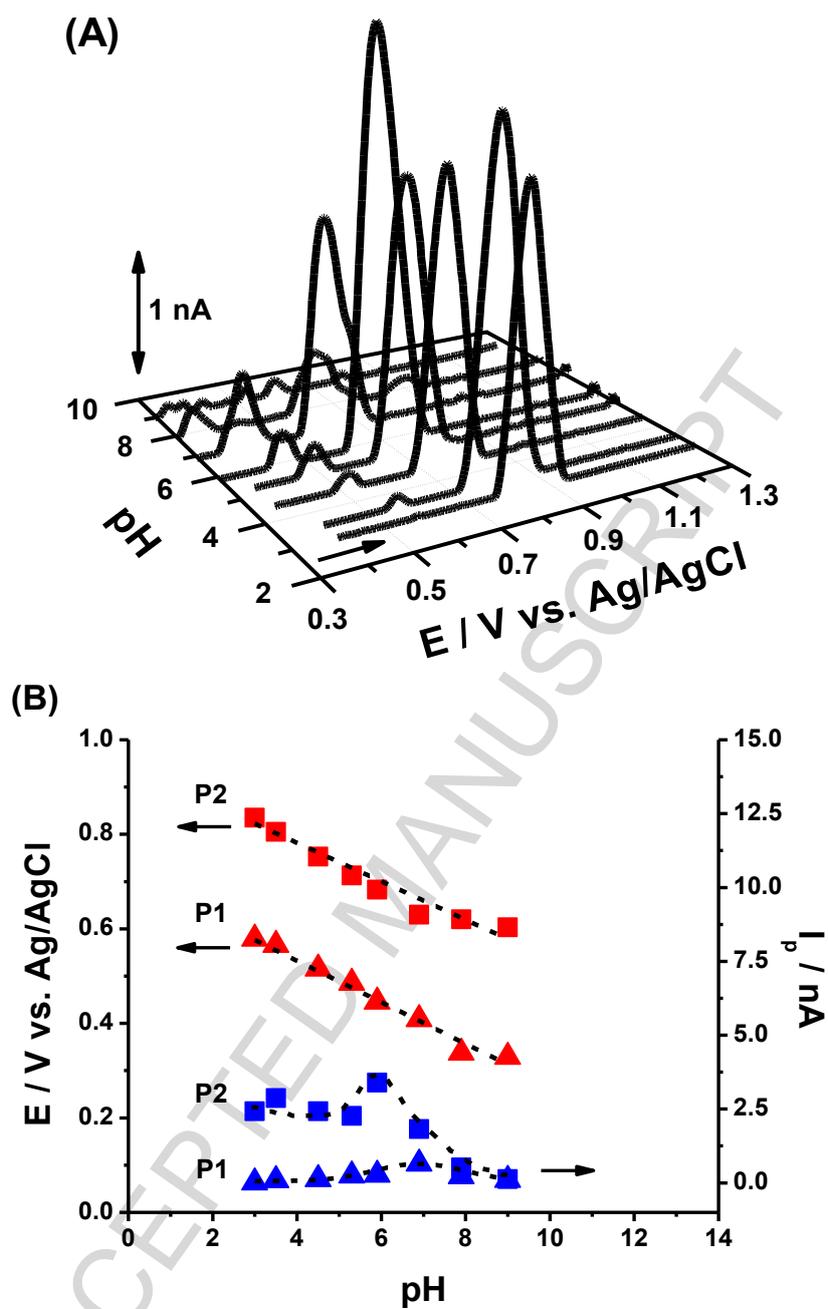


Figure 2. (A) 3D DP voltammograms baseline corrected for native NIVO thick multilayer film adsorbed on a GCE, at different supporting electrolyte pHs. (B) Plot of native NIVO thick multilayer film adsorbed on a GCE oxidation peak potential (\blacktriangle) E_{p1} and (\blacksquare) E_{p2} , and peak current (\blacktriangle) I_{p1} and (\blacksquare) I_{p2} vs. pH. Scan rate $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

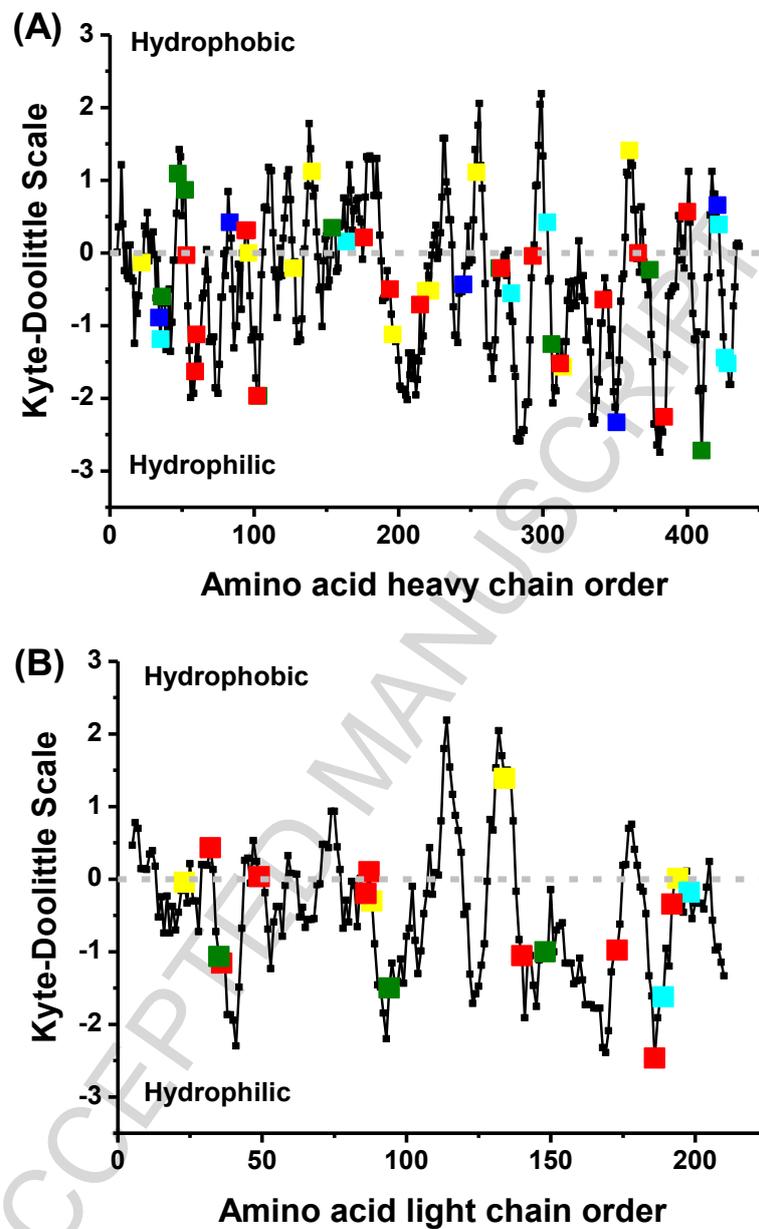


Figure 3. Hydropathicity plot of the NIVO amino acid sequences: variable:

(A) heavy and (B) light chain. Electroactive amino acids: (yellow) Cys,

(red) Tyr, (green) Trp, (cyan) His, and (blue) Met.

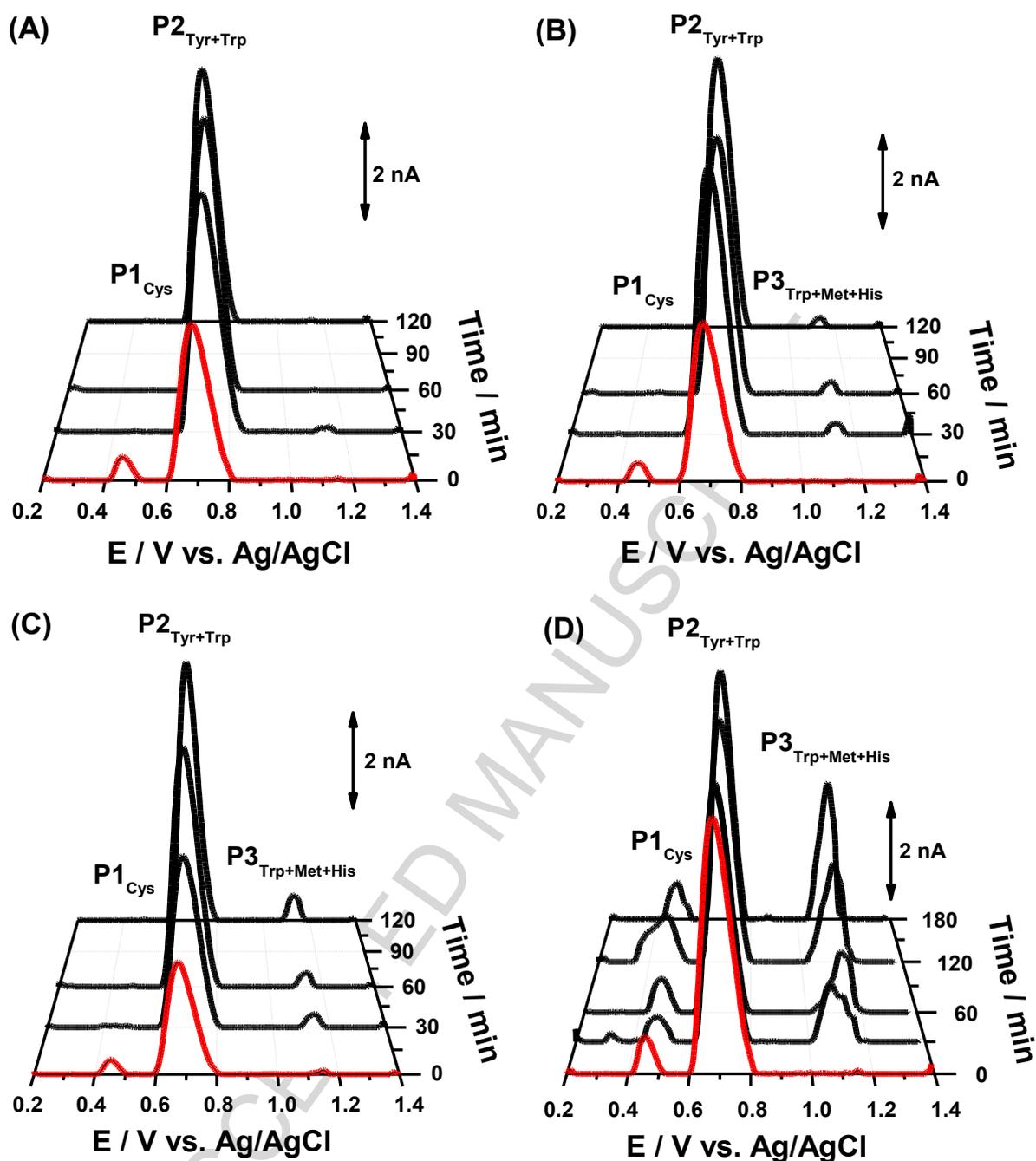


Figure 4. DP voltammograms baseline corrected, for the NIVO thick multilayer film adsorbed on GCE, in 0.1 M acetate buffer pH 6.0: (—) native and (—) denatured in: (A) 6 M urea, (B) 50 mM SDS, (C) 50 mM TCEP, and (D) 10 mM DTT. Scan rate 5 mV s^{-1} .

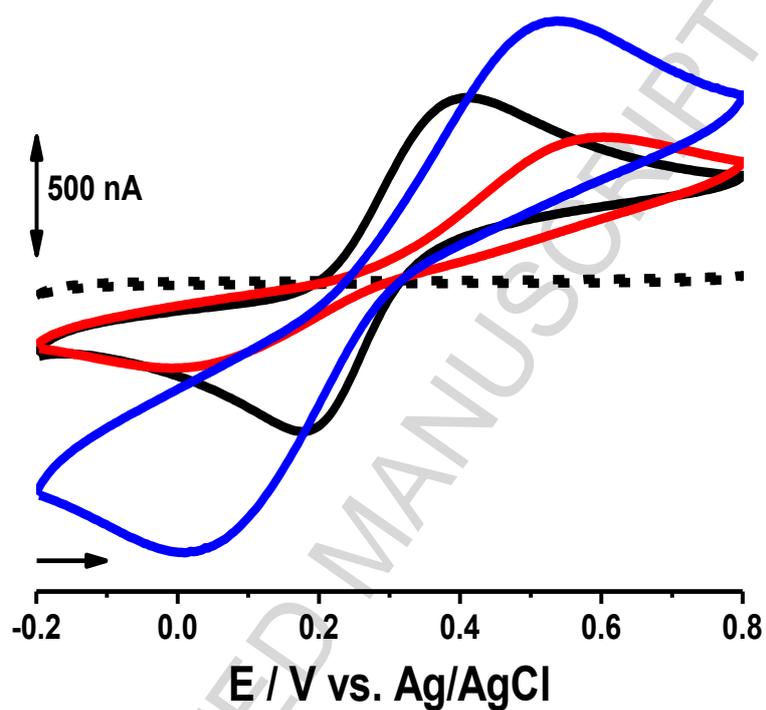


Figure 5. CVs, in 0.1 M acetate buffer pH 6.0: (– –) bare GCE, and in 1.0 mM $K_4[Fe(CN)_6]$:

(—) GCE, and (—) native and (—) denatured NIVO thick multilayer films adsorbed on GCE.

Scan rate $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

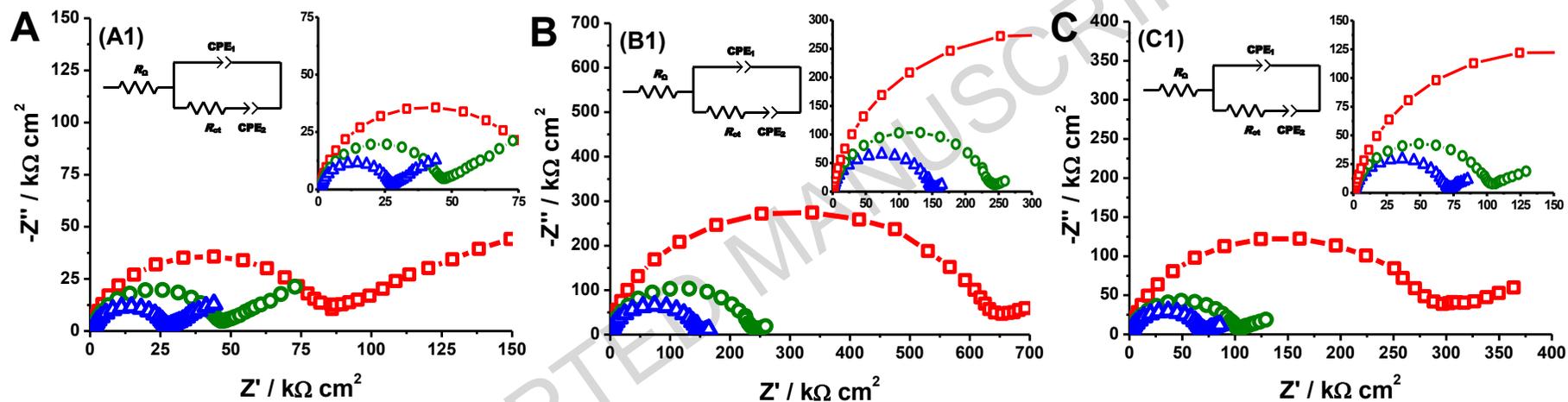


Figure 6. Complex plane impedance spectra, in 0.1 M acetate buffer pH 6.0, for (□) 1.0, (○) 3.0 and (△) 5.0 mM $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$, at applied midpoint potential, $E_{ap} = +0.25$ V: (A) bare GCE, (B) native and (C) denatured NIVO thick multilayer films adsorbed on GCE;

(A1), (B1) and (C1) EIS equivalent electrical circuits.

Nivolumab Anticancer Monoclonal Antibody Native and Denatured

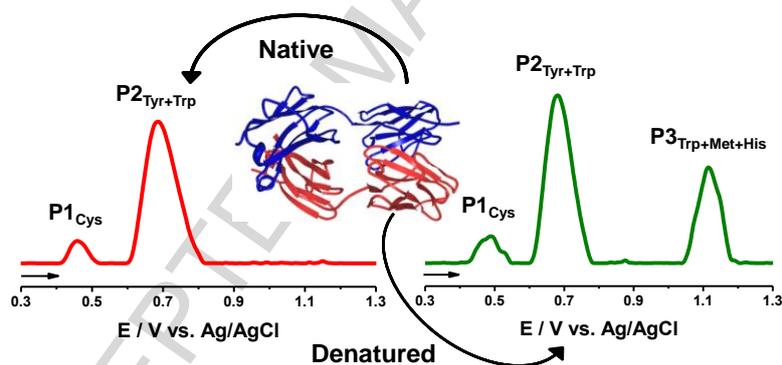
Direct Electrochemistry at a Glassy Carbon Electrode

Wesley B. S. Machini¹, Nuno V. Marques², and Ana Maria Oliveira-Brett^{1,*}

¹ Chemistry Department, Faculty of Sciences and Technology, University of Coimbra, 3004-535, Coimbra, Portugal

² Serviços Farmacêuticos, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, EPE, 3000-075, Coimbra, Portugal

Graphical abstract



Nivolumab Anticancer Monoclonal Antibody Native and Denatured

Direct Electrochemistry at a Glassy Carbon Electrode

Wesley B. S. Machini¹, Nuno V. Marques², and Ana Maria Oliveira-Brett^{1,*}

¹ Chemistry Department, Faculty of Sciences and Technology, University of Coimbra, 3004-535, Coimbra, Portugal

² Serviços Farmacêuticos, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, EPE, 3000-075, Coimbra, Portugal

Highlights

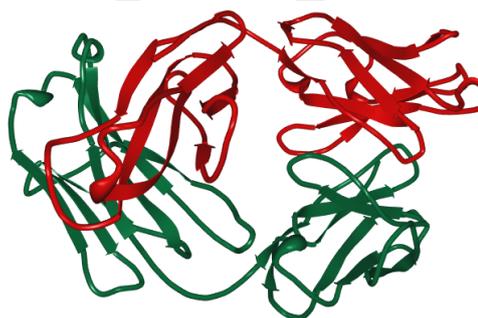
- Electrochemical oxidation of native and denatured NIVO was investigated
- Native NIVO showed cysteine and, tyrosine/tryptophan amino acids oxidation peaks
- Chemical agents promoted morphological changes and unfolding of the NIVO structure
- Denatured NIVO enhanced the detection of more electroactive amino acid residues

Anticancer monoclonal antibody nivolumab-DNA interaction *in situ* evaluation using a DNA-electrochemical biosensor

Wesley B. S. Machini^[a], Nuno V. Marques^[b] and Ana Maria Oliveira-Brett^{*[a]}

Dedication to Prof. Gorton

Abstract: The cancer treatment based on monoclonal antibodies has become one of the most successful therapeutic strategies. Among the monoclonal antibodies nivolumab (NIVO) stands out as being a relatively new anticancer drug. The NIVO-dsDNA interaction was evaluated, in incubated solutions, by differential pulse voltammetry, UV-Visible spectrophotometry and gel electrophoresis, and *in situ* with dsDNA-, poly[G]- or poly[A]-electrochemical biosensors, by differential pulse voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy, and quartz crystal microbalance. The interfacial behaviour of the dsDNA-electrochemical biosensor, by cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy, was also investigated. The NIVO-dsDNA interaction mechanism caused, for shorter times, the binding of the NIVO to DNA, resulting in a NIVO-dsDNA complex, and for longer times, the relaxation/unwinding of the DNA double strand. The monoclonal antibody NIVO did not promote oxidative damage to DNA.



Scheme 1. Crystal structure of the monoclonal antibody NIVO-Fab fragment, heavy chain in red and light chain in green (structure PDB ID: 5GGQ)^[9].

Introduction

Cancer immunotherapy is a very important strategy among the different therapeutic options, in which the body's immune system is used to induce anti-tumour response and thus defeat the diseases^[1]. Several types of immunotherapy have been used in treatment of cancer, such as adoptive cell transfer^[2], immune checkpoint inhibitors^[3], oncolytic virus^[4], vaccines^[5], monoclonal antibodies^[6], and others. Among these, the monoclonal antibodies (mAb) have attracted attention due to their clinically relevant mechanisms of action.

Nivolumab (NIVO, trade name OPDIVO[®]) is a fully human immunoglobulin G4 (IgG4) kappa mAb, genetically engineered, which targets the programmed death-1 (PD-1) receptor, binding to PD-1 with high affinity and blocking the interaction between PD-1 and its ligands, PD-L1 and PD-L2^[7]. NIVO is an intravenous drug approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) in 2014 for the treatment of metastatic melanoma, non-small-cell lung cancer, renal cell carcinoma, and more recently, Hodgkin lymphoma^[8].

The chemical structure of the mAb NIVO (Scheme 1) consists of two identical heavy chains with 440 amino acids each, and two identical kappa light chains with 214 amino acids each, which are linked through inter-chain disulphide bonds^[8a]. The primary structure^[9], with a total of 1737 amino acids, have 20 different amino acid residues. However, only 140 amino acid residues can be detected electrochemically: tyrosine (Tyr, 54)^[10], tryptophan (Trp, 24)^[11], cysteine (Cys, 32)^[12], histidine (His, 20) and methionine (Met, 10)^[12a].

The mAbs used in cancer therapy DNA interaction mechanism research has great importance to understand mAbs biological activity and toxicity *in vivo*. Although mAbs have a high affinity for their epitope, the specific site of the protein they bind to, the investigation of mAbs-DNA interaction has been given a very little focus. The study of the anticancer mAbs-DNA interaction offers an opportunity to understand the mechanisms of DNA binding and affinity to the anticancer drug, as well as the possible implications in the DNA morphological structure damage caused by the mAbs interaction^[13].

The nature of the anticancer drugs-DNA interaction, have been investigated by different methodologies, to elucidate the implications in DNA structure, the physiological action mechanism and cytotoxic activity of the drugs. In the research of anticancer drugs-DNA interaction, methods such as AFM^[14], gel electrophoresis^[15], fluorescence^[16], NMR^[17], tandem mass^[18], UV-Visible spectroscopies^[13, 16-17] and electrochemistry^[13, 15-16, 19], have been used successfully.

The electrochemical methods in the anticancer drugs-DNA interaction mechanisms investigation is very relevant, due to their fast response, high sensitivity and selectivity, and the electrochemical techniques use of a small amount of sample^[20].

[a] W. B. S. Machini and Prof. Dr. A. M. Oliveira-Brett
Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology,
University of Coimbra, 3004-535, Coimbra, Portugal
E-mail: brett@ci.uc.pt

[b] N. V. Marques
Serviços Farmacêuticos, Centro Hospitalar e Universitário de
Coimbra, EPE, 3000-075, Coimbra, Portugal

The dsDNA-electrochemical biosensor is a dsDNA probe adsorbed on the electrode surface, which detects specific analytes DNA binding processes^[21], such as the DNA conformational structure changes after interaction^[22], and monitors the appearance of DNA base residues, guanine (Gua) and adenine (Ade) as well as their oxidation products, the biomarkers of oxidative DNA damage: 8-oxoguanine (8-oxoGua)^[23] and 2,8-dihydroxyadenine (2,8-oxoAde)^[24]. The dsDNA-electrochemical biosensors allow a detailed understanding of the interaction mechanisms since they present great sensitivity in detecting conformation disorders and oxidative DNA damage.

Considering that the evaluation of the anticancer mAb drug nivolumab-dsDNA interaction has great importance, a systematic investigation was performed for the first time in: (a) NIVO and dsDNA in incubated solutions, by differential pulse voltammetry, UV-Visible spectrophotometry, and gel electrophoresis; and (b) *in situ* NIVO incubated with the dsDNA-, poly[G]- or poly[A]-electrochemical biosensors, by differential pulse voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy, and quartz crystal microbalance, for different time periods.

Results and Discussion

Interaction of NIVO and dsDNA in incubated solutions

The NIVO and dsDNA interaction in incubated solutions, using DPV, UV-Vis, and gel electrophoresis, for different incubation periods of time, in order to evaluate the hazard caused by the mAb NIVO to DNA, such as dsDNA structure morphological changes, hydrogen bonding cleavage, and/or oxidative DNA damage, was evaluated.

Electrochemistry

The variations in the dsDNA oxidation peaks, desoxyguanosine (dGuo) and desoxyadenosine (dAdo), in the absence and in the presence of NIVO, the occurrence of free guanine (Gua) and free adenine (Ade), and of the biomarkers 8-oxoGua and 2,8-oxoAde oxidation peaks were electrochemically followed in order to understand the NIVO-dsDNA interaction.

The control NIVO and dsDNA electrochemical oxidation behaviour, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5, were investigated by DPV, in order to identify the oxidation peaks that appeared after the NIVO-dsDNA interaction in solution. The electrode surface was always cleaned and conditioned after each measurement to remove the oxidation products adsorbed at the GCE surface.

The DPV for control 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA showed two oxidation peaks due to dGuo, at $E_{\text{pa}} = +0.98$ V, and dAdo, at $E_{\text{pa}} = +1.25$ V, (Figure 1 $\color{red}{\rightarrow}$). The DPV for control 0.1 mg mL^{-1} NIVO showed two oxidation peaks (Figure 1 $\color{blue}{\rightarrow}$). The first peak is due to the Cys amino acid residues first oxidation peak^[12a], P1_{Cys}, at $E_{\text{p1}} = +0.55$ V, and the second peak, P2_{Tyr+Trp}, to the oxidation of Tyr^[10, 25], and the first oxidation peak of the Trp amino acid residues^[11, 25], at $E_{\text{p2}} = +0.77$ V.

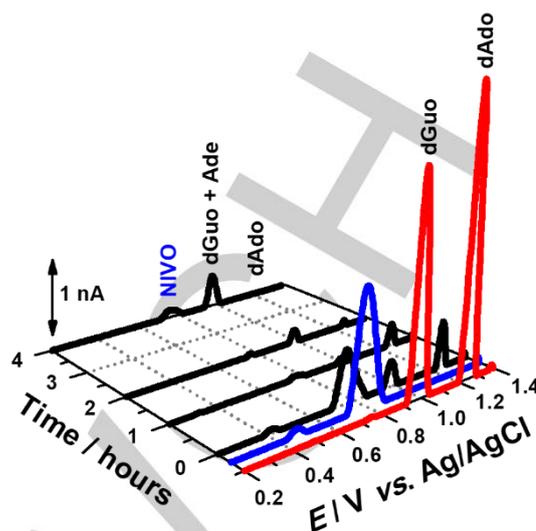


Figure 1. DPVs baseline-corrected, at GCE, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5: ($\color{red}{\rightarrow}$) control 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, ($\color{blue}{\rightarrow}$) control 0.1 mg mL^{-1} NIVO, and ($\color{black}{\rightarrow}$) after incubation of 0.1 mg mL^{-1} NIVO with 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, during different time periods: 0, 1, 2 and 4 hours. Scan rate $\nu = 5$ mV s^{-1} .

After introducing 1.0 mg mL^{-1} NIVO concentrated solution to the 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA solution, the DPV immediately showed a strong decrease for both dGuo and dAdo oxidation peaks, which almost disappeared.

The NIVO concentration was decreased to 0.1 mg mL^{-1} and the effect of NIVO-dsDNA interaction in solution over time, to better understand the interaction mechanism, was investigated. The DPV obtained immediately after inserting 0.1 mg mL^{-1} NIVO diluted solution into the 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA solution (Figure 1 $\color{black}{\rightarrow}$), showed a strong diminishing of the dGuo and dAdo oxidation peak currents, and the two new oxidation peaks, from the NIVO oxidation, the first oxidation peak of the Cys amino acid residues, P1_{Cys}, at $E_{\text{pa}} = +0.42$ V^[12a], and the second peak to the oxidation of Tyr^[10, 25-26] and the first oxidation peak of the Trp amino acid residues P2_{Tyr+Trp}, $E_{\text{pa}} = +0.76$ V^[11, 25]. After 1 hour incubation, the dsDNA and the NIVO oxidation peak currents continued to decrease, and the first oxidation peak of Cys residues, P1_{Cys}, disappeared completely.

The large decrease, for shorter times, of the dsDNA oxidation peaks current observed after the NIVO-dsDNA interaction suggests that a dsDNA conformational change occurred^[27]. The decrease of the dsDNA oxidation peaks current is related to the binding of the NIVO to dsDNA structure through protein-DNA phosphate interactions, which promotes the formation of a rigid NIVO-dsDNA complex. As a consequence, the DNA purine bases were incorporated within the more compact DNA double helix structure, making them less exposed to the GCE surface and more difficult to be oxidized, which results in the dGuo and dAdo oxidation peak currents decrease^[27-28]. The small shift to less positive potentials of the Cys oxidation peak can be explained by the binding of NIVO to dsDNA, which makes the amino acid residues Cys more easily oxidized. The disappearance of this peak is related to the strong binding of NIVO to dsDNA, which

changes the structural conformation of the mAb making the Cys amino acid residues oxidation more difficult.

Increasing the incubation period to 2 hours, an increment on the dGuo oxidation peak current was observed, while the second NIVO oxidation peak, P₂_{Tyr+Trp}, and dAdo oxidation peak currents diminished. This change can be explained by the dGuo + dAdo strong interaction with NIVO, causing the bond cleavage between the sugar moiety and Ade residues, and Ade liberation from the DNA helix, which can be observed by the dGuo + Ade oxidation peak current increase, at $E_p = +0.98$ V. This cleavage causes a small destabilization of the DNA structure promoting its relaxation, which can also be observed by the dGuo + Ade oxidation peak current increase, due to the formation of a protein-DNA complex, followed by DNA relaxation^[29].

After 4 hours incubation this continuous change was consolidated by the dAdo oxidation peak complete absence and the increase of the oxidation peak current of dGuo + Ade bases released. The presence of the second NIVO oxidation peak, P₂_{Tyr+Trp}, suggests that the relaxation of the DNA double helix makes easier the NIVO amino acid residues oxidation in the NIVO-dsDNA complex. For longer times no more changes were observed.

In all DPVs obtained in NIVO-dsDNA incubated solutions, the 8-oxoGua or 2,8-oxoAde oxidation peak, at $E_{pa} = +0.45$ V, the biomarkers of oxidative DNA damage^[23-24], was not detected (Figure 1).

UV-Vis Spectrophotometry

The UV-Vis investigation of the NIVO-dsDNA interaction in incubated solutions was also evaluated (Figure 2). The influence of the NIVO interaction on the dsDNA morphology caused changes in the absorption spectra of dsDNA, and were monitored in the absence and presence of the mAb.

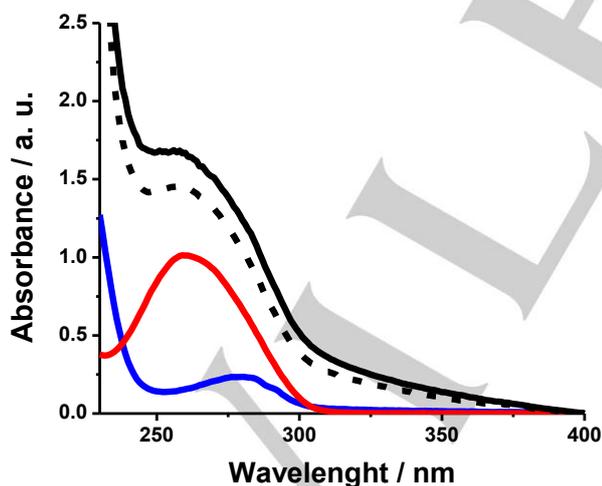


Figure 2. UV-Vis absorption spectra, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5. (—) control 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, (—) control 0.1 mg mL^{-1} NIVO, (- - -) immediately after the addition of 0.1 mg mL^{-1} NIVO to the 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA solution, and (—) after 4 hours incubation of 0.1 mg mL^{-1} NIVO with the 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA solution.

UV-Vis spectra for control solutions of 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, and 0.1 mg mL^{-1} NIVO, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5, for the same conditions, were investigated. The control dsDNA spectra, in the range from 400 to 230 nm, showed one absorption band, at $\lambda_{\text{max}} = 260$ nm, corresponding to the $\pi \rightarrow \pi^*$ transitions from the nucleotide's heterocyclic rings. The control NIVO spectra in the same conditions exhibited one absorption band near to $\lambda_{\text{max}} = 280$ nm, dominated by the aromatic side-chains of Trp, Tyr, and phenylalanine (Phe) amino acid residues^[30].

UV-Vis spectra, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5, of 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA solution with 0.1 mg mL^{-1} NIVO, at 0 hour and after 4 hours solution incubation, were recorded. The spectra immediately after adding NIVO to the dsDNA solution showed a great increase in the dsDNA absorption band, at $\lambda_{\text{max}} = 260$ nm, without shift, explained by the superposition of the absorption bands of NIVO and dsDNA and, and consequently, the NIVO-dsDNA complex formation. After 4 hours incubation a new spectrum showed an increase in absorption intensity.

The shifts in the wavelength and hyperchromic (or hypochromic) effects are spectral properties of DNA-drug interaction, which are closely related with the double helix structure. In this way, the hyperchromicity at the maximum absorbance of dsDNA, observed after 4 hours incubation indicates that a relaxation mechanism took place for longer times, in agreement with the NIVO-dsDNA interaction in incubated solutions by DPV.

Gel electrophoresis

The NIVO-dsDNA interaction was also investigated using agarose gel electrophoresis, in order to enable the evaluation of dsDNA conformational changes, taking into account the relative migration profile and band intensity of the dsDNA before and after the NIVO-dsDNA interaction.

The electrophoretic profile of incubated solutions containing 1.0 mg mL^{-1} NIVO with 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA (lanes 3-5), for different incubation time periods, 24 hours (lane 3), 4 hours (lane 4) and 1 hour (lane 5) (Figure 3).

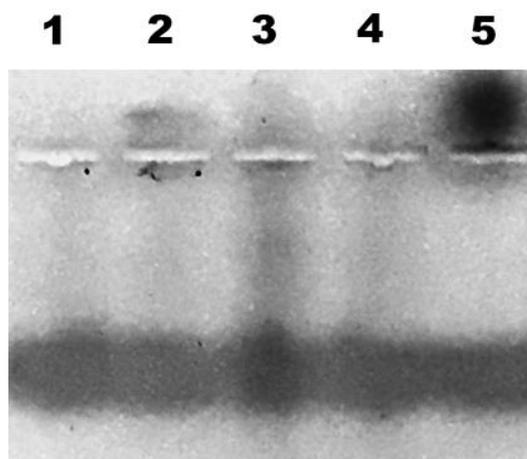


Figure 3. Gel electrophoresis: (lane 1) control 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA; (lane 2) control 1.0 mg mL^{-1} NIVO; 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA incubated with 1.0 mg mL^{-1} NIVO for: 24 h (lane 3), 4 h (lane 4), and 1 h (lane 5).

The controls 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA (lane 1) and 1.0 mg mL^{-1} NIVO (lane 2) were incubated for 24 hours in the same experimental conditions. The control dsDNA (lane 1) showed a large band due to the three-dimensional different-sized long fragments. The control NIVO (lane 2), showed also a large band since the protein has a complex 3D structure.

The NIVO-dsDNA incubated for 1 hour (lane 5), when compared with control dsDNA (lane 1), presented a dark well and the disappearance of the fluorescence band, showing that the EtBr marker was excluded from intercalating in the dsDNA binding sites due to the strong formation of the NIVO-dsDNA complex structure.

In contrast, the progressive increase in the fluorescence intensity observed for NIVO-dsDNA incubated for 4 hour (lane 4) and 24 hours (lane 3) reveals the relaxation/unwinding of the DNA double strand caused by the longer exposure to NIVO, which makes easier the intercalation of the EtBr marker.

For this reason, it is possible to state that the dsDNA conformational changes during the incubation with NIVO, observed by DPV and UV-Vis spectrophotometry, are in agreement with those obtained by agarose gel electrophoresis.

***In situ* NIVO incubated with the dsDNA-electrochemical biosensors**

The dsDNA-electrochemical biosensors were applied to evaluate the NIVO-dsDNA interaction during different time periods, using DPV, CV and EIS, and QCM.

Electrochemistry

NIVO interaction with the dsDNA-electrochemical biosensor

The dsDNA-electrochemical biosensor allows to monitor and detect the changes during the NIVO-dsDNA interaction, *in situ* in the dsDNA adsorbed on the GCE surface. The methodology based on dsDNA multilayers immobilization on the GCE surface^[21] will enable a full coverage of the GCE surface, important and necessary to prevent the undesired co-adsorption of free molecules of the mAb NIVO and dsDNA, and the NIVO-dsDNA complexes^[31].

A newly prepared dsDNA-electrochemical biosensor was always used for each experiment and incubated in 0.1 mg mL^{-1} NIVO diluted solution, during a specific time period, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5. The DPVs in the supporting electrolyte buffer solution, of the control dsDNA-electrochemical biosensor, and the NIVO-dsDNA-electrochemical biosensor, after each different incubation time period, were obtained (Figure 4a).

The DPV obtained after 1 hour incubation showed the second oxidation peak of Tyr and Trp NIVO amino acid residues, $P_{2\text{Tyr+Trp}}$, $E_{\text{pa}} = +0.76$ V, and an extensive decrease of the dGuo and dAdo oxidation peak currents, due to the NIVO-dsDNA interaction. A conformational change in the dsDNA structure, related to the NIVO binding to DNA molecules immobilized on the GCE surface and formation of the NIVO-dsDNA complex, occurred.

The DPV registered for 2 hours incubation time showed the dAdo oxidation peak current decrease, while the peak currents of dGuo-Ade and NIVO oxidation increased. This behaviour evidences a greater interaction between NIVO and the DNA nucleotides dGuo and dAdo, due to the deoxyribose C1' carbon oxidation by NIVO, causing the Ade cleavage and release. The dsDNA relaxation in the NIVO-dsDNA interaction may explain the dGuo oxidation peak increase, promoting for longer incubation time's new dsDNA conformational changes. The oxidation peak, at $E_{\text{pa}} = +0.98$ V, corresponds to an overlap of both dGuo residues and released Ade bases oxidation.

The DPV obtained after 4 hours incubation time showed the dAdo oxidation peak current disappearance, the dGuo + Ade peak remained unchanged, and the NIVO oxidation peak increased, confirming the strong NIVO-dsDNA interaction, leading to dsDNA structural changes, already observed in incubated solutions (Figure 1).

However, under these experimental conditions NIVO did not promote oxidative dsDNA damage, as the Gua or/and Ade oxidation products, 8-oxoGua or/and 2,8-oxoAde, oxidation peaks at $E_{\text{pa}} = +0.45$ V, did not occur.

NIVO interaction with poly[G]- and poly[A]-electrochemical biosensors

The poly[G]- and poly[A]-electrochemical biosensors were constructed using the homopolynucleotides, poly[G] and poly[A], with the purpose of clarifying with which purine base occurred a more specific preferential NIVO-dsDNA interaction.

The DPV of the control poly[G]-electrochemical biosensor, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5, showed the dGuo oxidation peak, at $E_{\text{pa}} = +1.08$ V (Figure 4b). After 1 hour incubation of a new poly[G]-electrochemical biosensor, in 0.1 mg mL^{-1} NIVO, the DPV showed a great dGuo oxidation peak current decreased, at $E_{\text{pa}} = +1.08$ V, and a new oxidation peak, the second NIVO oxidation peak, $P_{2\text{Tyr+Trp}}$, at $E_{\text{pa}} = +0.76$ V, in agreement with the NIVO control. The DPV after longer incubation times, 2 and 4 hours, showed the dGuo oxidation peak progressive increase, while the NIVO oxidation peak remained constant.

The results using poly[G]-electrochemical biosensors are in agreement with those in incubated solutions and using dsDNA-electrochemical biosensors. For shorter incubation periods, the formation of a rigid NIVO-poly[G] complex structure occurred, whereas for longer incubation times, the relaxation of poly[G] structure took place.

The DPV of the control poly[A]-electrochemical biosensor, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5, showed the dAdo oxidation peak, at $E_{\text{pa}} = +1.26$ V (Figure 4c). The DPV of a new poly[A]-electrochemical biosensor incubated in 0.1 mg mL^{-1} NIVO, showed after 1 and 2 hours incubation time a great and progressive dAdo oxidation peak current decrease, and after 4 hours incubation the dAdo oxidation peak completely disappearance, and the free Ade bases oxidation peak appearance, at $E_{\text{pa}} = +1.05$ V.

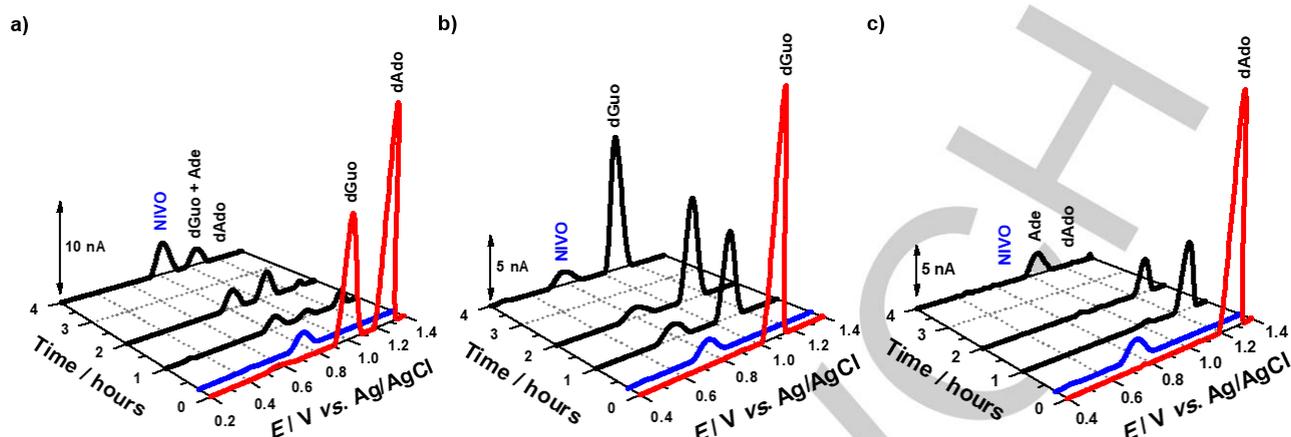


Figure 4. DPVs baseline-corrected, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5 for (—) control 0.1 mg mL⁻¹ NIVO, (—) control (a) dsDNA-, (b) poly[G]- and (c) poly[A]-electrochemical biosensor and (—) after incubation with 0.1 mg mL⁻¹ NIVO during different time periods: 1, 2 and 4 hours. Scan rate $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

The poly[G]- and poly[A]-electrochemical biosensors corroborate the results observed with the dsDNA-electrochemical biosensors, and providing new complementary information to understand the NIVO-dsDNA molecular mechanism interaction.

Effectively, the NIVO-dsDNA mechanism interaction occurs initially independent of DNA sequence, leading the mAb NIVO to bind to dsDNA, forming a NIVO-dsDNA complex structure. For longer times, the NIVO-dsDNA mechanism interaction undergoes the relaxation/unwinding of the dsDNA structure, with a preferential interaction between NIVO and the dAdo residues, causing the release of free Ade bases.

Nevertheless, the oxidation peak attributed to the oxidative DNA damage biomarkers, 8-oxoGua or 2,8-oxoAde, at $E_{pa} = +0.45 \text{ V}$, was not detected in all DPVs of poly[G]- and poly[A]-electrochemical biosensors incubated in NIVO, (Figure 4b and c), indicating that no oxidative damage occur, in these experimental conditions.

Electrochemical Impedance Spectroscopy

Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) experiments, to complement and clarify the NIVO-dsDNA interaction using dsDNA-electrochemical biosensors, were undertaken.

The dsDNA-electrochemical biosensor was characterized using $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ as redox probe, by CV and EIS, to confirm the adsorption and immobilization of dsDNA multilayers on the GCE surface. The changes in peak current and the separation of peak potentials in the CVs at bare GCE and at the dsDNA-electrochemical biosensor surfaces (Figure 5), related to the electron-transfer rate constant, and the changes of the semi-circles diameter in the Nyquist plots (Figure 6), related to the electron-transfer resistance^[32], were investigated.

The CV of the redox probe $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ registered using the bare GCE surface, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5, presented a quasi-reversible redox process, with a peak-to-peak separation $\Delta E_p \sim 213 \text{ mV}$. In the same experimental conditions, using the dsDNA-electrochemical biosensor, the CV showed that the redox

probe process $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ become irreversible and the peaks were shifted, in comparison with the CV recorded with the bare GCE, resulting in a peak potentials separation of $\Delta E_p \sim 770 \text{ mV}$ (Figure 5).

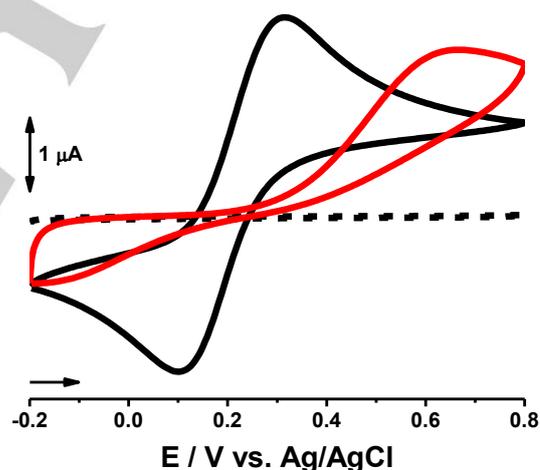


Figure 5. Cyclic voltammograms of 3.0 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5: (—) GCE, and (—) dsDNA-electrochemical biosensor. (---) supporting electrolyte. Scan rate $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

The complex plane impedance plots of the EIS for the bare GCE and dsDNA-electrochemical biosensor surface, at $E_{ap} = +0.25 \text{ V}$, which is equal to the formal potential of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ redox species obtained at mid peak potential, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5, for different $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ concentrations, were obtained (Figure 6).

A Randles-type equivalent electrical circuit was used to model the experimental complex plane impedance spectra. According to the circuit, the cell resistance is represented by R_Ω , the constant phase element is CPE_1 , the charge transfer resistance across the

electrode surface interface is R_{ct} , and the new constant phase element is CPE_2 . The CPE was modelled as a non-ideal capacitor^[33], given by $CPE = -(C\omega)^{-\alpha}$, where C is the capacitance, which describes the separation of charges in double layer at electrode-solution interface, ω is the frequency in rad s^{-1} , and α exponent is due to the surface heterogeneity ($0.5 < \alpha < 1$).

The EIS results were fitted to appropriate equivalent electrical circuits, at the bare GCE and at the dsDNA-electrochemical biosensor (Figure 6 (a1) and (b1)). The values obtained for the equivalent electrical circuit parameters are summarized in Table 1 and are shown as continuous curves in the spectra.

The complex plane impedance plot for the bare GCE (Figure 6a), showed a charge transfer reaction represented by the semi-circle, and a charge transfer resistance (R_{ct}), corresponding to the diameter of the semi-circle. For the dsDNA-electrochemical biosensor (Figure 6b) changes in the R_{ct} values were observed,

due to the dsDNA multilayers immobilized on the GCE surface, which block the electron transfer between the $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ and the electrode surface.

Nevertheless, for both bare GCE and dsDNA-electrochemical biosensor, a decrease in the R_{ct} with increasing $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ concentration, was expected. The dsDNA-electrochemical biosensor showed a much larger diameter of the semi-circle, reflected in the higher R_{ct} values, proving the GCE surface complete coverage with the immobilized dsDNA multilayers.

The complex plane impedance plots of the EIS for the dsDNA-electrochemical biosensor after 1 and 4 hours incubation in 0.1 mg mL^{-1} NIVO, at $E_{ap} = +0.25 \text{ V}$, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5 containing 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, were also performed (Figure 6c).

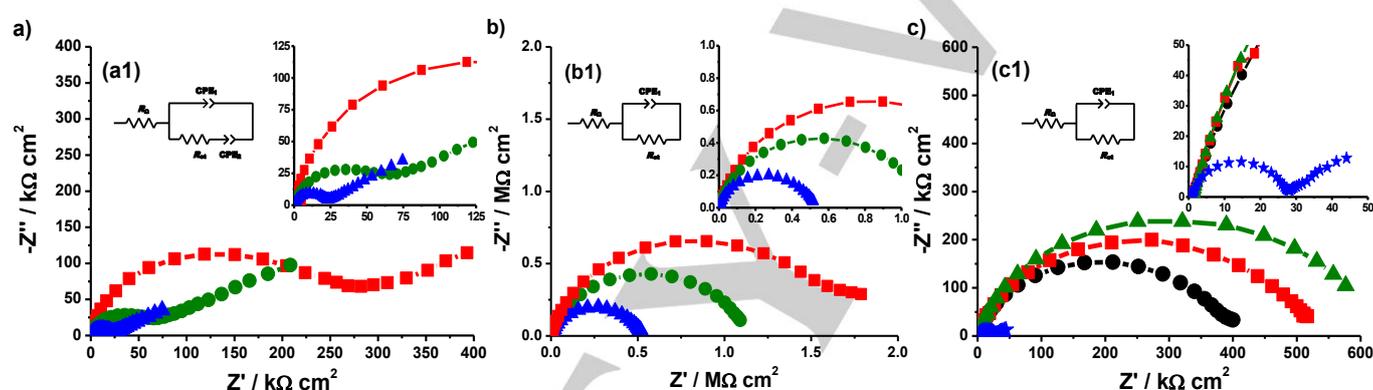


Figure 6. Complex plane impedance spectra, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5, at applied midpoint potential, $E_{ap} = +0.25 \text{ V}$, (■) 1.0 , (●) 3.0 and (▲) 5.0 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$: (a) bare GCE and (b) dsDNA-electrochemical biosensor, and (c) (★) bare GCE, dsDNA-electrochemical biosensor (■) control and after incubation with 0.1 mg mL^{-1} NIVO during different time periods: (▲) 1 and (●) 4 hours, in 5.0 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. (a1), (b1) and (c1) Equivalent electrical circuits.

Table 1. Randles parameters obtained for $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, from the complex plane impedance spectra, with bare GCE, control dsDNA-electrochemical biosensor and after incubation with 0.1 mg mL^{-1} NIVO during different time periods.

Electrode surface	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ (mM)	R_{Ω} ($\Omega \text{ cm}^2$)	CPE_1 ($\mu\text{F cm}^{-2} \text{ S}^{\alpha-1}$)	α_1	R_{ct} ($\text{k}\Omega \text{ cm}^2$)	CPE_2 ($\mu\text{F cm}^{-2} \text{ S}^{\alpha-1}$)	α_2
GCE	1.0	659 ± 10	0.22 ± 0.01	0.93 ± 0.01	76 ± 15	41 ± 10	0.41 ± 0.02
	3.0	1091 ± 10	0.21 ± 0.01	0.93 ± 0.01	43 ± 20	103 ± 10	0.46 ± 0.01
	5.0	1078 ± 10	0.21 ± 0.01	0.93 ± 0.01	25 ± 10	169 ± 10	0.46 ± 0.01
dsDNA-electrochemical biosensor	1.0	1224 ± 16	0.48 ± 0.08	0.87 ± 0.01	1660 ± 31	–	–
	3.0	1114 ± 14	0.58 ± 0.01	0.86 ± 0.01	1100 ± 18	–	–
	5.0	1157 ± 15	0.55 ± 0.02	0.85 ± 0.01	514 ± 10	–	–
NIVO-dsDNA-electrochemical biosensor (1 h)	5.0	1399 ± 13	0.41 ± 0.06	0.87 ± 0.01	604 ± 10	–	–
NIVO-dsDNA-electrochemical biosensor (4 h)	5.0	1205 ± 17	0.52 ± 0.01	0.86 ± 0.01	389 ± 10	–	–

The complex plane impedance, obtained after 1 hour incubation of the dsDNA-electrochemical biosensor with 0.1 mg mL^{-1} NIVO (Figure 6c (▲)), showed an increase in the diameter of the semi-circle, and consequently an increase in the R_{ct} value, in comparison with the control dsDNA-electrochemical biosensor, which is explained by the binding of NIVO to dsDNA and formation of NIVO-dsDNA complex resulting in inhibition of the electron-transfer resistance.

After 4 hours incubation (Figure 6c (●)), the complex plane impedance showed a small decrease of the diameter of the semi-circle and R_{ct} , which is related to the relaxation/unwinding of the dsDNA structure improving the electron-transfer resistance.

Quartz Crystal Microbalance

The quartz crystal microbalance (QCM) is a very important tool that allows to evaluate mass variations on the quartz surface.

The QCM experiments using a dsDNA-electrochemical biosensor on the graphite coated piezoelectric quartz crystal (AuQC_Gr) surface were carried out (Figure 7). After dried in room temperature under $N_{2(g)}$ atmosphere, the quartz crystal dsDNA-electrochemical biosensor was put in the QCM and the cell was covered with 5.0 mL of 0.1 M acetate buffer pH 4.5.

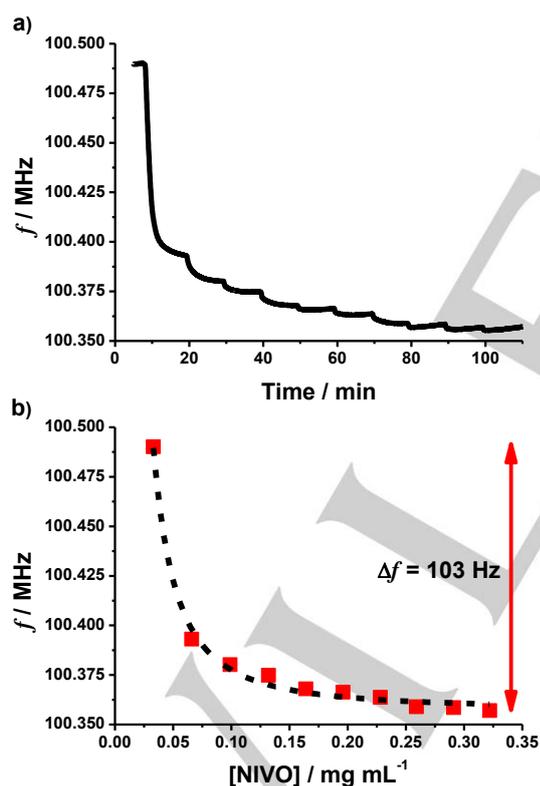


Figure 7. Frequency variation of the dsDNA-electrochemical biosensor, immobilised on the graphite coated piezoelectric quartz crystal, function of (a) time, after successive additions of NIVO, and (b) NIVO concentration in solution.

The analysis of crystal thickness variation with frequency was described by Sauerbrey and relates the resonance frequency

changes of the crystal with the variation of rigid films coupled to the quartz crystal surface through equation^[34]:

$$\Delta f = - (2f_0^2 / A \sqrt{\mu_q \rho_q}) \Delta m$$

where Δf is the frequency change (Hz), f_0 is the resonant frequency (for these crystals is 9 MHz), A is the piezoelectrically active crystal area, μ_q is the shear modulus of quartz for AT-cut crystals ($2.947 \times 10^{11} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-2}$), ρ_q is the density of quartz (2.648 g cm^{-3}), and, Δm is the mass change (g), which leads to $\Delta f / \Delta m = -894 \text{ Hz } \mu\text{g}^{-1}$.

The frequency variation after consecutive additions of NIVO was registered (Figure 7a), and the quartz crystal dsDNA-electrochemical biosensor mass changes were determined. After the stabilization of the system, the frequency was determined and taken as the reference value, to facilitate the monitoring of frequency changes corresponding to each addition of NIVO.

After the first NIVO addition to the solution a great change in the frequency of the quartz crystal dsDNA-electrochemical biosensor, was observed (Figure 7a). The great frequency decrease is caused by the binding of NIVO molecules to the dsDNA immobilized on the quartz crystal surface forming a NIVO-dsDNA complex.

Successive additions of NIVO to the quartz crystal dsDNA-electrochemical biosensor were performed. After the system stabilization the oscillation frequency progressive decrease, caused by mAb NIVO binding to the dsDNA and increasing the mass, was observed.

The frequency decrease and consequently the mass increase, was more significant until the addition of approximately 0.23 mg mL^{-1} NIVO, which coincides with 1 hour incubation. After this no more significant changes in frequency were observed, which indicates that change in the interaction mechanism occurred, related to the relaxation/unwinding of the double strand DNA.

After successive additions of NIVO, the variation of the total frequency detected for 2 hour incubation was 103 Hz, which corresponds to a $0.115 \mu\text{g}$ mass increase of the quartz crystal dsDNA-electrochemical biosensor (Figure 7b).

Conclusions

The monoclonal antibody NIVO-dsDNA interaction, in incubated solutions, by DPV, UV-Vis spectrophotometry and gel electrophoresis, and *in situ* using dsDNA-electrochemical biosensors, and polyhomonucleotides of guanosine and adenosine, the poly[G]- and poly[A]-electrochemical biosensors, by DPV, was evaluated. The modifications caused by NIVO in the dsDNA-electrochemical biosensor morphological structure, were also confirmed using EIS, and QCM.

The NIVO-dsDNA interaction occurs by the binding of the monoclonal antibody NIVO to DNA, resulting in a NIVO-dsDNA complex formation, followed by the relaxation/unwinding of the dsDNA and occurrence of abasic sites after the release of Ade bases from the dsDNA structure. However, the monoclonal antibody NIVO did not induce oxidative DNA damage.

Experimental Section

Materials

Nivolumab (NIVO) sample was OPDIVO® 40 mg/4 mL concentrate for solution for infusion from Bristol-Myers Squibb Farmacêutica Portuguesa, SA; dsDNA (D1501), poly[G] (P4404), poly[A] (P9403), potassium hexacyanoferrate(II) ($K_4[Fe(CN)_6]$) (P4066, purity 99.98%) and potassium hexacyanoferrate(III) ($K_3[Fe(CN)_6]$) (P8131, purity ~99%), were from Sigma-Aldrich, Spain.

Stock solutions of 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, poly[G] and poly[A], and 10.0 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ and $K_3[Fe(CN)_6]$ were prepared.

In all experiments were used 0.1 M acetate buffer pH 4.5, analytical grade reagents, and water from a Millipore Milli-Q system [35].

For the pH measurements a micropH 2001 Crison pH-meter with an Ingold combined glass electrode (Crison Instruments, Barcelona, Spain) was used. Microvolumes were dispensed by a Pipetman® single channel electronic pipette (Gilson Co, Inc., France).

The room temperature (25 ± 1 °C) was maintained during all experiments.

Electrochemical Methods

A μ Autolab type III, GPES 4.9 (Metrohm/Autolab, The Netherlands) was used for the voltammetric experiments. The three-electrode system, glassy carbon working (GCE) ($d = 1.0$ mm), Pt counter wire, and Ag/AgCl (3 M KCl) reference, in a one-compartment 2 mL electrochemical cell (eDAQ, Europe), was used.

The conditions: cyclic voltammetry (CV), 2 mV potential increment at 50 mV s^{-1} scan rate, and the differential pulse voltammetry (DPV), pulse amplitude 50 mV, pulse width 70 ms, interval time 0.4 s, step potential 2 mV, and scan rate 5 mV s^{-1} , were used.

For the electrochemical impedance spectroscopy (EIS) measurements, an IVIUM potentiostat in combination with IviumSoft program version 2.219 (Ivium Technologies, Eindhoven, The Netherlands), was used. A sinusoidal perturbation of root-mean-square (r.m.s.) amplitude 10 mV, over the frequency range 60 kHz to 0.01 Hz with seven frequency values per decade, was applied. The EIS were obtained at the hexacyanoferrate(III)/(II) midpoint potential, $E_{\text{ap}} = +0.25$ V, from CV, in 0.1 M acetate buffer pH 4.5, using $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ different concentrations.

The GCE surface, after polishing with diamond spray (particle size 3 μm) (Kemet, UK), was washed with ethanol and rinsed. Afterwards the GCE was placed in the supporting electrolyte and DPVs between $E_1 = +0.2$ V and $E_2 = +1.4$ V, were recorded. This procedure was always repeated before each electrochemical experiment.

Electrochemical Procedures

The anticancer mAb NIVO-dsDNA interaction was electrochemically investigated using two different electrochemical experimental procedures, and all experiments were always repeated and reproducible.

Procedure 1 – Interaction of NIVO-dsDNA in incubated solutions

Different NIVO concentrations, 1.0 mg mL^{-1} and 0.1 mg mL^{-1} , and 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, during different time periods: 0, 1, 2 and 4 hours, were incubated in 0.1 M acetate buffer pH 4.5. Control solutions containing only NIVO or dsDNA, in similar conditions and during the same time periods, using always a clean GCE surface, were analysed.

Procedure 2 – Interaction of NIVO-dsDNA using DNA-, poly[G]- and poly[A]-electrochemical biosensors

The dsDNA-electrochemical biosensors were prepared depositing three drops on the GCE, each one containing 5.0 μL from a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA solution. After each drop deposition the GCE was dried under a constant flux of $\text{N}_2(\text{g})$. A multilayer dsDNA film completely covering the GCE surface was ensured^[21], thus the undesired formation of a thin and incomplete

network film, and nonspecific binding of co-adsorbed dsDNA, NIVO or dsDNA-NIVO to the GCE surface, was avoided. For the poly[G]- and poly[A]-electrochemical biosensors a similar procedure was used. After this preparation, the dsDNA-, poly[G]- or poly[A]-electrochemical biosensors were immersed in different concentrations of NIVO solutions, and incubated during 1, 2, and 4 hours. Then, the dsDNA-, poly[G]- or poly[A]-electrochemical biosensors were washed with deionised water in order to remove the unbounded NIVO molecules, and placed in the electrochemical cell, containing only the buffer electrolyte, where DPV, EIS and QCM were performed. A control dsDNA-electrochemical biosensor was also incubated.

UV-Vis Spectrophotometry

The UV-Vis measurements were performed in a Spectrophotometer Hitachi U-2810 running with UV Solution Program (Digilab Hitachi, Tokyo, Japan) The absorption spectra conditions were sampling interval 0.5 nm, slit width 1.5 nm, scan speed of 100 nm min^{-1} , from 400 nm to 230 nm, in a quartz glass cuvette with 10.0 mm optic path.

Gel Electrophoresis

Nondenaturing agarose (1.0%, ultrapure DNA grade from Sigma) gel was prepared in TAE buffer (10 mM Tris base, 4.4 mM acetic acid and 0.5 mM EDTA, pH 8.0). 25 μL of dsDNA and NIVO control solutions, and NIVO-dsDNA sample aliquots (with 0.25% bromophenol blue in water) were loaded into wells. The electrophoresis, in TAE buffer for 1 hour at ~100 V was carried out. Afterwards to visualise the dsDNA mobility, band intensity and possible damage under UV (312 nm) transillumination, the ethidium bromide (EtBr) binding assay for DNA damage^[36], 0.5% EtBr, was used.

Quartz crystal microbalance

A quartz crystal microbalance (QCM) integrated in an AWS A20 platform with a graphite coated piezoelectric Au quartz crystal (AuQC_Gr) of 9 MHz central frequency, running with A20RPSOFT software (AWSensors, Scientific Technology, Valencia, Spain), was used. The cell integrated in the AWS A20 platform was coupled to computer-controlled IVIUM potentiostat, in combination with IviumSoft program version 2.219 (Ivium Technologies, Eindhoven, The Netherlands). The Au quartz crystals were cleaned with ethanol and Milli-Q water, and dried in a stream of pure $\text{N}_2(\text{g})$.

Acquisition and Presentation of Data

All DPVs were background-subtracted and baseline-corrected using the tool from GPES version 4.9 software, that improved the identification and visualization of peaks without introducing any artefact. All the UV-Vis spectra, λ_{max} and absorbance, are from the original spectra, and are shown without any further mathematical treatment. The EIS were analysed by fitting to a Randles-type equivalent electrical circuit using ZView software (Scribner Associates, USA). The NIVO structure was obtained using the Protein Workshop 4.2.0^[37] software from Protein Data Bank RCSB PDB^[9b, 9c, 38].

Acknowledgements

Financial support from Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), project UID/EMS/00285/2013 (co-financed by the European Community Fund FEDER), FEDER funds through the program COMPETE - Programa Operacional Factores de Competitividade, project Innovec'EAU (SOE1/P1/F0173), and PhD Grant 232296/2014-6 (W.B.S. Machini) from CNPq/Brazil, are gratefully acknowledged.

Keywords: anticancer drug • monoclonal antibody • nivolumab • drug-DNA interaction • DNA-electrochemical biosensor

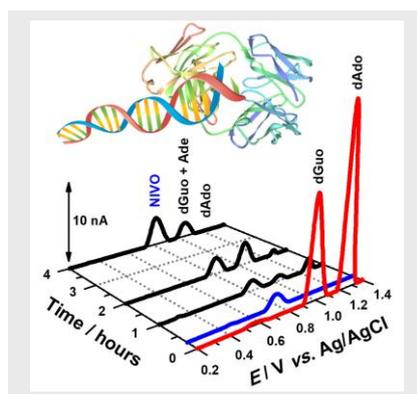
- [1] H. Zhang, J. Chen, *J. Cancer* **2018**, *9*, 1773-1781.
- [2] S. A. Rosenberg, N. P. Restifo, *Science* **2015**, *348*, 62-68.
- [3] S. L. Topalian, C. G. Drake, D. M. Pardoll, *Cancer cell* **2015**, *27*, 450-461.
- [4] H. Fukuhara, Y. Ino, T. Todo, *Cancer Sci.* **2016**, *107*, 1373-1379.
- [5] C. Guo, M. H. Manjili, J. R. Subjeck, D. Sarkar, P. B. Fisher, X. Y. Wang, *Adv. Cancer Res.* **2013**, *119*, 421-475.
- [6] L. M. Weiner, R. Surana, S. Wang, *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 317-327.
- [7] M. K. Callahan, M. A. Postow, J. D. Wolchok, *Immunity* **2016**, *44*, 1069-1078.
- [8] a) M. Hazarika, M. K. Chuk, M. R. Theoret, S. Mushti, K. He, S. L. Weis, A. H. Putman, W. S. Helms, X. Cao, H. Li, H. Zhao, L. Zhao, J. Welch, L. Graham, M. Libeg, R. Sridhara, P. Keegan, R. Pazdur, *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 3484-3488; b) R. Sundar, B. C. Cho, J. R. Brahmer, R. A. Soo, *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2015**, *7*, 85-96; c) D. Berman, A. Korman, R. Peck, D. Feltquate, N. Lonberg, R. Canetta, *Pharmacol. Ther.* **2015**, *148*, 132-153.
- [9] a) J. Y. Lee, H. T. Lee, W. Shin, J. Chae, J. Choi, S. H. Kim, H. Lim, T. Won Heo, K. Y. Park, Y. J. Lee, S. E. Ryu, J. Y. Son, J. U. Lee, Y. S. Heo, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 13354-13354; b) RCSB Protein Data Bank. www.rcsb.org/pdb; c) Drug Bank database. www.drugbank.ca/drugs/DB09035
- [10] T. A. Enache, A. M. Oliveira-Brett, *J. Electroanal. Chem.* **2011**, *655*, 9-16.
- [11] T. A. Enache, A. M. Oliveira-Brett, *Electroanalysis* **2011**, *23*, 1337-1344.
- [12] a) T. A. Enache, A. M. Oliveira-Brett, *Bioelectrochemistry* **2011**, *81*, 46-52; b) J. A. Reynaud, B. Malfoy, P. Canesson, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1980**, *114*, 195-211.
- [13] Y. Temerk, M. Ibrahim, H. Ibrahim, W. Schuhmann, *Rsc Adv.* **2018**, *8*, 25387-25395.
- [14] a) L. Li, R. Liu, F. Xu, Y. Zu, Z. Liu, *Micron* **2015**, *76*, 46-51; b) M. Li, L. Liu, X. Xiao, N. Xi, Y. Wang, *Sci. China Mater.* **2017**, *60*, 269-278.
- [15] a) L. I. N. Tome, N. V. Marques, V. C. Diculescu, A. M. Oliveira-Brett, *Anal. Chim. Acta* **2015**, *898*, 28-33; b) V. C. Diculescu, A. M. Oliveira-Brett, *Bioelectrochemistry* **2016**, *107*, 50-57.
- [16] Y. Temerk, M. Ibrahim, H. Ibrahim, M. Kotb, *J. Photochem. Photobiol., B* **2015**, *149*, 27-36.
- [17] J. S. Al-Otaibi, P. T. Spittle, T. M. E. Gogary, *J. Mol. Struct.* **2017**, *1127*, 751-760.
- [18] C. Silvestri, J. S. Brodbelt, *Mass Spectrom. Rev.* **2013**, *32*, 247-266.
- [19] a) I. B. Santarino, S. C. B. Oliveira, A. M. Oliveira-Brett, *Electroanalysis* **2014**, *26*, 1304-1311; b) A. D. R. Pontinha, H. E. Satana, V. C. Diculescu, A. M. Oliveira-Brett, *Electroanalysis* **2011**, *23*, 2651-2657; c) W. B. S. Machini, A. M. Oliveira-Brett, *Electroanalysis* **2018**, *30*, 48-56.
- [20] C. M. A. Brett, A. M. Oliveira-Brett, in *Encyclopedia of Electrochemistry*, Vol. 3 (Eds.: A. J. Bard, M. Stratmann, P. R. Unwin), Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany, **2003**, pp. 105-124.
- [21] V. C. Diculescu, A. M. Chiorcea-Paquim, A. M. Oliveira-Brett, *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2016**, *79*, 23-36.
- [22] E. Katz, B. Willner, I. Willner, *Perspect. Bioanal.* **2005**, *1*, 195-246.
- [23] A. M. O. Brett, J. A. P. Piedade, S. H. P. Serrano, *Electroanalysis* **2000**, *12*, 969-973.
- [24] V. C. Diculescu, J. A. Piedade, A. M. Oliveira-Brett, *Bioelectrochemistry* **2007**, *70*, 141-146.
- [25] a) F. Z. Issaad, L. I. N. Tomé, N. V. Marques, C. Mouats, V. C. Diculescu, A. M. Oliveira-Brett, *Electrochim. Acta* **2016**, *206*, 246-253; b) S. C. B. Oliveira, I. B. Santarino, A. M. Oliveira-Brett, *Electroanalysis* **2013**, *25*, 6.
- [26] I. P. Fernandes, A. M. Oliveira-Brett, *Bioelectrochemistry* **2017**, *113*, 69-78.
- [27] a) S. C. Oliveira, A. M. Oliveira-Brett, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2010**, *13*, 628-640; b) S. C. Oliveira, A. M. Chiorcea-Paquim, S. M. Ribeiro, A. T. Melo, M. Vivan, A. M. Oliveira-Brett, *Bioelectrochemistry* **2009**, *76*, 201-207; c) I. C. Lopes, A. M. Oliveira-Brett, *Electroanalysis* **2017**, *29*, 1674-1682.
- [28] A. M. Oliveira-Brett, V. C. Diculescu, *Bioelectrochemistry* **2004**, *64*, 143-150.
- [29] a) M. R. Redinbo, L. Stewart, P. Kuhn, J. J. Champoux, W. G. Hol, *Science* **1998**, *279*, 1504-1513; b) J. F. Carey, S. J. Schultz, L. Sisson, T. G. Fazio, J. J. Champoux, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 5640-5645.
- [30] J. M. Antosiewicz, D. Shugar, *Biophys. Rev.* **2016**, *8*, 163-177.
- [31] V. C. Diculescu, A. M. Oliveira-Brett, in *Biosensors and Cancer* (Ed.: V. R. Preedy), Science Publisher, CRC Press, New Hampshire, USA, **2012**.
- [32] M. E. Orazem, B. Tribollet in *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, John Wiley and Sons, New Jersey, **2008**.
- [33] F. Lisdat, D. Schafer, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 1555-1567.
- [34] G. Z. Sauerbrey, *Physik* **1959**, *155*, 206-222.
- [35] D. D. Perrin, B. Dempsey in *Buffers for pH and metal ion control*, Chapman and Hall, London, **1974**.
- [36] J. R. Brody, S. E. Kern, *Anal. Biochem.* **2004**, *333*, 1-13.
- [37] J. L. Moreland, A. Gramada, O. V. Buzko, Q. Zhang, P. E. Bourne, *BMC Bioinf.* **2005**, *6*, 21.
- [38] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235-242.

Entry for the Table of Contents (Please choose one layout)

Layout 1:

ARTICLE

The interaction mechanism between the anticancer monoclonal antibody nivolumab and DNA was investigated. The NIVO-dsDNA molecular mechanism interaction caused, for shorter times, the binding of the NIVO to DNA, resulting in a NIVO-dsDNA complex, and for longer times, the relaxation/unwinding of the dsDNA. The monoclonal antibody NIVO did not promote oxidative damage to dsDNA.



W. B. S. Machini, N. V. Marques, A. M. Oliveira-Brett

Page No. – Page No.

Anticancer monoclonal antibody nivolumab-DNA interaction *in situ* sensing using a DNA-electrochemical biosensor